

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 060**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 9/08	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
C12N 5/10	(2006.01)
C12P 21/08	(2006.01)
G01N 33/53	(2006.01)
C12N 15/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2014 PCT/JP2014/055861**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14136910**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2014 E 14761201 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2966087**

54 Título: **Anticuerpo contra péptido codificado por exón-21 de periostina y composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades asociadas a inflamación que contienen el mismo**

30 Prioridad:

08.03.2013 JP 2013047097

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2021

73 Titular/es:

**OSAKA UNIVERSITY (100.0%)
1-1 Yamadaoka
Suita-shi, Osaka 565-0871, JP**

72 Inventor/es:

**TANIYAMA, YOSHIKI;
MORISHITA, RYUICHI;
AZUMA, JUNYA;
SANADA, FUMIHIRO y
KATSURAGI, NARUTO**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 811 060 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo contra péptido codificado por exón-21 de periostina y composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades asociadas a inflamación que contienen el mismo

Campo técnico

La presente invención se refiere a un anticuerpo contra un péptido codificado por el exón-21 de periostina y a una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades asociadas a inflamación que contienen el mismo.

Antecedentes de la técnica

La periostina es una proteína de la matriz extracelular que consiste en un polipéptido de un peso molecular de aproximadamente 90.000. La cadena polipeptídica contiene una secuencia señal, un dominio rico en cisteína, un dominio repetido cuatro veces y un dominio C-terminal.

La periostina se designó inicialmente factor específico de osteoblastos-2 (OSF-2) y se aisló e identificó como un gen expresado específicamente en la línea celular de osteoblastos de ratón MC3T3-E1 (documento de patente 1, documento no de patente 1). Posteriormente, la proteína pasó a denominarse periostina y se notificó que tenía actividad promotora de la adhesión en células osteoblásticas (documento no de patente 2).

En estudios tempranos, se consideró que la periostina era una matriz extracelular expresada específicamente en tejido óseo. Sin embargo, se ha revelado que la periostina se expresa altamente no solo en el tejido óseo sino también al comienzo de la insuficiente cardíaca (documento no de patente 3, documento no de patente 4), aneurisma (documento no de patente 5), cánceres (documentos no de patente 6 a 8), preeclampsia (documento no de patente 9), reestenosis vascular (documentos no de patente 10 a 15), enfermedades inflamatorias (i) esofagitis (documento no de patente 16), ii) sinusitis y asma (documento no de patente 17), (iii) asma (documento no de patente 18), (iv) angiogénesis (documento no de patente 6, documentos no de patente 19 a 22), etc. y que la proteína se expresa muy ligeramente en tejido normal. También se ha revelado que algunas variantes de corte y empalme de periostina se expresan en osteoblastos (documentos no de patente 1 y 2, documento no de patente 23, documento de patente 2). Además, se ha notificado que PLF (factor similar a periostina) y periostina muestran similitudes y diferencias en su ubicación durante la embriogénesis (Zhu *et al.*, J Histochem Cytochem (2008) 56 (4), 329-345).

En cuanto a las funciones de la periostina, se ha notificado que una variante de corte y empalme de periostina de 811 aminoácidos (correspondiente a PN-2 en la figura 1) (documento no de patente 2) y una variante de corte y empalme de periostina de 783 aminoácidos (correspondiente a PN-4 en la figura 1) (documento no de patente 24) tienen propiedades de adhesión celular. En cambio, algunas variantes de corte y empalme de periostina carecen de propiedades de adhesión celular e incluyen una variante de corte y empalme de periostina de 838 aminoácidos (correspondiente a PN-1 en la figura 1) (documento de patente 2) y una variante de corte y empalme de periostina de 810 aminoácidos (correspondiente a PN-3 en la figura 1) (documento de patente 4).

En cuanto a los cánceres, la metástasis del cáncer está mediada por procesos tales como invasión de células cancerosas del tumor primario a los vasos sanguíneos o los vasos linfáticos, migración selectiva de células cancerosas a órganos metastásicos, invasión de células cancerosas de los vasos sanguíneos a órganos metastásicos, crecimiento de células cancerosas apoyado por el microentorno donde se produjo la metástasis y crecimiento asociado a angiogénesis de un tumor cuyo diámetro supera varios milímetros (documentos no de patente 25 y 26). Entre estos complejos procesos para el establecimiento de la metástasis, la invasión y metástasis inducidas por la motilidad potenciada de las células cancerosas son fases muy importantes (documento no de patente 27). Hasta ahora, se ha notificado que células cancerosas altamente metastásicas producen por sí mismas un factor de motilidad autocrino para potenciar su propio movimiento (documento no de patente 28). Se espera que sustancias inhibitorias contra este factor maligno sean inhibidores de la metástasis, pero no se ha encontrado ningún inhibidor específico en la actualidad.

Se han publicado diversos informes sobre la expresión de alto nivel de periostina en cánceres altamente metastásicos (documento no de patente 29), cáncer oral (documento no de patente 21), cáncer pancreático (documento no de patente 30), cáncer de mama (documento no de patente 31), cáncer de cabeza y cuello (documento no de patente 32), cáncer de colon (documento no de patente 19), cáncer de mama (documentos no de patente 6, 8 y 33), cáncer tímico (documentos no de patente 34 y 35), cáncer de pulmón de células no pequeñas (documentos no de patente 36 y 37), cáncer de ovario (documento no de patente 38), cáncer de próstata (documento no de patente 39), cáncer de hígado y de conducto biliar (documento no de patente 40), cáncer escamoso de esófago (documento no de patente 41), cáncer de próstata (documento no de patente 42), cáncer de tiroides (documento no de patente 43). Se ha notificado la expresión de alto nivel del factor de transcripción Twist en cánceres altamente metastásicos (documentos no de patente 44 y 45) y ha recibido atención. Hubo un informe que mostró que Twist se ubica también en la región promotora de periostina (documento no de patente 46). Además, se ha notificado que la capacidad de invasión de la línea celular epitelial de riñón embrionario humano 293T se potencia cuando se introduce el gen de periostina en la línea celular (documento no de patente 47). También se ha notificado que una variante de corte y empalme de periostina de 811 aminoácidos (correspondiente a PN-2 en la figura 1) se expresaba menos en diversas células

cancerosas, y la introducción del gen de periostina en células de melanoma inhibió su metástasis al pulmón (documento no de patente 48).

5 En cuanto a la reestenosis vascular, se ha usado ampliamente una endoprótesis de metal desnudo (BMS). De tres a
ocho meses después de la implantación de la BMS, se produce reestenosis en la endoprótesis (ISR) en el 10 al 40%
de los casos. El mecanismo de ISR se considera que es principalmente hiperplasia de la neoíntima asociada con la
migración de células del músculo liso desde la túnica media de la arteria coronaria hacia la endoprótesis y la
proliferación posterior de las células (documento no de patente 49). Para superar el inconveniente, Sousa *et al.* en
10 1999 desarrollaron una endoprótesis liberadora de fármacos (DES), que es una endoprótesis con la superficie
recubierta con un fármaco, como una endoprótesis liberadora de sirolimús (SES). Sin embargo, se ha notificado
trombosis tardía de la endoprótesis provocada por DES y, por consiguiente, se ha deseado un fármaco para inhibir de
manera segura la reestenosis. Diversos informes han notificado una expresión de alto nivel de periostina en músculo
liso vascular de un modelo animal con reestenosis inducida por lesiones con balón (documentos no de patente 10 a
15).

15 En cuanto a las inflamaciones, se han usado clínicamente fármacos antiinflamatorios e incluyen fármacos
antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos para enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, e
inmunosupresores y preparaciones de oro para enfermedades inflamatorias crónicas progresivas (por ejemplo,
reumatismo, osteoartritis, etc.). El principal mecanismo de acción de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos es
20 la inhibición de mediadores inflamatorios. Los fármacos proporcionan tratamiento sintomático y son eficaces para
enfermedades agudas, pero menos eficaces para enfermedades inflamatorias crónicas. Los fármacos
antiinflamatorios esteroideos son sumamente eficaces para enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, pero se
ha notificado que provocan de manera concomitante efectos secundarios graves. En consecuencia, debe tenerse
cuidado cuando se usan los fármacos. No se aplican preparaciones de oro a enfermedades inflamatorias agudas, sino
25 que se usan para el reumatismo crónico. Las preparaciones de oro tienen actividad inmunoreguladora y, por tanto,
ejercen efectos retardados. Sin embargo, también se ha notificado que las preparaciones de oro provocan efectos
secundarios, incluyendo síntomas mucosos y cutáneos, mielosupresión, disfunción renal y disfunción respiratoria. En
consecuencia, como con el caso de los fármacos antiinflamatorios esteroideos, debe tenerse suficiente cuidado
cuando se usan preparaciones de oro. Algunos inmunosupresores también han recibido atención en cuanto a su
30 aplicación clínica al reumatismo crónico, pero los efectos secundarios característicos de los inmunosupresores son
motivo de preocupación.

35 Se ha notificado una expresión potenciada de periostina en enfermedades inflamatorias (documentos no de patente
16 a 18, 50 y 51).

40 La angiogénesis está estrechamente asociada con, además de cánceres, el agravamiento de algunas enfermedades
incluyendo retinopatía diabética, aterosclerosis, periodontosis, esclerodermia, glaucoma, degeneración macular
relacionada con la edad y diabetes mellitus tipo II. La angiogénesis también desempeña un papel fundamental en el
comienzo y el agravamiento de artritis reumatoide, sarcoma de Kaposi, psoriasis y enfermedad de Basedow
(documento no de patente 52). También se ha mostrado que la expansión del tejido adiposo depende de la
angiogénesis, y se ha notificado que la inhibición de la angiogénesis es eficaz para la prevención de la obesidad, etc.
(documento no de patente 53). En la enfermedad de Alzheimer, las células endoteliales cerebrales activadas por
angiogénesis secretan un sustrato precursor para β -amiloide y un péptido neurotóxico que destruye selectivamente
45 neuronas corticales y, por tanto, se ha notificado que la inhibición de la angiogénesis es eficaz para la prevención y el
tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (documento no de patente 54). Basándose en estos estudios, se han
usado inhibidores de la angiogénesis para tratar y prevenir las enfermedades anteriores en los últimos años, y ha
habido una demanda de sustancias eficaces para inhibir la angiogénesis.

50 Inhibidores de la angiogénesis que se han encontrado son angiostatina (documentos no de patente 55 y 56);
endostatina (documento no de patente 57); fumagillina derivada de *Aspergillus fumigatus* y su derivado sintético TNP-
470 (documento no de patente 58); citogenina (documento no de patente 59); sustancias químicas sintéticas, tales
como inhibidores de metaloproteínasa, batimastat (BB-94) y marimastat (BB-2516) (documentos no de patente 60 y
61); y anticuerpos monoclonales que inhiben la unión de factores de angiogénesis (EGF, TGF- α , VEGF, etc.) a los
receptores correspondientes (documento no de patente 62). Sin embargo, estas sustancias requieren una cuidadosa
55 consideración de los efectos secundarios, y la seguridad de las sustancias para un cuerpo humano no está
completamente garantizada.

60 Se ha notificado que la expresión de periostina está estrechamente relacionada con la angiogénesis en el comienzo
de cánceres (documento no de patente 6, documento no de patente 19, documentos no de patente 21 y 22). Se ha
notificado que la inducción de angiogénesis por periostina se logra a través de la expresión del receptor-2 de VEGF
(Flk-1/KDR) en células endoteliales vasculares (documento no de patente 20).

65 Tal como se describió anteriormente, se ha indicado que la expresión del gen de periostina está relacionada con
estados de reestenosis vascular, cánceres, inflamaciones y estados de angiogénesis. También se han notificado un
anticuerpo relacionado con la inhibición de la migración celular mediada por periostina (documento no de patente 12)
y un anticuerpo que tiene actividad inhibitoria contra el crecimiento celular inducido por periostina (documento no de

patente 13). Sin embargo, la relación de la estructura de una variante de corte y empalme de periostina y reestenosis vascular, cánceres, inflamaciones y angiogénesis sigue sin estar clara.

Lista de citas

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Documentos de patente

- Documento de patente 1: JP 5-268982 A
- Documento de patente 2: WO 2005/019471
- Documento de patente 3: WO 2007/077934
- Documento de patente 4: WO 02/020055

Documentos no de patente

- Documento no de patente 1: Takeshita S. *et al.*, Biochem J (1993) 294, 271-278.
- Documento no de patente 2: Horiuchi K. *et al.*, J. Bone Miner. Res. (1999) 14, 1239-1249.
- Documento no de patente 3: Katsuragi N. *et al.*, Circulation (2004) 110, 1806-1813.
- Documento no de patente 4: Wang D. *et al.*, Hypertension (2003) 42, 88-95.
- Documento no de patente 5: Peters DG. *et al.*, Stroke (2001) 32, 1036-1042.
- Documento no de patente 6: Shao R. *et al.*, Mol Cell Biol. (2004) 24(9), 3992-4003.
- Documento no de patente 7: Gonzalez HE. *et al.*, Arch Otolaryngol Head Neck Surg. (2003) 129, 754-759.
- Documento no de patente 8: Sasaki H. *et al.*, Breast Cancer Res Treat. (2003) 77(3), 245-252.
- Documento no de patente 9: Sasaki H. *et al.*, Am J Obstet Gynecol. (2002) 186, 103-108.
- Documento no de patente 10: Lindner V. *et al.*, Arterioscler Thromb Vasc Biol. (2005) 25, 77-83.
- Documento no de patente 11: Litvin J. *et al.*, Am J Physiol Cell Physiol (2007) 292, C1672-C1680.
- Documento no de patente 12: Butcher JT. *et al.*, Dev Biol. (2007) 302(1), 256-266.
- Documento no de patente 13: Li G. *et al.*, Atherosclerosis (2006) 188(2), 292-300.
- Documento no de patente 14: Roy S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. (2007) 104(36), 14472-14477.
- Documento no de patente 15: Goetsch SC. *et al.*, Physiol Genomics (2003) 14(3), 261-271.
- Documento no de patente 16: Blanchard C, *et al.*, Mucosal Immunol. (2008) 1(4), 289-296.
- Documento no de patente 17: Stankovic KM, *et al.*, Laryngoscope (2008) 118(5), 881-889.
- Documento no de patente 18: Woodruff PG, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. (2007) 104(40), 15858-15863.
- Documento no de patente 19: Bao S. *et al.*, Cancer Cell (2004) 5(4), 329-339.
- Documento no de patente 20: Shao R. *et al.*, Biochem Biophys Res Commun. (2004) 321(4), 788-794.
- Documento no de patente 21: Siriwardena BS. *et al.*, Br J Cancer.(2006) 95(10),1396-1403.
- Documento no de patente 22: Takanami I. *et al.*, Int J Biol Markers (2008) 23(3), 182-186.
- Documento no de patente 23: Litvin J. *et al.*, J Cell Biochem. (2004) 92, 1044-1061.
- Documento no de patente 24: Gillan L. *et al.*, Cancer Res. (2002) 62, 5358-5364.
- Documento no de patente 25: Folkman J. Semin. Cancer Biol (1992) 3, 65-71.

- Documento no de patente 26: Hanahan D. *et al.*, Cell (1996) 86, 353-364.
- 5 Documento no de patente 27: Liotta LA. *et al.*, Cell (1991) 64, 327-336.
- Documento no de patente 28: Liotta LA. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (1986) 83, 3302-3306.
- Documento no de patente 29: Erkan M. *et al.*, Gastroenterology (2007) 132(4), 1447-1464.
- 10 Documento no de patente 30: Baril P. *et al.*, Oncogene (2007) 26(14), 2082-2094.
- Documento no de patente 31: Grigoriadis A. *et al.*, Breast Cancer Res. (2006) 8(5), R56.
- Documento no de patente 32: Kudo Y. *et al.*, Cancer Res. (2006) 66(14), 6928-6935.
- 15 Documento no de patente 33: Tie S, *et al.*, Int J Cancer. (2010) 16.
- Documento no de patente 34: Sasaki H. *et al.*, Cancer Lett. (2001) 72(1), 37-42.
- 20 Documento no de patente 35: Erratum in: Cancer Lett. (2003) 202(1), 117.
- Documento no de patente 36: Sasaki H. *et al.*, Cancer (2001) 92(4), 843-848.
- Documento no de patente 37: Erratum in: Cancer (2002) 95(12), 2580.
- 25 Documento no de patente 38: Zhu M *et al.*, Gynecol Oncol. (2010) 119(2): 337-344.
- Documento no de patente 39: Tischler V *et al.*, BMC Cancer. (2010) 9; 10: 273.
- 30 Documento no de patente 40: Riener MO *et al.*, Histopathology. (2010) 56(5): 600-6.
- Documento no de patente 41: Kwon YJ *et al.*, Oncol Res. (2009) 18(4): 141-151.
- Documento no de patente 42: Tsunoda T *et al.*, Prostate. (2009) 15; 69(13): 1398-1403.
- 35 Documento no de patente 43: Puppin C *et al.*, Endocrinol. (2008) 197(2): 401-408.
- Documento no de patente 44: Thiery JP. *et al.*, Nat Med. (2004) 10(8), 777-778.
- 40 Documento no de patente 45: Yang J, *et al.*, Cell (2004) 117(7), 927-939.
- Documento no de patente 46: Oshima A. *et al.*, J Cell Biochem. (2002) 86(4), 792-804.
- Documento no de patente 47: Yan W. *et al.*, J Biol Chem. (2006) 281(28), 19700-19708.
- 45 Documento no de patente 48: Kim CJ. *et al.*, Int J Cancer (2005) 117(1), 51-58.
- Documento no de patente 49: Kornowski R. *et al.*, J Am Coll Cardiol (1998) 31, 224-230.
- 50 Documento no de patente 50: Hakuno D *et al.*, J Clin Invest. 2010; 120(7): 2292-306.
- Documento no de patente 51: Zhou HM. *et al.*, J Cell Commun Signal. 2010 4(2): 99-107.
- Documento no de patente 52: Saibo Kogaku, Vol. 19, No. 8, 2000, Tanpakushitsu Kakusan Koso, vol. 45, n.º 6, 1182-1187.
- 55 Documento no de patente 53: Brakenhielm E. *et al.*, Circ Res. (2004) 94(12), 1579-1588.
- Documento no de patente 54: Vagnucci AH Jr. *et al.*, Lancet (2003) 361(9357), 605-608.
- 60 Documento no de patente 55: M.S. O'Reilly, *et al.*, Nature Medicine, 1996, 2, 689-692.
- Documento no de patente 56: B. K. Sim, *et al.*, Cancer Research. , 1997, 57, 1329-1334.
- 65 Documento no de patente 57: M. S. O' Reilly, *et al.* , Cell, 1997, 88, 277-285.

Documento no de patente 58: D. Ingber, *et al.*, Nature, 1990, 348, 555-557.

Documento no de patente 59: T. Oikawa, *et al.*, Anticancer Research, 1997, 17, 1881-1886.

5 Documento no de patente 60: G. Taraboletti, *et al.*, Journal of National Cancer Institute., 1995, 87, 293-298.

Documento no de patente 61: Marimastat: BB 2516, TA 2516., Drugs in R&D, 2003, 4(3), 198-203.

10 Documento no de patente 62: S. Iqbal y H. J. Lenz, HYPERLINK "http://www.ingentaconnect.com/content/klu/2 8 0" No "Cancer Chemotherapy and Pharmacology" Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2004, 54 Suppl. 1, S32-39.

Sumario de la invención

Problema técnico

15 Un objeto de la presente invención es proporcionar un inhibidor de una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un agente novedoso para prevenir o tratar reestenosis vascular, cánceres, inflamaciones, angiogénesis y arteriosclerosis, teniendo el agente un mecanismo diferente al de los agentes existentes y siendo capaz de mejorar la calidad de vida y el pronóstico a largo plazo. Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un método terapéutico, un método de diagnóstico y un reactivo de diagnóstico para reestenosis vascular, cánceres, inflamaciones y angiogénesis.

Solución al problema

25 Los inventores forzaron la expresión de las variantes de corte y empalme de periostina PN-2 y PN-4, purificaron las proteínas y recubrieron una placa con cada una de las proteínas para investigar la adhesión de fibroblastos a la placa. La adhesión de los fibroblastos varió con los tipos de las variantes de corte y empalme. La variante de corte y empalme de periostina PN-2 mostró una actividad de adhesión celular significativamente más fuerte que el control negativo albúmina (BSA) y el grupo no recubierto, mientras que la variante de corte y empalme de periostina PN-4 mostró una actividad de adhesión celular más débil que el grupo no recubierto y solo tuvo una actividad de adhesión celular muy débil en comparación con el control negativo albúmina (BSA) (figura 2). La diferencia en la capacidad de adhesión indicó que la región del exón-21 está implicada en la adhesión celular. Basándose en esto, los inventores supusieron que un anticuerpo policlonal anti-exón-21 de periostina producido usando la región del exón-21 como antígeno inhibirá la adhesión celular por PN-2.

35 El análisis de variantes de corte y empalme de periostina altamente expresadas en reestenosis vascular, cánceres, colitis inflamatoria o estados de angiogénesis reveló que el dominio C-terminal del cual se derivan las variantes de corte y empalme consiste en los exones 15 a 23, y que las ratas tienen las siguientes variantes (1) a (4) (véase la figura 1).

40 (1) una variante que conserva todos los exones (denominada PN-1; que consiste en 838 aminoácidos de SEQ ID NO: 1; la secuencia de ADNc se muestra en SEQ ID NO: 2)

45 (2) una variante que carece del exón-17 (denominada PN-2; que consiste en 811 aminoácidos de SEQ ID NO: 3; 27 aminoácidos (exón-17) de SEQ ID NO: 4 se delecionan de PN-1; la secuencia de ADNc se muestra en SEQ ID NO: 5)

50 (3) una variante que carece del exón-21 (denominada PN-3; que consiste en 810 aminoácidos; los aminoácidos en las posiciones 785 a 812 del extremo N-terminal (28 aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (exón-21)) se delecionan de PN-1)

(4) una variante que carece del exón-17 y el exón-21 (denominada PN-4; que consiste en 783 aminoácidos de SEQ ID NO: 7; 28 aminoácidos (exón-21) de SEQ ID NO: 6 se delecionan de PN-2; la secuencia de ADNc se muestra en SEQ ID NO: 8)

55 Además de las variantes de corte y empalme de rata, se encontraron también PN-2 y PN-4 de ser humano y ratón (PN-2 de ratón (SEQ ID NO: 9 (secuencia de aminoácidos), SEQ ID NO: 10 (secuencia de ADNc)); PN-4 de ratón (SEQ ID NO: 11 (secuencia de aminoácidos), SEQ ID NO: 12 (secuencia de ADNc)); PN-2 de ser humano (SEQ ID NO: 13 (secuencia de aminoácidos), SEQ ID NO: 14 (secuencia de ADNc)); PN-4 de ser humano (SEQ ID NO: 15 (secuencia de aminoácidos), SEQ ID NO: 16 (secuencia de ADNc))).

60 Los inventores intentaron producir un anticuerpo que reconociera específicamente los residuos de aminoácidos codificados por el exón-21 como inhibidor del exón, exón que es la diferencia estructural entre PN-2 y PN-4 y que se encuentra exclusivamente en PN-2.

65 Con el fin de producir un anticuerpo, el material usado como inmunógeno debe ser hidrófilo, y cuando parte de un polipéptido grande, tal como una proteína, se usa para producir un anticuerpo, la parte que va a usarse como

5 inmunógeno debe exponerse en la superficie de la proteína y formar un epítipo. Por tanto, con el fin de examinar la posibilidad de usar la cadena peptídica del exón-21 como antígeno, se realizó inicialmente una búsqueda de epítopos usando el software de Accelrys Mac Vector 7.2, que se usa ampliamente en el campo de la bioinformática. La región del exón mostró cierta "hidrofilicidad", pero se sugirió a partir de la "probabilidad superficial" y "antigenicidad" que la secuencia de aminoácidos de la región del exón-21 de SEQ ID NO: 6 (EVSKVTKFIEGGDGHLEFEDEAIKRLQ) es muy poco probable que se exponga en la superficie de la molécula de proteína y no tiene inmunogenicidad. Por tanto, se supuso que la región del exón no podía usarse como inmunógeno para producir un anticuerpo y que sería difícil producir en la práctica un anticuerpo contra la región del exón.

10 Sin embargo, basándose en la creencia de que el uso de un anticuerpo contra la región polipeptídica codificada por el exón-21 encontrado en PN-2 sería óptimo para la inhibición específica de las funciones de la proteína PN-2, los inventores intentaron producir un anticuerpo contra la secuencia de aminoácidos codificada por el exón-21. Los inventores sintetizaron un péptido que consiste en 28 aminoácidos que constituyen el péptido codificado por la región del exón-21, inmunizaron conejos con el péptido y purificaron una fracción de IgG del suero, logrando de ese modo la producción de un anticuerpo policlonal anti-péptido de exón-21 de rata.

15 Los inventores llevaron a cabo una investigación para determinar si el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata tiene actividad inhibitoria contra la actividad de adhesión de periostina. La proteína PN-2 de ratón se recubrió sobre células del músculo liso vascular de rata que se habían cultivado hasta la subconfluencia, y se sembraron sobre las mismas células THP-1 derivadas de monocitos, dando como resultado la adhesión de las células THP-1. Por separado, la proteína PN-2 se mezcló con el anticuerpo, y la mezcla y las células THP-1 se sembraron, dando como resultado la inhibición de la adhesión de las células THP-1. Los resultados globales confirmaron que el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata tiene actividad inhibitoria contra la actividad de adhesión de periostina. El anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata inhibe la adhesión de células THP-1, inhibiendo de ese modo la diferenciación de las células en macrófagos. Por tanto, el anticuerpo tiene una función inhibitoria contra la invasión de macrófagos en los órganos. Los macrófagos a menudo están asociados con diversas enfermedades inflamatorias, y se mostró por tanto que el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata tenía actividad antiinflamatoria (figura 3).

20 Los inventores investigaron el efecto inhibitor sobre la hiperplasia de la íntima vascular usando un modelo animal. Se indujo lesión en la arteria carótida izquierda de ratas SD con el uso de un catéter con balón, y simultáneamente se administró por vía intravascular el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata. Después de un cierto período de tiempo, los vasos sanguíneos se recogieron, se fijaron y se tiñeron con HE. Se calculó la razón de área de la íntima con respecto a la media y se examinó la gravedad de la hiperplasia de la íntima. No se encontró diferencia significativa en el área de la media, pero se observó una diferencia significativa en la razón íntima/media entre el grupo de administración de anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata y el grupo de rasguño solo. Los resultados mostraron la inhibición de la hiperplasia de la íntima (figura 4A).

25 Basándose en el informe de la asociación de la proteína PN-2 con inflamaciones, los inventores investigaron el efecto sobre la arteriosclerosis por el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) (el anticuerpo policlonal contra el péptido codificado por el exón-21 de periostina de rata). La investigación se realizó usando un modelo de ratones deficientes en ApoE (KO), que se considera generalmente que son un modelo propenso a arteriosclerosis, cargado con una dieta alta en grasas durante tres meses. Los ratones a los que se les administró anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) mostraron una inhibición significativa de la arteriosclerosis en la aorta torácica (la parte superior de la aorta), tal como se evaluó por la tinción con aceite rojo O, en comparación con los ratones a los que se les administró anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG). Los resultados revelaron el efecto inhibitor de la arteriosclerosis del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (figura 5).

30 Los inventores investigaron el efecto antiinflamatorio de un anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) en un modelo con enfermedad de Crohn, que es la colitis inflamatoria que tipifica enfermedades inflamatorias. El anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) o un anticuerpo IgG de control de ratón (mlgG) se administró a ratones C57B6 macho a las 8 semanas de edad, y se administró sulfato de dextrano sódico (DDS) al 1,75% por medio del agua potable. Dos semanas más tarde, la longitud del intestino grueso se mantuvo significativamente bien en el grupo de administración de anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) en comparación con el grupo de administración de anticuerpo IgG de control de ratón (mlgG) (figura 6). El anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) mostró actividad antiinflamatoria en el modelo de colitis de ratón.

35 A partir del informe de la asociación de la proteína PN-2 con la angiogénesis, los inventores investigaron el efecto inhibitor de la angiogénesis del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) y del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) en un modelo animal. Tras la confirmación de la expresión del gen de PN-2 en un modelo de ratón con isquemia de las extremidades inferiores, se administró el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb), como resultado de lo cual se observó un efecto inhibitor significativo sobre la angiogénesis (figura 7B). La inmunotinción de los vasos sanguíneos en el tejido con un anticuerpo frente a CD31 mostró una inhibición significativa de la angiogénesis en el grupo de administración de anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) (figura 8). El anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) también mostró un efecto inhibitor sobre el flujo sanguíneo de las extremidades inferiores (figura 9). El efecto inhibitor de la angiogénesis de los anticuerpos anti-exón-21 sugirió un posible efecto inhibitor de los anticuerpos anti-exón-21 sobre la angiogénesis patológica.

Los inventores realizaron ensayos en Matrigel usando células cultivadas. El sobrenadante de células de cáncer de mama humano MDA-MB231 aumentó significativamente la angiogénesis en células endoteliales humanas, mientras que la adición del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) o del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) inhibió significativamente la angiogénesis (figuras 10A y 10B). También se mostró que PN-2 indujo angiogénesis de manera dependiente de la dosis (figuras 11A y 11B). Los resultados mostraron que los anticuerpos anti-exón-21 inhiben la angiogénesis inducida por un cáncer.

Los inventores investigaron el efecto del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) sobre la capacidad proliferativa de las células de cáncer de mama 4T1 de ratón cultivadas, y como resultado, se observó una actividad citostática significativa mediante el ensayo de MTS, en comparación con la administración de un anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) (figura 12A). Los inventores también investigaron el efecto del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) sobre la necrosis de las células de cáncer de mama 4T1 de ratón, y como resultado, se observó una actividad significativa de inducción de necrosis mediante la medición de LDH en el sobrenadante, en comparación con la administración de un anticuerpo IgG de control de ratón (mlgG). Los resultados confirmaron el efecto inhibitorio de la proliferación directa y el efecto de inducción de necrosis directa de los anticuerpos anti-exón-21 sobre células de cáncer de mama 4T1 de ratón (figura 12B).

Se inyectaron células de cáncer de mama 4T1 de ratón en la almohadilla del pie de los ratones para establecer ratones modelo de metástasis pulmonar, y entonces se les administró a los ratones modelo el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) una vez a la semana. De tres a cinco semanas después del establecimiento del modelo, se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral primario, así como del número de colonias metastásicas pulmonares a partir de los tumores primarios, en comparación con un grupo de administración de anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) (figuras 13A y 13B). El anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) se administró de la misma manera que anteriormente, y como resultado, se observó una inhibición significativa de la metástasis pulmonar en comparación con un grupo de administración de anticuerpo IgG de control de ratón (mlgG) (figura 14).

Se inyectaron células de melanoma de ratón B16F10 en la almohadilla del pie de ratones para establecer ratones modelo de metástasis pulmonar, y entonces se les administró a los ratones modelo el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) una vez a la semana. Tres semanas después del establecimiento del modelo, se observó una inhibición significativa del crecimiento tumoral primario, así como del número de colonias metastásicas pulmonares a partir de los tumores primarios, en comparación con un grupo de administración de anticuerpos IgG de control de conejo (rlgG) (figuras 15A y 15B). Se supuso que los anticuerpos neutralizantes contra PN-2 (los anticuerpos anti-exón-21) inhiben las funciones PN-2, tales como el efecto promotor de la adhesión de macrófagos y el efecto angiogénico, y de ese modo inhiben el crecimiento y la metástasis pulmonar de células de cáncer de mama o células de melanoma. Esta suposición sugiere el potencial de los anticuerpos neutralizantes como agentes terapéuticos novedosos. Los resultados experimentales revelaron que los anticuerpos anti-exón-21 tienen actividad inhibitoria sobre el crecimiento tumoral primario, que avanza junto con la progresión de los estados cancerosos, y también tienen actividad inhibitoria sobre la metástasis pulmonar de los tumores primarios.

Los inventores investigaron el efecto del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) sobre la arteriosclerosis. El anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) se administró a un modelo de ratón de aneurisma una vez a la semana, y como resultado, se observó una inhibición significativa de la expansión del diámetro de la aorta tal como se midió con un escáner de ultrasonidos, en comparación con un grupo de administración de anticuerpo IgG de control de ratón (mlgG). Los resultados revelaron el efecto inhibitorio de aneurismas del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) (figura. 16). Por tanto los inventores completaron la presente invención.

La presente invención soluciona los problemas anteriores. La presente invención proporciona un anticuerpo contra una isoforma de periostina tal como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas, que tiene actividad de adhesión celular que se expresa específicamente en diversos estados asociados a inflamación incluyendo cánceres. En particular, la presente invención proporciona un anticuerpo tal como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas para tratar diversas enfermedades asociadas a inflamación, incluyendo cánceres, comprendiendo la composición un anticuerpo que reconoce el sitio de corte y empalme de la isoforma de periostina como antígeno.

Es decir, la presente invención incluye lo siguiente.

(1) Un anticuerpo que se une a uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 para su uso en la prevención o el tratamiento, a través de la inhibición de una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, de una enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada la isoforma de periostina, en el que la enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada la isoforma de periostina es una enfermedad seleccionada de esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, periodontitis, dermatitis atópica, asma, retinopatía diabética, arteriosclerosis, enterocolitis inflamatoria, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, aneurisma y osteoartritis.

(2) Un anticuerpo que se une específicamente a uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, y un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.

5 (3) El anticuerpo según lo anterior (1) o (2), que reconoce específicamente una región relacionada con la actividad de adhesión celular de una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular y neutraliza la actividad de adhesión celular de la isoforma de periostina.

10 (4) El anticuerpo según uno cualquiera de los anteriores (1) a (3), que es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

(5) El anticuerpo según lo anterior (4), que es un anticuerpo monoclonal.

15 (6) El anticuerpo según lo anterior (5), que se produce por una línea celular de hibridoma designada como NITE BP-01546.

(7) Un fragmento de anticuerpo que consiste en un fragmento parcial del anticuerpo monoclonal según lo anterior (5) o (6).

20 (8) Un derivado de anticuerpo que comprende una proteína o fármaco de bajo peso molecular unidos al anticuerpo según uno cualquiera de los anteriores (1) a (6) o al fragmento de anticuerpo según lo anterior (7).

(9) También se da a conocer en el presente documento, aunque no está comprendido en las reivindicaciones, un hibridoma que produce el anticuerpo según uno cualquiera de los anteriores (1) a (5), y

25 (10) una línea celular de hibridoma designada como NITE BP-01546.

(11) También se da a conocer en el presente documento, aunque no está comprendido en las reivindicaciones, un método para producir el anticuerpo según lo anterior (4), comprendiendo el método

30 inmunizar un mamífero no humano con un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, o el péptido que tiene un residuo de Cys añadido al extremo N-terminal,

35 fusionar una célula productora de anticuerpos del animal con una célula de mieloma para formar un hibridoma y cultivar el hibridoma.

40 (12) El método de producción según lo anterior (11), en el que el hibridoma es una línea celular de hibridoma designada como NITE BP-01546.

45 (13) También se da a conocer en el presente documento una composición farmacéutica para inhibir una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, comprendiendo la composición el anticuerpo según uno cualquiera de los anteriores (1) a (6), el fragmento de anticuerpo según lo anterior (7) o el derivado de anticuerpo según lo anterior (8), y

50 (14) una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, comprendiendo la composición el anticuerpo según uno cualquiera de los anteriores (1) a (6), el fragmento de anticuerpo según lo anterior (7) o el derivado de anticuerpo según lo anterior (8), así como

55 (15) una composición farmacéutica para inhibir la hiperplasia de la íntima vascular en la que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, tratar un cáncer en el que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, inhibir la angiogénesis en la que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, o prevenir o tratar aneurisma en el que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, comprendiendo la composición el anticuerpo según uno cualquiera de los anteriores (1) a (6), el fragmento de anticuerpo según lo anterior (7) o el derivado de anticuerpo según lo anterior (8).

60 (16) Se da a conocer en el presente documento, aunque no está comprendido en las reivindicaciones, un método para detectar o cuantificar una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular en una muestra biológica usando el anticuerpo según uno cualquiera de los anteriores (1) a (6), el fragmento de anticuerpo según lo anterior (7) o el derivado de anticuerpo según lo anterior (8).

65 El término "una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: XX" en el presente documento incluye una secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: XX que tiene delección, sustitución o adición de uno a varios aminoácidos. El término "varios" significa habitualmente de 2 a 8, preferiblemente de 2 a 5, más preferiblemente de 2 a 3.

Efectos ventajosos de invención

5 Un inhibidor de una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, comprendiendo el inhibidor el anticuerpo de la presente invención, se usa para inhibir una variante de periostina particular altamente expresada en hiperplasia de la íntima vascular, cánceres, inflamaciones incluyendo colitis inflamatoria, enfermedades acompañadas de angiogénesis, o similares, inhibiendo de ese modo la exacerbación de los estados de las enfermedades y tratando las enfermedades. El anticuerpo también puede usarse para la medición de la cantidad de tal variante de periostina en una muestra de un paciente para determinar la presencia o ausencia de una enfermedad y la progresión de los estados patológicos.

Breve descripción de los dibujos

15 La figura 1 es una vista esquemática que muestra variantes de corte y empalme de periostina de ratón.

La figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del ensayo de las propiedades de adhesión celular de las proteínas PN-2 y PN-4 de rata en el ejemplo 1.

20 Las figuras 3A y 3B son imágenes y un gráfico que muestra los resultados del estudio en el ejemplo 4. Las imágenes y el gráfico indican que la proteína PN-2 de ratón promueve la adhesión de células THP-1 e induce diferenciación en macrófagos, mientras que un anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata inhibe la adhesión de células THP-1 e inhibe la diferenciación en macrófagos.

25 Las figuras 4A y 4B son un gráfico e imágenes que muestran los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor de la hiperplasia de la neointima del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata en un modelo de lesión con balón de la arteria carótida de rata en el ejemplo 7.

30 La figura 5 es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor de la arteriosclerosis del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata en un modelo de ratón arteriosclerosis ApoE KO en el ejemplo 8.

La figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor de la inflamación de un anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano en un modelo de colitis de ratón en el ejemplo 9.

35 La figura 7A es un gráfico que muestra el momento de la administración de un anticuerpo en el ejemplo 10. La figura 7B es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor de la angiogénesis del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata en un modelo de arteriosclerosis ocliterante en el ejemplo 10.

40 La figura 8 es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor de la angiogénesis del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata en un modelo de arteriosclerosis ocliterante en el ejemplo 10.

La figura 9 es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor de la angiogénesis del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano en un modelo de arteriosclerosis ocliterante en el ejemplo 10.

45 Las figuras 10A y 10B son imágenes y un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor de la angiogénesis del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata y el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano en un modelo de angiogénesis Matrigel usando células endoteliales humanas en el ejemplo 11. En el gráfico, el término "simulado" indica un grupo de tratamiento simulado.

50 Las figuras 11A y 11B son imágenes y un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor de la angiogénesis del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata y el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano en un modelo de angiogénesis Matrigel usando células endoteliales humanas en el ejemplo 11. En el gráfico, el término "simulado" indica un grupo de tratamiento simulado.

55 La figura 12A es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre efecto inhibitor de la proliferación de células cancerosas del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata en células de cáncer de mama 4T1 de ratón en el ejemplo 12. La figura 12B es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto de inducción de necrosis del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano en células de cáncer de mama 4T1 de ratón en el ejemplo 11.

60 La figura 13A es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata usando ratones modelo de metástasis pulmonar de células de cáncer de mama 4T1 de ratón en el ejemplo 13 (inyección de células de cáncer de mama 4T1 de ratón, seguido por la medición del volumen de los tumores primarios en las extremidades inferiores tres semanas después de la inyección). La figura 13B es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata usando ratones modelo de metástasis pulmonar de células de cáncer de mama 4T1 de ratón en el ejemplo 13 (inyección de células de cáncer

de mama 4T1 de ratón, seguido por el recuento de colonias metastásicas cinco semanas después de la inyección).

La figura 14 es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano usando ratones modelo de metástasis pulmonar de células de cáncer de mama 4T1 de ratón en el ejemplo 13 (inyección de células de cáncer de mama 4T1 de ratón, seguido por el recuento de colonias metastásicas cinco semanas después de la inyección).

La figura 15A es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata usando ratones modelo de metástasis pulmonar de células B16-F10 de melanoma de ratón en el ejemplo 14 (inyección de células de melanoma de ratón, seguido por la medición del volumen de los tumores primarios tres semanas después de la inyección). La figura 15B es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata usando ratones modelo de metástasis pulmonar de células B16-F10 de melanoma de ratón en el ejemplo 14 (inyección de células de melanoma de ratón, seguido por el recuento de colonias metastásicas cinco semanas después de la inyección).

La figura 16 es un gráfico que muestra los resultados del estudio sobre el efecto inhibitor del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano sobre la expansión del diámetro de la aorta en un modelo de aneurisma en el ejemplo 15.

Descripción de realizaciones

Una realización de la presente invención proporciona un anticuerpo contra una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular. La periostina es una de las proteínas de la matriz extracelular y se conocen varias variantes de corte y empalme de periostina. Algunas de las variantes de corte y empalme de periostina se expresan específicamente en estados de cáncer, etc. En general, los anticuerpos son altamente específicos, son seguros para los seres humanos y tienen otras ventajas, y por lo tanto, en la presente invención, un anticuerpo puede usarse como una sustancia para la inhibición (es decir, un inhibidor de fármacos) contra las funciones de las variantes de empalme de periostina específicamente expresadas en cáncer condiciones, etc. En la presente invención, puede producirse un anticuerpo usando, como antígeno, un péptido químicamente sintetizado que consiste en la secuencia de aminoácidos codificada por el exón-21 en el dominio C-terminal de la cual se derivan variantes de corte y empalme específicas para estados cancerosos y similares. Sin embargo, un péptido de este tipo también puede producirse por digestión enzimática de proteínas periostina o por técnicas de ingeniería genética, y el origen no está particularmente limitado.

El término "que tiene actividad de adhesión celular" en el presente documento significa la posesión de actividad promotora de la adhesión celular. Una investigación para determinar si una proteína tiene actividad de adhesión celular puede realizarse tal como sigue. Se coloca una muestra de 10 $\mu\text{g/ml}$ en una placa de Petri para permitir que una proteína se adhiera a la superficie durante la noche. Entonces se añaden células cultivadas, tales como fibroblastos cardíacos, a la placa. De tres a seis horas más tarde, la placa se lava y se eliminan las células desprendidas. Las células restantes están teñidas. Se examina el estado de las células adherentes restantes.

En la presente invención, la isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular no está particularmente limitada, pero se prefiere una isoforma de periostina que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (periostina de rata PN-2, 811 aminoácidos), una isoforma de periostina que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (periostina de ratón PN-2, 811 aminoácidos), una isoforma de periostina que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (periostina humana PN-2, 809 aminoácidos), que se predice fácilmente que tiene actividad de adhesión dado que la secuencia de aminoácidos de la periostina humana es casi idéntica a la de las periostinas de ratón y rata, una variante de corte y empalme de periostina que tiene los aminoácidos que constituyen el péptido codificante del exón-21 pero que carece de los aminoácidos que constituyen el péptido codificante del exón-17, etc.

Las isoformas de periostina que tienen actividad de adhesión celular incluyen isoformas de periostina que tienen una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (28 aminoácidos codificados por el exón-21 de periostina de rata), SEQ ID NO: 17 (28 aminoácidos codificados por el exón-21 de periostina de ratón) o SEQ ID NO: 18 (28 aminoácidos codificados por el exón-21 de periostina humana).

Las isoformas de periostina que pueden servir como epítipo para un anticuerpo incluyen una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (6 aminoácidos en las posiciones 2 a 7 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos codificada por el exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18)), una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (7 aminoácidos en las posiciones 17 a 23 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos codificada por el exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18)), una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (5 aminoácidos en las posiciones 3 a 7 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos codificada por el exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18)), una isoforma de periostina que tiene una secuencia de 8 aminoácidos de SEQ ID NO: 22 que consiste en 2 aminoácidos en las posiciones 27 y 28 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos codificada por el exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18) y los 6 aminoácidos posteriores, etc.

Las regiones responsables de la actividad de adhesión celular de la periostina incluyen, por ejemplo, el exón-21. Los ejemplos específicos de las regiones incluyen los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 que representa una porción de una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (los aminoácidos en las posiciones 758 a 785 de SEQ ID NO: 3), los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 que representa una porción de una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (los aminoácidos en las posiciones 758 a 785 de SEQ ID NO: 9), los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 que representa una porción de una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (los aminoácidos en las posiciones 756 a 783 de SEQ ID NO: 13), etc.

En una realización preferida de la presente invención, la frase “reconoce específicamente un sitio implicado en la adhesión celular” significa reconocer específicamente una región relacionada con la adhesión celular preferiblemente de una isoforma de periostina que contiene el exón-21. Los anticuerpos preferidos que reconocen específicamente un sitio implicado en la actividad de adhesión celular de una isoforma de periostina incluyen, por ejemplo, anticuerpos contra los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 que representa una porción de una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (los aminoácidos en las posiciones 758 a 785 de SEQ ID NO: 3), los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 que representa una porción de una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (los aminoácidos en las posiciones 758 a 785 de SEQ ID NO: 9), los residuos de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 que representa una porción de una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (los aminoácidos en las posiciones 756 a 783 de SEQ ID NO: 13), o parte de cualquiera de los residuos de aminoácidos. Los ejemplos adicionales de los anticuerpos incluyen anticuerpos contra un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o 20, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21, o parte de las secuencias de aminoácidos.

La frase “inhibe una región implicada en la actividad de adhesión celular de la periostina” significa la inhibición del efecto o la actividad de la “región implicada en la actividad de adhesión celular de la periostina” descrita anteriormente. En particular, por ejemplo, la frase significa la inhibición del efecto o la actividad de la periostina usando el anticuerpo descrito anteriormente que reconoce específicamente un sitio implicado en la actividad de adhesión celular.

En una realización, el anticuerpo de la presente invención incluye un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal producido usando cualquiera de los antígenos descritos anteriormente. El término “anticuerpo monoclonal” en el presente documento se refiere a cualquier anticuerpo monoclonal reactivo contra cualquiera de los antígenos descritos anteriormente. El “anticuerpo monoclonal” incluye anticuerpos naturales producidos inmunizando mamíferos tales como ratones, ratas, hámsteres, cobayas y conejos con cualquiera de los antígenos; anticuerpos que pueden producirse usando técnicas de recombinación genética, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos (anticuerpos quiméricos) y anticuerpos monoclonales humanizados (anticuerpos humanizados, es decir, anticuerpos con injerto de CDR); y anticuerpos monoclonales humanos (anticuerpos humanos) que pueden producirse usando animales transgénicos productores de anticuerpos humanos o similares. El anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos monoclonales de cualquier isotipo, tales como IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA, IgD e IgE. El anticuerpo de la presente invención es preferiblemente IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) o IgM.

Cuando cualquiera de los péptidos descritos anteriormente va a usarse como antígeno, el péptido puede usarse solo como antígeno. Alternativamente, para aumentar su antigenicidad, el péptido puede adsorberse a un material macromolecular tal como polivinilpirrolidona, látex y poli(metacrilato de metilo) y usarse para su inmunización, o puede conjugarse con una proteína portadora tal como KLH (hemocianina de lapa californiana) y BSA (albúmina sérica bovina), y puede usarse cualquier método para aumentar la antigenicidad. Por lo general, el péptido se conjuga preferiblemente con una proteína portadora por métodos conocidos (por ejemplo, véase “Zoku Iyakuin no Kaihatsu, vol. 14, Hirokawa-Soten Ltd., 1991”).

Para la conjugación direccional del péptido con una proteína portadora, se añade un residuo de cisteína al extremo C- o N-terminal del péptido, y por medio del residuo de cisteína, el péptido se conjuga con la proteína portadora. Siempre que se logre la conjugación adecuada para este propósito, puede usarse cualquier agente de reticulación comúnmente usado en la técnica. Los agentes de reticulación adecuados incluyen ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo) (a continuación en el presente documento abreviado como “SMCC”), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-maleimidobenzoico (MBS), etc. El anticuerpo monoclonal se produce generando un hibridoma por el método de fusión celular de Kohler y Milstein (G. Kohler *et al* Nature (1975) 256, 495-7), cultivando el hibridoma para permitir que el hibridoma secrete un anticuerpo y aislando el anticuerpo del cultivo. En particular, un mamífero se inmuniza con un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por el exón-21 o similar y entonces las células productoras de anticuerpos del animal se fusionan con células de mieloma para generar un hibridoma. El examen para detectar un hibridoma que produce un anticuerpo que se une al exón-21 se realiza mediante, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (a continuación en el presente documento abreviado como “ELISA”) sobre el sobrenadante del hibridoma usando una microplaca sobre la que se ha inmovilizado el antígeno.

El animal que va a inmunizarse no está particularmente limitado, e incluye diversos mamíferos tales como ratones, ratas, cobayas, conejos, ovejas, cabras, gatos, perros, etc. De los animales enumerados para la inmunización, se usan generalmente ratones Balb/c para la producción de anticuerpos monoclonales debido a la facilidad de manejo u otras ventajas, pero también pueden usarse otras variedades de ratones. La concentración del antígeno usado para la

inmunización se determina de modo que se produzca una cantidad suficiente de linfocitos estimulados antigénicamente. Preferiblemente, se diluyen de 1 a 100 μg de antígeno hasta una concentración apropiada en solución salina fisiológica o similar, se suspenden en adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund o similares, y se administran a un animal por inyección intraperitoneal o subcutánea u otros medios. La administración se realiza de una vez a varias veces en intervalos de 2 a 4 semanas. La inmunización final se realiza normalmente administrando una disolución de 1 a 100 μg del antígeno en solución salina fisiológica mediante inyección intravenosa o subcutánea u otros medios. Varios días después de la inmunización final, se recogen células productoras de anticuerpos tales como linfocitos, preferiblemente células del bazo o células de los ganglios linfáticos del animal inmunizado para la fusión celular.

A continuación se explicará la fusión celular usando células del bazo como células productoras de anticuerpos, pero también pueden usarse células productoras de anticuerpos distintas de las células del bazo para la fusión celular. Se fusionan células del bazo preparado de manera aséptica de 3 a 4 días después de la inmunización final con células de mieloma apropiadas en presencia de un promotor de la fusión. Las células de mieloma usadas para la fusión pueden ser células de mieloma siempre que se deriven de mamíferos, pero generalmente se prefieren aquellas derivadas de la misma especie que el animal usado para la inmunización. Ya se conocen diversas líneas celulares. Por ejemplo, líneas celulares preferidas usadas para ratones son SP2/0-Ag14 (SP2) [Nature, 276, 269 (1978)], NS-1-Ag4/1 (NS-1), P3-X63Ag8U.1 (P3U1) [Curr. Top. Microbiol. Immunol. 81, 1-7 (1978), disponibles de la ATCC con el n.º de la ATCC CRL-1597], P3-NS1-1-Ag4-1, P3-X63Ag8 (P3), FO, X63Ag8.653 (X63.653), 210.RCY3.Ag1.2.3, S194/5XXO.BUI, SKO-007, GM15006TG-A12, etc. Líneas celulares preferidas usadas para ratas son Y3.Ag1.2.3, etc. Los promotores de la fusión preferidos incluyen polietilenglicol (PEG) que tiene un peso molecular de 1.000 a 6.000 y virus Sendai. Generalmente, la proporción de células del bazo y células de mieloma para la fusión celular es preferiblemente de 10:1 a 2:1.

Los hibridomas pueden separarse de las células fusionadas cultivando una mezcla de células del bazo no fusionadas, células de mieloma no fusionadas y células fusionadas en un medio selectivo que inhibe la supervivencia de las células de mieloma no fusionadas durante un período de tiempo apropiado hasta que las células no fusionadas mueran (aproximadamente 1 semana). El medio selectivo puede ser, por ejemplo, medio HAT (un medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). En este medio selectivo, las células de mieloma no fusionadas mueren, y las células no tumorales, es decir, las células del bazo no fusionadas mueren después de un cierto período de tiempo (después de aproximadamente 1 semana), como resultado de lo cual se seleccionan hibridomas como células viables. Los hibridomas pueden someterse a dilución limitante convencional para el examen para seleccionar una cepa que produce el anticuerpo deseado y para la clonación de la cepa. El hibridoma así obtenido que produce un anticuerpo monoclonal de la presente invención puede hacerse crecer en medio adecuado para el crecimiento y puede almacenarse fácilmente en un congelador profundo o nitrógeno líquido durante un largo período de tiempo.

El hibridoma así obtenido puede hacerse crecer en medio nutriente o en la cavidad abdominal de un mamífero para la producción de anticuerpos. Los anticuerpos producidos pueden purificarse a partir del sobrenadante de cultivo o de la ascitis o el suero del mamífero.

Como hibridoma de la presente invención, puede usarse un hibridoma que se depositó internacionalmente ante la Incorporated Administrative Agency, National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary (NPMD) fecha de depósito: 26 de febrero de 2013, n.º de registro: NITE BP-01546, referencia de identificación: KS-0259#8, 080611 Kohjin Bio).

La purificación de los anticuerpos puede realizarse por métodos convencionales de aislamiento/purificación tales como centrifugación, diálisis, precipitación con sales con sulfato de amonio o similares, cromatografía de intercambio iónico usando una columna de DEAE o similar, filtración en gel, cromatografía de afinidad, etc.

La determinación de isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal así obtenido puede realizarse mediante un método de identificación tal como el método de Ouchterlony, ELISA y RIA. El método de Ouchterlony es conveniente, pero requiere la condensación del anticuerpo monoclonal cuando la concentración es baja. Cuando se usa ELISA o RIA, el isotipo y subclase del anticuerpo monoclonal pueden identificarse por reacción directa del sobrenadante de cultivo con una fase sólida con antígeno absorbido, seguido por reacción con anticuerpos contra diferentes isotipos de inmunoglobulina y subclases como anticuerpos secundarios. Más convenientemente, pueden usarse kits de identificación disponibles comercialmente (por ejemplo, el kit Mouse Typer (Bio-Rad)) o similares. La cuantificación de proteínas puede realizarse por el método de Folin-Lowry o por cálculo a partir de la absorbancia a 280 nm [$\text{DO}_{280} = 1 \text{ mg/ml de inmunoglobulina}$].

El anticuerpo monoclonal así obtenido de la presente invención reconoce específicamente una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 13 (PN-2); una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18; una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o 20; un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18; o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o 20. Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal de la presente invención reconoce y se une específicamente a un péptido (SEQ ID NO: 19) que consiste en los residuos de aminoácidos desde valina

(V) en la posición 2 hasta lisina (K) en la posición 7 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18), y un péptido (SEQ ID NO: 20) que consiste en los residuos de aminoácidos desde fenilalanina (F) en la posición 17 hasta lisina (K) en la posición 23 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18). Es decir, el anticuerpo monoclonal de la presente invención reconoce específicamente la secuencia de aminoácidos VTKVTK (SEQ ID NO: 19) que consiste en los residuos de aminoácidos desde la valina en la posición 2 hasta la lisina en la posición 7 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18), la secuencia de aminoácidos FEDEEIK (SEQ ID NO: 20) que consiste en los residuos de aminoácidos desde fenilalanina (F) en la posición 17 hasta lisina (K) en la posición 23 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18), o parte de las secuencias de aminoácidos.

El anticuerpo monoclonal de la presente invención inhibe o previene las propiedades de adhesión celular de la proteína periostina-1 humana, es decir, el anticuerpo monoclonal tiene la actividad de neutralizar las propiedades de adhesión celular de la proteína periostina-1 humana. El anticuerpo monoclonal de la presente invención también inhibe la invasión, las inflamaciones y la angiogénesis en estados cancerosos o similares, y previene o trata enfermedades asociadas a la inflamación.

Cuando se usa un anticuerpo policlonal como anticuerpo de la presente invención, el anticuerpo policlonal puede producirse mediante métodos convencionales tales como el descrito en "Shin Seikagaku Jikken Koza, vol. 12, editado por la Japanese Biochemical Society, Tokyo Kagaku Dozin Co. Ltd., 1992".

El animal que va a inmunizarse no está particularmente limitado, e incluye caballos, cabras, ovejas, conejos, cobayas, ratones, pollos, etc. Cuando va a inmunizarse un conejo, se diluye un antígeno hasta una concentración apropiada en solución salina fisiológica o similar y se suspende en adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, adyuvante de hidróxido de aluminio, o similares, y se inyecta a una dosis de 10 a 1.000 μg /animal por inyección, seguido por 1 a 3 inyecciones de refuerzo 2 a 4 semanas después de la inmunización para administrar los antiseros. Se prefiere la inyección subcutánea en múltiples sitios. La preparación de anticuerpos policlonales a partir de antiseros puede realizarse de la misma manera que la descrita para la purificación del anticuerpo monoclonal.

El anticuerpo policlonal así obtenido de la presente invención reconoce específicamente una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 13 (PN-2); una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18; una isoforma de periostina que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o 20; un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18; o un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o 20. Preferiblemente, el anticuerpo policlonal de la presente invención reconoce y se une específicamente a un péptido (SEQ ID NO: 19) que consiste en los residuos de aminoácidos desde la lisina (K) en la posición 7 hasta la glicina (G) en la posición 11 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18), y un péptido (SEQ ID NO: 20) que consiste en los residuos de aminoácidos desde la lisina (K) en la posición 23 hasta la leucina (L) en la posición 26 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18). El anticuerpo policlonal del presente invención reconoce específicamente la secuencia de aminoácidos TKVTK (SEQ ID NO: 21) que consiste en los residuos de aminoácidos desde la posición 3 hasta la posición 7 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18), la secuencia de aminoácidos QGDTPVRK (SEQ ID NO: 22) que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones 27 y 28 desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18) y los 6 aminoácidos posteriores, o parte de las secuencias de aminoácidos.

El anticuerpo policlonal de la presente invención inhibe o previene las propiedades de adhesión celular de la proteína periostina-1 humana, es decir, el anticuerpo policlonal tiene la actividad de neutralizar las propiedades de adhesión celular de la proteína periostina-1 humana. El anticuerpo policlonal de la presente invención también inhibe la invasión, las inflamaciones y la angiogénesis en estados cancerosos o similares, y previene o trata enfermedades asociadas a inflamación.

La presente invención también proporciona una composición para inhibir la hiperplasia de la íntima vascular, tratar un cáncer o inhibir la angiogénesis, comprendiendo la composición un anticuerpo anti-periostina que reconoce una variante de corte y empalme de periostina que tiene propiedades de adhesión celular.

Producción de anticuerpos humanizados

La inmunoglobulina G (a continuación en el presente documento simplemente denominada "IgG") consiste en dos cadenas polipeptídicas ligeras que tienen un peso molecular de aproximadamente 23.000 (a continuación en el presente documento denominadas "cadenas ligeras") y dos cadenas polipeptídicas pesadas que tienen un peso molecular de aproximadamente 50.000 (a continuación en el presente documento denominadas "cadenas pesadas"). Las cadenas pesadas y ligeras tienen ambas unidades de repetición de una secuencia de aminoácidos conservada

de aproximadamente 110 residuos, y estas unidades son los elementos básicos de la estructura tridimensional de IgG (a continuación en el presente documento denominados "dominios"). Las cadenas pesadas y ligeras consisten en 4 y 2 dominios sucesivos, respectivamente. Los dominios amino-terminales de las cadenas pesadas y ligeras son más variables en la secuencia de aminoácidos entre moléculas de anticuerpos que otros dominios y, por tanto, los dominios amino-terminales se denominan dominios variables (a continuación en el presente documento denominados "dominios V"). En cada dominio amino-terminal de IgG, el dominio V de la cadena pesada y el dominio V de la cadena ligera se asocian complementariamente para formar una región variable. Los dominios restantes forman colectivamente una región constante. La secuencia de la región constante es divergente entre especies animales. Por ejemplo, la región constante de la IgG de ratón difiere de la región constante de la IgG humana y, por tanto, la IgG de ratón se reconoce como un cuerpo extraño por el sistema inmunitario humano, dando como resultado una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (a continuación en el presente documento denominada "HAMA") (Schroff RW. *et al.* Cancer Res. (1985) 45, 879-85). Los anticuerpos de ratón por tanto no pueden administrarse repetidamente a los seres humanos. Con el fin de administrar tales anticuerpos a los seres humanos, las moléculas de anticuerpos deben modificarse para prevenir una respuesta de HAMA manteniendo al mismo tiempo la especificidad de los anticuerpos.

Según los resultados del análisis estructural de cristales de rayos X, los dominios están generalmente en forma de una estructura cilíndrica larga constituida por un apilamiento de dos láminas beta antiparalelas que consisten en 3 a 5 cadenas beta. En cuanto a la región variable, se ensamblan tres bucles para formar un sitio de unión a antígeno en cada uno de los dominios V de las cadenas pesadas y ligeras. Estos bucles se denominan regiones determinantes de complementariedad (a continuación en el presente documento denominadas "CDR"), que son las más variables en la secuencia de aminoácidos. Las partes restantes de la región variable distintas de las CDR sirven para mantener las estructuras de las CDR y se denominan "región de marco". Kabatt *et al.* recogieron un gran número de las secuencias primarias de regiones variables de cadena pesada y ligera, y proporcionaron una tabla en la que las secuencias primarias se clasificaban en CDR y regiones de marco basándose en la conservación de secuencias (Kabatt *et al.* SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª edición, publicación de los NIH, n.º 91-3242, E.A.).

Las regiones de marco se clasificaron además en una pluralidad de subgrupos basándose en patrones compartidos de secuencias de aminoácidos. También se encontró la existencia de una región de marco de consenso entre el ser humano y el ratón. Tales estudios sobre los rasgos estructurales de IgG condujeron al desarrollo de los métodos para producir anticuerpos humanizados que se describen a continuación. En una fase temprana de los estudios, se propusieron anticuerpos quiméricos que tenían una región variable de un anticuerpo de ratón fusionada a una región constante de un anticuerpo humano (Morrison SL. *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. (1984) 81, 6851-5). Sin embargo, dado que tales anticuerpos quiméricos todavía contienen muchos residuos de aminoácidos no humanos, los anticuerpos pueden inducir una respuesta de HAMA, especialmente cuando se administran a largo plazo (Begent *et al.*, Br. J. Cancer, (1990) 62, 487).

Se propuso un método para reducir además los residuos de aminoácidos derivados de un mamífero no humano que pueden inducir una respuesta de HAMA en seres humanos, y el método implicaba injertar únicamente las CDR en un anticuerpo humano (Peter T *et al.* Nature, (1986) 321, 522-5). Sin embargo, el injerto de solo las CDR era normalmente insuficiente para presentar actividad de inmunoglobulina contra un antígeno. En 1987, Chothia *et al.* usaron datos de análisis estructural de cristales de rayos X para encontrar lo siguiente: (a) las secuencias de aminoácidos de las CDR contienen los sitios que se unen directamente a un antígeno y los sitios que mantienen las estructuras de las CDR, y las posibles estructuras tridimensionales de las CDR se clasifican en varios patrones típicos (estructuras canónicas); y (b) las clases de estructuras canónicas están determinadas no solo por las CDR sino también por los tipos de los aminoácidos ubicados en posiciones específicas de la región de marco (Chothia C. *et al.* J. Mol. Biol. (1987) 196, 901-17). Estos hallazgos sugirieron que, cuando se realiza el injerto de CDR, parte de los residuos de aminoácidos en la región de marco también deben injertarse en un anticuerpo humano además de las secuencias de CDR (documento JP 4-502408 T).

Un anticuerpo de mamífero no humano que tiene una(s) CDR que va(n) a injertarse en un anticuerpo humano se define en general como "donador", y el anticuerpo humano en el que va(n) a injertarse la(s) CDR se define como "aceptor". En el injerto de CDR, la(s) estructura(s) de la(s) CDR debe(n) conservarse tanto como sea posible para garantizar la retención de la actividad de la molécula de inmunoglobulina. Para lograr esto, los puntos clave a tener en cuenta son: (a) de qué subgrupo debe seleccionarse el aceptador, y (b) qué residuos de aminoácidos deben seleccionarse de la región de marco donadora.

Queen *et al.* propusieron un método para diseñar un anticuerpo humanizado, que implicaba injertar los residuos de aminoácidos de una región de marco donadora junto con las secuencias de CDR en un aceptor, con la condición de que los residuos de aminoácidos de la región de marco donadora satisfagan al menos uno de los siguientes criterios (documento JP 4-502408 T):

(a) los aminoácidos que van a sustituirse son poco comunes para sus posiciones en la región de marco aceptora, y los aminoácidos correspondientes del donador son comunes para sus posiciones en la región de marco aceptora;

(b) los aminoácidos son inmediatamente adyacentes a una de las CDR; y

(c) se predice que los aminoácidos tienen un átomo de cadena lateral dentro de aproximadamente 3 angstroms de las CDR en un modelo de inmunoglobulina tridimensional y que son capaces de interactuar con un antígeno o con las CDR del anticuerpo humanizado.

5 El ADN que codifica para la cadena pesada o ligera de un anticuerpo monoclonal anti-exón-21 de la presente invención puede producirse mediante la preparación de ARNm a partir de células de hibridoma que producen el anticuerpo monoclonal anti-exón-21, convirtiendo el ARNm en ADNc con una transcriptasa inversa y aislando el ADN que codifica para la cadena pesada o ligera del anticuerpo.

10 Producción de anticuerpos humanos

El término "anticuerpo humano" o "inmunoglobulina humana" en el presente documento significa una inmunoglobulina en la que sus regiones constituyentes, incluidas las regiones variables de cadena pesada (VH) y las regiones constantes de cadena pesada (CH), así como las regiones variables de cadena ligera (VL) y las regiones constantes de cadena ligera (CL), se derivan todas de un gen que codifica para una inmunoglobulina humana. En otras palabras, el término significa un anticuerpo en el que las cadenas pesadas se derivan de un gen de cadena pesada de inmunoglobulina humana y las cadenas ligeras se derivan de un gen de cadena ligera de inmunoglobulina humana.

20 Un anticuerpo humano puede producirse por métodos convencionales. Por ejemplo, al menos un gen de inmunoglobulina humana se integra en un locus del gen de un mamífero no humano tal como un ratón para generar un animal transgénico, y el animal transgénico se inmuniza con un antígeno, seguido por los mismos procedimientos descritos anteriormente para la producción de anticuerpos monoclonales. Pueden generarse ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos, por ejemplo, por los métodos descritos en documentos anteriores (Mendez MJ *et al.* Nature Genetics (1997) 15, 146-56; Green LL *et al.* Nature Genetics (1994) 7, 13-21; documento JP 4-504365 T; documento WO 94/25585; Nikkei Science, June, pp. 40-50, 1995; Nils Lonberg *et al.* Nature (1994) 368, 856-9; y documento JP 6-500233 T).

El anticuerpo usado en la presente invención no se limita a la molécula de anticuerpo completa y puede ser un fragmento o derivado de anticuerpo siempre que el fragmento o derivado neutralice la actividad de una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular.

El fragmento de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un Fab, un F(ab')₂, Fv, un anticuerpo de cadena sencilla (scFv), un anticuerpo estabilizado por disulfuro (dsFv), un péptido que contiene CDR, o similares.

35 El fragmento de anticuerpo Fab, F(ab')₂, o similar de la presente invención puede producirse tratando un anticuerpo que inhibe la actividad de adhesión celular de periostina con una proteasa tal como papaína o pepsina o, alternativamente, puede producirse construyendo un gen que codifica para el fragmento de anticuerpo e introduciendo el constructo en un vector de expresión, seguido por la expresión en una célula huésped apropiada.

40 El fragmento de anticuerpo scFv de la presente invención puede producirse uniendo una región V de cadena H con una región V de cadena L de un anticuerpo que inhibe la actividad de adhesión celular de periostina por medio de un ligador peptídico apropiado, etc. Alternativamente, el scFv puede producirse construyendo segmentos de ADN que codifican las secuencias completas o secuencias de aminoácidos deseadas de genes que codifican la cadena H o la región V de cadena H y que codifican la cadena L o la región V de cadena L del anticuerpo, e introducen los constructos en un vector de expresión, seguido por expresión en una célula huésped apropiada.

El fragmento de anticuerpo dsFv de la presente invención es un fragmento de anticuerpo producido preparando la región V de cadena H y la región V de cadena L de un anticuerpo que inhibe la actividad de adhesión celular de periostina, sometiendo las regiones a sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de cisteína para dar dos polipéptidos modificados y uniendo los polipéptidos entre los residuos de cisteína mediante una unión disulfuro. El residuo de aminoácido que va a sustituirse por un residuo de cisteína puede seleccionarse usando predicción de la estructura proteica del anticuerpo. Alternativamente, el dsFv puede producirse construyendo un segmento de ADN que codifica para la secuencia completa o la secuencia de aminoácidos deseada de un gen que codifica el fragmento de anticuerpo, e introduciendo el constructo en un vector de expresión, seguido por expresión en una célula huésped apropiada.

El fragmento de anticuerpo de péptido que contiene CDR de la presente invención se produce de modo que comprenden al menos una o más regiones CDR seleccionadas de las regiones CDR en las cadenas H o L de un anticuerpo que inhibe la actividad de adhesión celular de periostina. Alternativamente, varias regiones CDR pueden unirse por técnicas usando un ligador peptídico apropiado o similares. El péptido que contiene CDR también puede producirse construyendo un segmento de ADN que codifica toda la secuencia o secuencia de aminoácidos deseada de un gen que codifica el péptido, e introduciendo el constructo en un vector de expresión, seguido por expresión en una célula huésped apropiada. Alternativamente, el péptido que contiene CDR también puede producirse mediante síntesis química tal como el método de Fmoc o tBoc.

En la presente invención, también puede usarse un derivado que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo

anterior unido a una proteína o a un compuesto de bajo peso molecular. Tal modificación puede lograrse por técnicas conocidas.

5 Un ADN que codifica el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o su derivado unido a proteína de la presente invención puede determinarse por un método convencional. El ADN puede usarse para producir un vector recombinante que contiene el ADN por un método convencional, y el vector recombinante puede introducirse en una célula huésped por un método convencional para dar un transformante. El transformante puede cultivarse por un método convencional para producir el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o su derivado unido a proteína en el cultivo. A partir del cultivo, pueden recogerse el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo o su derivado unido a proteína. De esta manera, pueden producirse el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y su derivado unido a proteína.

10 En una realización de la presente invención, el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo de la presente invención se usa para prevenir o tratar enfermedades asociadas a inflamación en las que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, tal como se especifica en la reivindicaciones adjuntas.

15 Mientras que el término "enfermedades asociadas a inflamación en las que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular" se refiere a enfermedades durante las que el gen de una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular está altamente expresado y durante las que la producción de la isoforma de proteína codificada por el gen está aumentada, y aunque el término también se refiere a enfermedades cuya patología se ve agravada por un aumento en la expresión génica o proteica, la presente invención se refiere a las enfermedades enumeradas en las reivindicaciones adjuntas.

20 Las enfermedades asociadas a inflamación en las que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular incluyen enfermedades cuya causa principal es hiperplasia de la íntima vascular, cánceres y otras enfermedades asociadas a inflamación. Los ejemplos de las enfermedades cuya causa principal es hiperplasia de la íntima vascular incluyen arteriosclerosis, reestenosis provocada principalmente por hiperplasia de la íntima vascular observada después de angioplastia coronaria, etc. Los cánceres a los que puede aplicarse el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo de la presente invención incluyen cáncer de mama, melanoma, cáncer de pulmón. Otras enfermedades asociadas a inflamación incluyen dermatitis atópica, asma, esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enterocolitis inflamatoria, arteriosclerosis, osteoartritis, retinopatía diabética, periodontosis, aneurisma, etc. La angiogénesis está implicada en muchas de las enfermedades asociadas a inflamación anteriores.

25 También se da a conocer en el presente documento pero no está comprendido en las reivindicaciones un reactivo de diagnóstico para enfermedades asociadas a inflamación en las que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, produciéndose el reactivo de diagnóstico marcando cualquiera de los anticuerpos anteriores con un marcador. El marcador no está particularmente limitado y ejemplos del mismo incluyen enzimas, radioisótopos, colorantes fluorescentes, etc. Las enzimas usadas en el presente documento no están particularmente limitadas siempre que satisfagan ciertas condiciones, tales como tener un alto número de recambio, permanecer estables incluso después de la conjugación y reaccionar específicamente con sus sustratos para desarrollar color, etc. Pueden usarse enzimas usadas en inmunoensayo enzimático convencional (EIA). Los ejemplos de enzimas preferidas incluyen peroxidasa, β -galactosidasas, fosfatasa alcalinas, glucosa oxidasa, acetilcolina esterasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, malato deshidrogenasa, etc. También pueden usarse inhibidores enzimáticos y coenzimas, etc.

35 La conjugación de la enzima y el anticuerpo puede realizarse por un método conocido usando un agente de reticulación conocido tal como compuestos de maleimida. Los sustratos que pueden usarse son sustancias conocidas seleccionadas dependiendo de la enzima usada. Por ejemplo, cuando la enzima usada es una peroxidasa, puede usarse 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. Cuando la enzima usada es una fosfatasa alcalina, puede usarse paranitrofenol o similares. Los radioisótopos que pueden usarse como marcador incluyen los usados en radioinmunoensayos convencionales (RIA) tales como ^{125}I y ^3H . Los colorantes fluorescentes que pueden usarse son los usados en fluoroinmunoensayo convencional, tales como isotiocianato de fluorescencia (FITC) e isotiocianato de tetrametilrodamina (TRTC). El presente reactivo de diagnóstico también puede usarse para tinciones inmunohistológicas que tiñen específicamente células cancerosas y los fibroblastos circundantes. Cuando el reactivo de diagnóstico está marcado con un radioisótopo, el reactivo de diagnóstico también puede administrarse internamente para obtener imágenes de lesiones cancerosas, etc.

40 También se da a conocer en el presente documento pero no está comprendido en las reivindicaciones un método para detectar o cuantificar una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular en una muestra biológica, es decir, suero, preparado a partir de sangre humana o animal, usando el método el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo de la presente invención. También se da a conocer en el presente documento pero no está comprendido en las reivindicaciones un método de diagnóstico de una enfermedad asociada a inflamación (por ejemplo, insuficiencia cardíaca, etc.) en la que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, comprendiendo el método detectar o cuantificar la isoforma de periostina. En los métodos dados a conocer en el presente documento, puede detectarse una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular mediante el denominado ELISA de tipo sándwich (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas).

Se usa un kit de diagnóstico de la presente invención tal como sigue. Un anticuerpo primario anti-periostina se inmoviliza sobre una placa, se pone en contacto una muestra con la placa para formar un complejo con el anticuerpo primario, luego se permite que un anticuerpo secundario anti-periostina marcado con un marcador se una al complejo, y la intensidad de la señal del marcador en el complejo ternario se mide para detectar y cuantificar una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular. Dado que una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular es una variante de corte y empalme que se expresa específicamente en condiciones tales como cánceres, la monitorización de la producción de la isoforma de periostina puede usarse para diagnosticar estados tales como cánceres.

5 Tal como se describió anteriormente, el anticuerpo de la presente invención puede ser marcarse y usarse como anticuerpo secundario.

También se da a conocer en el presente documento pero no está comprendida en las reivindicaciones una composición farmacéutica para inhibir una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, comprendiendo la composición el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo del presente invención como principio activo. Dado que el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado tiene una actividad inhibitoria sobre una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, la composición farmacéutica inhibe la angiogénesis, inhibe la hiperplasia de la íntima vascular, trata un cáncer y previene o trata el aneurisma. También se da a conocer en el presente documento pero no está comprendida en las reivindicaciones una composición para inhibir la hiperplasia de la íntima vascular, tratar un cáncer, inhibir la angiogénesis o prevenir o tratar el aneurisma, comprendiendo la composición un anticuerpo anti-periostina que reconoce una variante de corte y empalme de periostina que tiene propiedades de adhesión celular. La composición puede usarse para tratar y prevenir la reestenosis que está provocada principalmente por hiperplasia de la íntima vascular observada después de angioplastia coronaria, para prevenir o tratar un cáncer, para tratar o prevenir enfermedades acompañadas por angiogénesis y para prevenir o tratar el aneurisma.

También se da a conocer en el presente documento pero no está comprendida en las reivindicaciones una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, comprendiendo la composición el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de la presente invención como principio activo. Los ejemplos incluyen una composición farmacéutica para inhibir la hiperplasia de la íntima vascular, comprendiendo la composición el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo como principio activo; una composición farmacéutica para tratar un cáncer, comprendiendo la composición el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo como principio activo; una composición farmacéutica para inhibir la angiogénesis, comprendiendo la composición el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo como principio activo; una composición farmacéutica para prevenir o tratar el aneurisma, comprendiendo la composición el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo como principio activo; etc.

La composición para tratar un cáncer presenta los efectos de inhibir el crecimiento de focos cancerosos e inhibir la metástasis de un cáncer. La composición, por tanto, puede usarse con el propósito previsto de inhibir el crecimiento de focos de cáncer o de inhibir la metástasis de un cáncer, o ambos propósitos.

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo, el fragmento de anticuerpo y/o el derivado de anticuerpo de la presente invención como principio activo se prepara con el uso de aditivos conocidos farmacológicamente aceptables que se usan comúnmente en un método de preparación convencional, incluyendo un portador, un excipiente y otros aditivos.

El principio activo de la composición farmacéutica según la presente invención se administra preferiblemente en mezcla con un portador, excipiente, diluyente o similar farmacológicamente aceptable conocido por cualquier modo de administración comúnmente usado en el campo farmacéutico (por ejemplo, mediante administración oral o administración parenteral, tal como administración intravenosa, intramuscular y subcutánea). La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse, por ejemplo, mezclando el principio activo con un portador farmacológicamente aceptable, sabor, excipiente, estabilizador, diluyente, emulsionante, disolución, suspensión, jarabe, o similar, según sea necesario. La forma de dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada y los ejemplos de la misma incluyen comprimidos, polvos, gránulos, disoluciones, etc. Los aditivos que pueden incorporarse en comprimidos o similares incluyen, por ejemplo, aglutinantes tales como gelatina y lubricantes tales como almidón de maíz. La composición farmacéutica puede estar recubierta con un azúcar o una película gástrica o entérica. Cuando la forma de dosificación es una cápsula, la composición puede comprender además un portador de líquido. La composición puede formularse en una composición estéril inyectable con una fórmula farmacéutica convencional. Los vehículos acuosos inyectables incluyen disoluciones isotónicas que contienen glucosa, etc., y tales disoluciones isotónicas pueden usarse en combinación con un solubilizador apropiado, tal como polietilenglicol. La composición farmacéutica puede incorporarse con un tampón, un estabilizador, un conservante, un antioxidante, un agente calmante, o similares. Para administración oral, cuando es probable que el principio activo se descomponga en el tracto digestivo, la composición puede convertirse en una formulación resistente a la descomposición en el tracto digestivo (por ejemplo, microcápsulas de liposomas que encapsulan el principio activo) y luego administrarse por vía oral. También son posibles otros modos de administración

para la absorción a través de una membrana mucosa distinta del tracto digestivo, incluyendo las vías rectal, intranasal, sublingual y transpulmonar. En estos casos, la composición puede administrarse en forma de un supositorio, una gota nasal, un comprimido sublingual, un agente transpulmonar, o similares.

5 Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se usa para fines terapéuticos, la dosificación se determina para que sea terapéuticamente eficaz. La dosificación terapéuticamente eficaz varía, por ejemplo, con la edad, el peso corporal y la gravedad de los síntomas de un sujeto al que va a administrarse la composición, así como con la vía de administración. Por estos motivos, la dosificación se determina de forma individual. En general, la dosificación diaria para un adulto por administración oral es de aproximadamente 0,1 a 1.000 mg, y la dosificación se da como una sola dosis o de una a varias dosis divididas (dos veces, tres veces, etc.). Para la administración intravenosa continua, la composición puede administrarse a una dosificación de 0,01 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ a 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$, deseablemente de 0,025 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ a 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$.

15 Otras aplicaciones que se dan a conocer en el presente documento pero que no están comprendidas por las reivindicaciones proporcionan “un método para inhibir una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular usando un anticuerpo contra la isoforma de periostina”, “un método para prevenir o tratar una enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, comprendiendo el método administrar, a un paciente con cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-periostina que reconoce una variante de corte y empalme de periostina que tiene propiedades de adhesión celular”, etc. También se da a conocer en el presente documento pero no está comprendido en las reivindicaciones el “uso de un anticuerpo contra una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular para la producción de una composición farmacéutica para inhibir la isoforma de periostina”, “uso de un anticuerpo contra una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular para la producción de una composición farmacéutica para prevenir o tratar una enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada la isoforma de periostina”, etc. El anticuerpo anti-periostina incluye los anticuerpos descritos anteriormente, fragmentos de anticuerpo y/o derivados de anticuerpo. La enfermedad asociada a inflamación incluye las enfermedades asociadas a inflamación descritas anteriormente.

30 Ejemplos

La presente invención se describirá en más detalle con referencia a ejemplos, pero no se limita a los mismos. Pueden hacerse diversas modificaciones por un experto en la técnica, sin apartarse de la idea técnica de la presente divulgación.

35 Ejemplo de preparación 1: Búsqueda de periostina por sustracción 1-1 Establecimiento de ratas modelo patológicas de insuficiencia cardíaca y recogida de muestras del ventrículo izquierdo

Se criaron ratas macho Dahl sensibles a sal (Dahl-S) (Shimizu Laboratory Supplies Co., Ltd.) con una dieta alta en sal del 8% desde las 6 semanas de edad, y se recogieron los ventrículos izquierdos de tres animales en la fase de hipertrofia cardíaca (11 semanas de edad) y de tres animales en la fase de insuficiencia cardíaca (14 semanas de edad).

40 1-2 Preparación de ARNm

45 Se prepararon ARN totales a partir de aproximadamente 500 mg de cada ventrículo izquierdo usando ISOGEN (Nippon Gene) según las instrucciones del fabricante. Los ARN totales de los tres animales en la fase de hipertrofia cardíaca y los ARN totales de los tres animales en la fase de insuficiencia cardíaca se combinaron por separado. Se purificaron ARNm a partir de aproximadamente 400 μg de cada uno de los ARN totales combinados usando el kit Fast Track 2.0 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante para recuperar aproximadamente 3 μg de ARNm de cada fase.

50 1-3 Sustracción de ADNc

55 Se realizó la sustracción de ADNc usando el kit de sustracción de ADNc PCR-Select (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se sintetizaron ADNc a partir de 2 μg de cada ARNm obtenido en la sección 1-2 anterior y se digirieron con la enzima de restricción RsaI. El ADNc sintetizado a partir de los animales a las 14 semanas de edad se utilizó como ADNc probador y el ADNc sintetizado a partir de los animales a las 11 semanas de edad se utilizó como ADNc conductor. Para el ADNc probador, dos tipos de adaptadores incluidos en el kit se ligaron por separado. Se realizó la hibridación por sustracción. Entonces se realizó la PCR usando cebadores complementarios a los adaptadores para amplificar específicamente fragmentos de ADNc expresados de manera diferencial para dar producto de amplificación 1.

60 Se realizó otra operación de sustracción de la misma manera que antes, excepto porque el ADNc sintetizado a partir de los animales a las 11 semanas de edad se usó como ADNc probador y porque el ADNc sintetizado a partir de los animales a las 14 semanas de edad se usó como ADNc conductor para dar el producto de amplificación 2.

65

1-4 Examen de transferencia puntual

A. Preparación de transferencias puntuales

5 El producto de amplificación 1 se clonó TA en el vector PCR II (Invitrogen) y se seleccionaron clones con el fragmento de inserto. El fragmento de inserto de cada clon se amplificó por reacción PCR, y se trató térmicamente 1 μ l de cada producto amplificado, luego se sometió a transferencia puntual sobre dos filtros de membrana de nailon (Boehringer) y se fijó con un agente de reticulación de UV (Stratagene).

10 B. Preparación de sondas de ADNc

Se digirió el producto de amplificación 1 con las enzimas de restricción RsaI, EaeI y SmaI para extraer los adaptadores. Entonces se sometió el producto a marcaje de sensibilización al azar con DIG-dUTP usando el kit de marcaje y detección de ADN DIG High Prime II (Boehringer) según las instrucciones del fabricante para preparar la sonda de ADNc 1. De la misma manera, se preparó la sonda de ADNc 2 a partir del producto de amplificación 2.

C. Examen

20 Una de las membranas de transferencia puntual preparadas en la sección A anterior se hibridó con la sonda 1 de ADNc y la otra se hibridó con la sonda 2 de ADNc. Específicamente, la hibridación se realizó en una disolución de hibridación (disolución DIG Easy Hyb) a 42°C durante la noche usando el kit de marcaje y detección de ADN DIG High Prime II (Boehringer) según las instrucciones del fabricante. Se lavaron las membranas dos veces con 2 X SSC y SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego dos veces con 0,1 X SSC y SDS al 0,1% a 68°C durante 15 minutos. Entonces se hicieron reaccionar las membranas con el anticuerpo frente a DIG conjugado con fosfatasa alcalina en el tampón de bloqueo incluido en el kit. Se añadió un sustrato de quimioluminiscencia (CSPD listo para usar) para permitir que avanzara la reacción quimioluminiscente. Se expusieron las membranas a películas de rayos X. Los clones que mostraban una señal más fuerte con la sonda de ADNc 1 que con la sonda de ADNc 2 se seleccionaron como clones positivos y se secuenciaron.

30 1-5 Secuenciación

Las secuencias de nucleótidos se determinaron mediante análisis en un secuenciador de ADN automatizado, modelo 373A (PE Applied Biosystems), usando un kit de secuenciación de terminador de colorante (nombre comercial: Kit de secuenciación de ciclo de terminador de colorante Thermo Sequenase™ II (Amersham Pharmacia)). Las secuencias genéticas obtenidas se compararon con secuencias disponibles en el banco de datos de GenBank. Uno de los clones (SF014) se encontró que tenía un gen que tenía un 86% de homología con periostina de ratón (n.º de registro de GenBank D13664).

Ejemplo de preparación 2: Clonación del ADNc de periostina-1 de rata

40 Se aisló ADNc de periostina de rata tal como sigue. Se insertó una biblioteca de ADNc de aorta de rata (Clontech) en el vector λ gt 11 para generar 10 subgrupos de fagos de aproximadamente 4.000 clones (un total de aproximadamente 40.000 clones). Los subgrupos de fagos se examinaron mediante PCR usando los cebadores (1) 5'-GTTTCATTGAAGGTGGCGATGGTC-3' (SEQ ID NO: 23) y (2) 5'-GAGATAAAAATCCCTGCATGGTCCT-3' (SEQ ID NO: 24) que se diseñaron basándose en la secuencia de nucleótidos de SF014. Como resultado del examen, se obtuvieron tres subgrupos positivos. Uno de los subgrupos se seleccionó mediante hibridación usando el fragmento anterior amplificado por PCR como sonda, se marcó con fosfatasa alcalina usando AlkPhos Direct™ (Amersham Pharmacia), para dar una periostina de rata de clon positivo #1. Su fragmento de inserto se subclonó en el sitio de EcoRI de pBluescript II (Stratagene) y la secuencia de nucleótidos completa se determinó por el método descrito en 1-5 del ejemplo de preparación 1.

El clon resultante tenía una longitud de aproximadamente 3 kb, correspondiente a los nucleótidos desde la posición 292 hasta el extremo 3' de la periostina de ratón (n.º de registro de GenBank D13664). Los resultados sugieren que el clon era un clon truncado en 5'.

55 Un kit de amplificación de ADNc SMART RACE (nombre comercial: kit de amplificación de ADNc SMART™ (Clontech)) se usó según las instrucciones del fabricante para realizar una reacción de 5'-RACE usando ADNc de aorta de rata como molde y los cebadores (2) 5'-GAGATAAAAATCCCTGCATGGTCCT-3' (SEQ ID NO: 24) tal como se describió anteriormente y (3) 5'-CACGGTTCGATGACATGGACAACACC-3' (SEQ ID NO: 25) diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos de periostina de rata #1. El producto de PCR resultante se clonó TA en el vector PCR II (Invitrogen) para dar un clon. El clon se diseñó como periostina de rata 5' RACE #1. La secuencia de nucleótidos se determinó por el método descrito en 1-5 del ejemplo de preparación 1.

65 Los resultados mostraron que la periostina de rata 5' RACE #1 era un clon del cual la secuencia de nucleótidos es más larga que la de la periostina de rata #1 obtenida inicialmente en aproximadamente 300 pb en la dirección 5', y que el extremo 5' de periostina de rata 5' RACE #1 es más largo en 15 pb que el extremo 5' de periostina de ratón (n.º

de registro de GenBank D13664). Los diez subgrupos de fagos anteriores de aproximadamente 40.000 clones (un total de aproximadamente 400.000 clones) preparados a partir de la biblioteca de ADNc de aorta de rata se examinaron mediante PCR usando los cebadores (4) 5'-ACGGAGCTCAGGGCTGAAGATG-3' (SEQ ID NO: 26) diseñado basándose en la secuencia de nucleótidos de periostina de rata 5' RACE #1 y (3) 5'-CACGGTCGATGACATGGACAACACC-3' (SEQ ID NO: 25) tal como se describió anteriormente, para dar dos subgrupos positivos. Uno de los subgrupos se examinó por hibridación usando el fragmento anterior amplificado por PCR como sonda para dar un clon positivo. El clon se designó como periostina de rata #2. Su fragmento de inserto se subclonó en el sitio EcoRI de pBluescript II (Stratagene) y la secuencia de nucleótidos se determinó mediante el método descrito en 1-5 del ejemplo de preparación 1.

El clon resultante tenía una longitud de aproximadamente 2,6 kb. El extremo 5' era idéntico al del clon obtenido a partir de la reacción 5'-RACE y el extremo 3' correspondía a los nucleótidos hasta la posición 2410 de periostina de ratón (n.º de registro de GenBank D13664). La secuencia de nucleótidos de periostina de rata 5' RACE #1 obtenida anteriormente era idéntica a la secuencia de nucleótidos de la región relevante de periostina de rata #2. La longitud completa del ADNc de periostina de rata se completó mediante la periostina de rata #1 y la periostina de rata #2. La secuencia de nucleótidos del ADNc de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 2, y la secuencia de aminoácidos traducida a partir de la secuencia de nucleótidos se muestra en SEQ ID NO: 1.

Ejemplo de preparación 3: Clonación de ADNc de periostinas-2 y -4 de rata

Se realizó la PCR a partir del ADNc de las ratas Dahl en la fase de hipertrofia cardiaca usado en el ejemplo de preparación 1 y la secuencia genética clonada en el ejemplo de preparación 2 usando los cebadores 5'-AAGCTAGCGAAGATGGTTCCTCCTGCCCT-3' (SEQ ID NO: 27) y 5'-CTTTGGGTTTTCCAGCCTC-3' (SEQ ID NO: 28). El producto de PCR se clonó TA en el vector pCR4 Blunt TOPO (Invitrogen). A partir de las colonias resultantes, se seleccionaron 96 colonias y se transfirieron a una placa de 96 pocillos para que fueran 1 colonia/pocillo. El examen para los genes de periostina-2 y -4 de rata candidatos se realizó usando los cebadores 5'-CCCCATGACTGTCTATAGACCT-3' (SEQ ID NO: 29) y 5'-ATTTCCCTTAAAAATCAGATTG-3' (SEQ ID NO: 30). Los clones seleccionados se examinaron además mediante secuenciación para clones sin errores de PCR.

Ejemplo de preparación 4: Construcción de vectores de expresión de baculovirus

Los plásmidos pCR4 Blunt TOPO/periostina-2 de rata y pCR4 Blunt TOPO/periostina-4 de rata preparados en el ejemplo de preparación 3 se digirieron con las enzimas de restricción Spe I y Not I para cortar fragmentos de periostina-2 y -4 de rata. Los fragmentos se ligaron por separado usando un kit de ligación (Takara Bio Inc.) a un fragmento de vector pFastBacHTc (Invitrogen) digerido con las enzimas de restricción pe I y Not I para dar vectores de expresión. Los vectores se diseñaron como pFastBac/periostina-2 de rata y pFastBac/periostina-4 de rata, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de los insertos se confirmaron mediante el método descrito en 1-5 del ejemplo de preparación 1.

Ejemplo de preparación 5: Preparación y cultivo de baculovirus recombinantes

Se transformaron por separado células de *Escherichia coli* DH10BAC con cada uno de pFastBac/periostina-2 de rata y pFastBac/periostina-4 de rata preparados en el ejemplo de preparación 4 para producir baculovirus recombinantes. La inserción de los insertos deseados en los baculovirus resultantes se confirmó por electroforesis y PCR.

Se infectaron por separado células de insectos Sf9 (2×10^6 células/ml) con cada uno de los baculovirus recombinantes a MOI = 0,1, y luego se cultivaron en medio libre de suero (2.000 ml de Sf-900 II SFM (Invitrogen) con 50 µg/ml de gentamicina) a 28°C durante de 4 a 5 días. Se recogieron los sobrenadantes de cultivo.

Ejemplo de preparación 6: Purificación de proteínas periostina de rata

A columnas SP Sepharose Fast Flow (10 ml de volumen de lecho) equilibradas con tampón de equilibración (tampón acetato de sodio 50 mM, pH 6,0, cloruro de sodio 0,1 M) se les aplicó por separado 2.000 ml de cada uno de los sobrenadantes de cultivo obtenidos en el ejemplo de preparación 5, y las fracciones no retenidas resultantes se agruparon por separado para dar fracciones no retenidas de SP Sepharose.

Las columnas se lavaron con el tampón de equilibración (aproximadamente 100 ml) hasta que la absorbancia a 280 nm se aproximó a cero para dar fracciones de lavado de SP Sepharose.

Las columnas se eluyeron con 100 ml de tampón de elución (dihidrogenofosfato de sodio 50 mM (pH 8,0), cloruro de sodio 0,5 M, imidazol 5 mM) para dar fracciones de eluato de SP Sepharose.

Las fracciones de eluato de SP Sepharose cada una en una cantidad de 100 ml se aplicaron por separado a columnas de agarosa Ni-NTA (volumen de lecho de 5 ml) equilibradas con tampón fosfato de sodio 50 mM, pH 8,0, cloruro de sodio 0,5 M e imidazol 5 mM. Las fracciones no retenidas resultantes se agruparon por separado para dar fracciones no retenidas de agarosa Ni-NTA.

Las columnas se lavaron con aproximadamente 50 ml de tampón de lavado (50 ml de dihidrogenofosfato de sodio, pH 8.0, cloruro de sodio 0,5 M, imidazol 5 mM) para dar fracciones de lavado de agarosa Ni-NTA.

5 Las columnas se eluyeron con aproximadamente 25 ml de cada uno de los siguientes tampones de elución: (1) dihidrogenofosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0,5 M, imidazol 20 mM, seguido por tampones de elución con las mismas formulaciones, excepto porque las concentraciones de imidazol fueron (2) 30 mM, (3) 40 mM, (4) 50 mM y (5) 60 mM, para dar fracciones de eluato de agarosa Ni-NTA (1) a (5).

10 Las fracciones que se muestran que contienen las proteínas deseadas por inmunotransferencia de tipo Western se concentraron hasta 1 ml o menos.

15 Las muestras concentradas se aplicaron a columnas de filtración en gel (Sephacryl S-200HR, 11 mm de diámetro X 95 cm; 90 volúmenes de lecho) equilibradas con PBS desgasificado (-) (NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KCl 2,68 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM), y se eluyeron con PBS (-). Los eluatos se liofilizaron para dar proteínas de periostina de rata purificadas.

Ejemplo 1: Estudio *in vitro* de la presencia o ausencia de actividad de adhesión celular de proteínas PN-2 y PN-4 de rata

20 A una placa de cultivo celular de 96 pocillos, se le añadieron fibronectina 10 µg/ml, BSA 100 µg/ml, proteína PN-2 10 µg/ml y proteína PN-4 10 µg/ml por separado y se incubó a 4°C durante la noche para que los pocillos se recubrieran con cada proteína. Tras la retirada de la disolución proteica de los pocillos, se añadieron fibroblastos cardiacos neonatales de ratas suspendidos en DMEM (BSA al 10%, PC/SM) a 10⁴ células/pocillo y se cultivaron en una incubadora a 37°C durante 3 horas. El nivel de adhesión celular se midió tal como sigue. Tras la retirada del sobrenadante de cultivo, se fijaron las células en glutaraldehído al 2,5% durante 30 minutos, se tiñeron con cristal violeta al 0,02% y luego se midieron para determinar su absorbancia a DO 550 nm con un lector de placas (BIO-RAD, LECTOR DE MICROPLACAS modelo 680). Se tiñeron los pocillos no recubiertos como muestras de fondo y se usaron para corregir los valores de absorbancia con fines de comparación. El análisis de datos se realizó mediante la prueba PLSD de Fisher (figura 2). La fibronectina de control positivo (indicada por FN en la figura) mostró adhesión celular, mientras que la BSA de control negativo no mostró adhesión celular. Los pocillos sin recubrimiento proteico también mostraron adhesión celular, pero el nivel fue menor que el de la fibronectina de control positivo. El grupo al que se le añadió proteína PN-2 de rata mostró un nivel de adhesión celular igual o mayor que el del grupo de fibronectina, mientras que el grupo al que se le añadió proteína PN-4 mostró un nivel de adhesión celular simplemente igual al de los pocillos no recubiertos.

Ejemplo 2: Síntesis de la cadena peptídica de exón-21 de rata y producción de anticuerpos policlonales

40 En el ejemplo 1, se demostró que la proteína PN-4 de rata tiene propiedades de adhesión celular menores que la proteína PN-2 de rata. A partir de este hecho y de los resultados de la comparación de secuencias de las proteínas, se reveló que la estructura específica de la proteína PN-2 de rata era la secuencia del exón-21. Basándose en esto, un péptido que tiene un residuo de Cys añadido al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos que constituye el exón-21 se sintetizó químicamente en un rendimiento de 10 mg con una pureza del 80% o más. Se inmunizaron conejos (Kbl:JW) con el polipéptido conjugado a 6 mg de una proteína portadora KLH. Se usó FCA (adyuvante completo de Freund) en la inmunización primaria (administración), y se usó FIA (adyuvante incompleto de Freund) en las inmunizaciones secundarias y posteriores. Se realizó la administración en 20 sitios subcutáneos dorsales a las semanas 2, 4 y 6 después de la administración primaria, usando una dosis de péptido de 800 µg/animal en la inmunización primaria y 400 µg/animal en las inmunizaciones secundarias y posteriores. El título de anticuerpo se determinó mediante ELISA y el suero total se recogió en la semana 7 después del inicio de la administración. Se preparó una columna de afinidad mediante el uso del péptido sintético y se aislaron los anticuerpos que reaccionaban específicamente con el péptido del exón-21. Los anticuerpos policlonales contra el péptido codificado por el exón-21 de periostina de rata se denominaron anticuerpos policlonales anti-exón-21 de rata.

Ejemplo 3: Confirmación de la capacidad de unión a proteína periostina de rata (PN-2)

55 Los dos tipos de anticuerpos policlonales (n.º 1 y n.º 3) producidos en el ejemplo 2 se sometieron a ensayo mediante transferencia puntual para confirmar su capacidad de unión a proteína periostina de rata (PN-2). Las proteínas purificadas (30 µg/ml) producidas en el ejemplo de preparación 6 se dispusieron en puntos cada una en un volumen de 5 µl sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare Bio-Sciences KK) y la membrana se lavó una vez con disolución de TBS (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM). Se añadió tampón de bloqueo (Block Ace, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) y la membrana se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de añadir a la membrana una disolución de 1 µg/ml de cada anticuerpo monoclonal (anticuerpo primario), se agitó la membrana durante 3 horas y se repitió cuatro veces el lavado con disolución de TBS bajo 10 minutos de agitación. Después de añadir a la membrana una disolución de 0,4 µg/ml de un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Promega) (anticuerpo secundario), se agitó la membrana a temperatura ambiente durante 1 hora y se repitió el

lavado cuatro veces con disolución de TBS bajo 10 minutos de agitación. Se añadió un reactivo de detección (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare Bio-Sciences KK) y se hizo reaccionar durante 1 minuto para detectar la quimioluminiscencia. El ensayo confirmó que los dos tipos de anticuerpos monoclonales se unen a la periostina PN-2 de rata.

5

Ejemplo 4: Estudio *in vitro* de la actividad neutralizante del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata

Células de músculo liso vascular de rata DB1X A7r5 (n.º de cat. 09-1444, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.) se sembraron en una placa de múltiples pocillos de cultivo celular de 96 pocillos a una densidad de 0,5 a 1 X 10⁴ células/pocillo y se cultivaron hasta la subconfluencia, y luego se reemplazó el medio por un medio sin suero (-). Por separado, con el fin de marcar fluorescentemente células THP-1 (leucemia monocítica aguda humana, n.º cat. 06-202, Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.), se añadió BCECF-AM 2 nM (envasado especial BCECFAM, n.º cat. B221, Dojindo Laboratories Co., Ltd.) a las células THP-1, se incubaron durante 30 minutos, se centrifugaron y se lavaron dos veces con PBS (-). Para la medición de la adhesión de las células THP-1 marcadas fluorescentemente, se mezcló el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) o un anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) con proteína PN-2 y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, y luego la mezcla reaccionada y 1 X 10⁴ células/pocillo de las células THP-1 marcadas fluorescentemente se añadieron a los pocillos sembrados con A7r5. Como controles se usaron (1) fibronectina, (2) PN-2, (3) PN-2 + anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) y (5) THP-1 solo. La mezcla anterior y los controles se incubaron durante 6 horas. Entonces se añadió lentamente medio RPMI 1640 a cada pocillo hasta llenarlo, y la placa se cubrió con parafilm para excluir el aire. La placa se puso boca abajo y se incubó durante 30 minutos. Entonces se retiró cuidadosamente el parafilm, se aspiró el medio y la placa se lavó tres veces con PBS (-). Como medida de adhesión celular, se determinó la intensidad de fluorescencia con un lector de placas (Wallac 1420 ARVOMx/Light (Perkin-Elmer)) a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de fluorescencia de 535 nm. Tal como se muestra en las figuras 3A y 3B, se observó adhesión celular en (1) el grupo de fibronectina, (2) el grupo de PN-2 y (3) el grupo de PN-2 + anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG), mientras que no se observó adhesión significativa en (4) el grupo de tratamiento con anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) como en el caso de (5) THP-1 solo. Los resultados revelaron que el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata tiene actividad inhibidora, es decir, actividad neutralizante, contra las propiedades de adhesión celular de PN-2.

30

Ejemplo 5: Producción de anticuerpos monoclonales contra la cadena peptídica del exón-21 de periostina humana

(1) Producción de antígenos

Un péptido (péptido antigénico; CEVTKVTKFIE GGDGHLFEDE EIKRLLQG (SEQ ID NO: 31)) que tiene un residuo de Cys añadido al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos que constituye el exón-21 de periostina humana (SEQ ID NO: 18) se sintetizó químicamente por el método de Fmoc con un rendimiento de 10 mg a una pureza del 90% o más. Entonces, se conjugaron 5 mg de una proteína portadora KLH (CALBIOCHEM) con 5 mg del péptido antigénico para dar una disolución de antígeno. Brevemente, se disolvió KLH en PBS (0,01 M) hasta una concentración de 3,3 mg/ml. A esto se le añadió gota a gota una disolución MBS 0,2524 mg/ml (GE Healthcare Bio-Sciences KK), y la mezcla se hizo reaccionar con agitación a temperatura ambiente durante 60 minutos. Se usó diclorometano para eliminar MBS libre para dar KLH-MB. Entonces, se mezclaron 5 mg de KLH-MB con una disolución de 5 mg del péptido antigénico en tampón fosfato de sodio 0,01 M (pH 7,2), y la mezcla se hizo reaccionar con agitación a 4°C durante 12 horas para dar una disolución de antígeno.

45

(2) Inmunización

La disolución de antígeno (50 µl) que contenía 100 µg del péptido antigénico conjugado con KLH obtenido anteriormente (1) se mezcló con FCA (adyuvante completo de Freund, 50 µl) para preparar una emulsión. Todo el volumen de la emulsión se inyectó por vía subcutánea en las patas traseras de tres ratones BALB/c hembra a las 6 semanas de edad. Entonces los ratones recibieron inyecciones adicionales dos veces a un intervalo de 2 semanas en las patas traseras con una emulsión mixta de la disolución de antígeno anterior y FIA (adyuvante incompleto de Freund) preparada en el momento de su uso. Los ratones se sacrificaron entonces por dislocación cervical y los ganglios linfáticos de las patas se recogieron asépticamente.

55

Los ganglios linfáticos anteriores se trituraron en medio RPMI (Kohjin Bio Co., Ltd.) y se hicieron pasar a través de una malla de aproximadamente 10 µm de tamaño de poro para dar una suspensión de las células de los ganglios linfáticos en medio RPMI. La suspensión se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos para dar una fracción de sedimento de las células de los ganglios linfáticos. Los glóbulos rojos contenidos en la fracción de sedimento se hemolizaron con 1 ml de una disolución preparada añadiendo tampón HEPES 20 mM (pH 7,4) a una disolución de cloruro de amonio al 0,84%. Después de la eliminación de los glóbulos rojos, la fracción se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos. La fracción de sedimento resultante (fracción celular) se lavó varias veces con medio RPMI y luego se usó para la fusión celular.

60

(3) Preparación de células de mieloma

65

La línea celular de mieloma de ratón P3X63Ag8U.1 (P3U1), que es resistente a 8-azaguanina y no secreta inmunoglobulina, se cultivó en medio RPMI que contenía suero fetal de ternero (FCS) al 20% en una incubadora con el 10% de CO₂ a 37°C. Las células en la fase de crecimiento logarítmico se recogieron y centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos para separar las células como una fracción de sedimento. La fracción de sedimento se suspendió en medio RPMI.

(4) Fusión celular

El medio RPMI que contenía de 1 X 10⁸ a 3 X 10⁸ células de ganglios linfáticos inmunizados preparados anteriormente (2) se mezcló con el medio RPMI que contenía 10⁸ células de mieloma preparadas anteriormente (3). La mezcla se centrifugó a 1.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se retiró suavemente para dejar las células como una fracción de sedimento, seguido por la adición de 1 ml de polietilenglicol 1500 al 25% (p/v) (PEG 1500, Boehringer). A esto, se le añadió lentamente medio RPMI hasta un volumen total de 10 ml. A esto, se añadió medio RPMI que contenía FCS al 20% (10 ml) y se dejó reposar por un tiempo, seguido por centrifugación a 1.000 rpm durante 5 minutos. La fracción de sedimento resultante (fracción celular) se ajustó a una densidad celular de 10⁶ células/ml mediante la adición de medio RPMI que contenía FCS al 20%. La suspensión celular se dispensó a 200 µl/pocillo en placas de cultivo de 96 pocillos (Corning). Después del cultivo de las células en una incubadora con el 5% de CO₂ a 37°C durante 24 horas, se añadió disolución de HAT (Invitrogen) y se continuó el cultivo durante 2 semanas adicionales.

(5) Examen por ELISA

Se realizó el examen de pocillos positivos que contenían el sobrenadante de cultivo que mostraban reactividad con el péptido antigénico. Una disolución de antígeno usada para el ensayo era un conjugado preparado acoplado el péptido antigénico (2 mg) producido anteriormente (1) a ovoalbúmina (OVA) como proteína portadora.

Cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Falcon 353912) se recubrió con el conjugado (1 µg/ml) a 4°C durante la noche. Después de lavar la placa, se añadieron gota a gota 50 µl del sobrenadante de cultivo a partir de lo anterior (4) (que contenía anticuerpos monoclonales) a cada pocillo y se dejaron reposar en una incubadora a 37°C durante 2 horas, seguido por lavado con PBS (-) (solución salina tamponada con fosfato). Después de la adición del anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed), la placa se dejó reposar en una incubadora a 37°C durante 1 hora, y se lavó con PBS (-). Se añadió un sustrato de desarrollo de color (ALP) y se desarrolló color durante 20 minutos. La absorbancia (título de anticuerpo) a DO 490 nm se midió para cada pocillo con un lector de placas (BIO-RAD, LECTOR DE MICROPLACAS modelo 680) para evaluar la reactividad con el péptido antigénico y de ese modo determinar pocillos positivos que contenían el sobrenadante de cultivo que mostraron reactividad con el péptido antigénico.

(6) Clonación de células productoras de anticuerpos

La clonación de líneas celulares productoras de anticuerpos a partir de las células en los pocillos positivos para las que la reactividad con el péptido antigénico se confirmó por ELISA anteriormente (5) se realizó mediante dilución limitante. Brevemente, las células de los pocillos positivos se sembraron en cada pocillo de una placa de cultivo de 96 pocillos y se cultivaron en una incubadora con el 5% de CO₂ a 37°C durante 2 semanas. Para el sobrenadante de cultivo en cada pocillo, la reactividad con el péptido antigénico se examinó por ELISA de la misma manera que anteriormente (5). Para cada pocillo positivo, la clonación por dilución limitante se realizó de nuevo para seleccionar 30 células que tenían una alta reactividad con el péptido antigénico y mostraban un buen crecimiento de colonias. Las células se transfirieron a placas de cultivo de 24 pocillos y se cultivaron en una incubadora con el 5% de CO₂ a 37°C durante 2 semanas. Para cada sobrenadante de cultivo, la reactividad con el péptido antigénico (título de anticuerpos) se examinó de nuevo por ELISA de la misma manera que anteriormente (5). Se determinó que las células de dos pocillos mostraban una alta absorbancia a DO 490 nm, es decir, dos líneas celulares de hibridoma (n.º 8 y n.º 10) se determinaron que eran útiles como células productoras de anticuerpos y se seleccionaron.

Las células productoras de anticuerpos así obtenidas producen constantemente anticuerpos monoclonales anti-exón-21 humano, es decir, los anticuerpos de la presente invención, y por tanto el sobrenadante del medio en el que se han cultivado estas células productoras de anticuerpos pueden usarse directamente como disolución de anticuerpos de la presente invención.

La línea celular productora de anticuerpos anterior (hibridoma) n.º 8, que produce un anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano, se depositó en la Incorporated Administrative Agency, National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary (NPMO) (fecha de depósito: 26 de febrero de 2013, n.º de registro: NITE BP- 01546, referencia de identificación: KS-0259#8,080611 Kohjin Bio).

(7) Confirmación de la capacidad de unión a proteína periostina (PN-2)

Los anticuerpos producidos por las dos células productoras de anticuerpos obtenidas anteriormente (6) se evaluaron mediante transferencia puntual para confirmar su capacidad de unión a proteína periostina del ratón (PN-2), basándose

en el hecho de que la periostina de ratón tiene una secuencia de aminoácidos casi idéntica a la de periostina humana. Brevemente, la proteína PN-2 de ratón (periostina de ratón recombinante/OSF-2, R&D SYSTEMS) (100 µg/ml) se dispuso en puntos en volúmenes de 5 µl sobre una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare Bio-Sciences KK) y se lavó la membrana una vez con disolución de TBS (Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM). Se añadió tampón de bloqueo (Block Ace, Snow Brand Milk Products Co., Ltd.) y la membrana se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de añadir a la membrana una disolución de 1 µg/ml de cada anticuerpo monoclonal (anticuerpo primario) obtenido anteriormente (6), se agitó la membrana durante 3 horas y se repitió cuatro veces el lavado con disolución de TBS bajo 10 minutos de agitación. Después de añadir a la membrana una disolución de 0,4 µg/ml de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Promega) (anticuerpo secundario), se agitó la membrana a temperatura ambiente durante 1 hora y se repitió cuatro veces el lavado con solución de TBS bajo 10 minutos de agitación. Se añadió un reactivo de detección (ECL Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare Bio-Sciences KK) y se hizo reaccionar durante 1 minuto para detectar la quimioluminiscencia. El ensayo confirmó que los anticuerpos producidos por las dos células productoras de anticuerpos clonadas anteriormente (6) se unen a periostina humana PN-2.

(8) Producción en masa y purificación de anticuerpos monoclonales

A ratones BALB/c se les administraron por vía intraperitoneal 0,5 ml de pristano [2,6,10,14-tetrametilpentadecano (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)] y los ratones se mantuvieron durante de 2 a 3 semanas. Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales n.º 8 y n.º 10 que se habían mantenido en la fase de crecimiento logarítmico se recogieron y se centrifugaron para la retirada del sobrenadante del cultivo. A cada una de las fracciones de sedimento celular se les añadió medio RPMI libre de FCS para preparar una suspensión celular a una densidad celular de 1×10^7 células/ml. La suspensión celular se inyectó por vía intraperitoneal en los ratones los BALB/c pretratados con pristano. Aproximadamente tres semanas más tarde, se recogió la ascitis exudada del abdomen con una jeringa. La ascitis recogida se hizo pasar a través de un filtro con un diámetro de poro de 0,22 µm, se purificó el filtrado de manera convencional mediante cromatografía de afinidad sobre una columna de proteína G-Sepharose (Millipore, 11511324) para preparar dos tipos de anticuerpos monoclonales anti-exón-21 humano.

Ejemplo 6: Análisis de epítomos de anticuerpos monoclonales anti-exón-21 humano

Se produjo Replitope (un alineamiento de 37 tipos de péptidos fijados sobre un portaobjetos de vidrio) y se usó para identificar los epítomos de los anticuerpos monoclonales peptídicos anti-exón-21 de periostina humana (dos tipos) y para los anticuerpos policlonales (dos tipos).

Como anticuerpos primarios, se usaron los anticuerpos policlonales de IgG de conejo n.º 1 (0,51 mg/ml) y n.º 3 (0,62 mg/ml), y los anticuerpos monoclonales de IgG2b de ratón n.º 8 (2,21 mg/ml) e IgG1 de ratón n.º 10 (1,35 mg/ml). Como anticuerpos secundarios, se usaron anti-IgG de conejo conjugado con Cy5 (H + L) (JIR 111-175-144) y anti-IgG de ratón conjugado con Dylight 649 (Pierce, #35515). Los péptidos se sintetizaron sobre membranas de celulosa. Los péptidos se transfirieron entonces a placas de microtitulación y se dispusieron en puntos sobre una superficie de vidrio con un sistema de nanopipeteo para alineamientos de péptidos (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlín, Alemania). El microalineamiento de péptidos se incubó con tampón de bloqueo (Pierce International, Superblock TBS, orden n.º 37536) durante 2 horas. El microalineamiento se incubó con los anticuerpos primarios (10 µg/ml, en tampón de bloqueo, volumen total de ensayo 200 µl) o tampón de bloqueo solo en una estación de hibridación de microalineamientos (estación de hibridación de microalineamientos TECAN HS400). El microalineamiento se lavó con tampón TBS (tampón TBS 50 mM + Tween 20 al 0,1% (JPT), pH 7,2) y se incubó con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromo (anti-IgG de conejo o anti-IgG de ratón) a una concentración final de 1 µg/ml en tampón de bloqueo. El microalineamiento se lavó tres veces con tampón TBS y luego se lavó con tampón SSC (tampón SSC 3 mM (JPT), pH 7,0) y se secó bajo corriente de nitrógeno. Finalmente se analizó el microalineamiento con un escáner de fluorescencia de alta resolución (nombre comercial: GenePix 4200AL, Axon, Inc.). Se realizó el análisis puntual usando un software GenePix 6.0.

Como resultado del ensayo, los epítomos para los anticuerpos policlonales anti-exón-21 de rata se identificó que eran las secuencias TKVTK (SEQ ID NO: 21) y QGDTPVRK (SEQ ID NO: 22), y los epítomos para los anticuerpos monoclonales anti-exón-21 humano se identificó que eran las secuencias VTKVTK (SEQ ID NO: 19) y FEDEEIK (SEQ ID NO: 20).

Ejemplo 7: Estudio del efecto inhibitor del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata sobre la hiperplasia de la íntima vascular usando el modelo de lesión con balón de la arteria carótida de rata

Se indujo la lesión en ratas SD mediante rascado de la arteria carótida común izquierda con un catéter de balón Fogarty 2F (francés), y simultáneamente se administró por vía intravascular el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) o un anticuerpo IgG de control de conejo (rIgG). Un día, tres días, una semana, dos semanas y tres semanas después de la producción de los modelos de lesión intimal, se fijaron cinco ratas por perfusión para cada período de tiempo. Se recogieron los vasos sanguíneos, y se diseccionaron las arterias carótidas inducidas por lesiones con balón como muestras y las arterias carótidas sin lesión como controles en una longitud de

aproximadamente 1 cm de los vasos sanguíneos. De aproximadamente 2 a 3 mm de segmento de cada uno de los vasos sanguíneos diseccionados se fijaron en paraformaldehído al 4%, y el resto de cada vaso se usó para la extracción del ARN total para la síntesis de ADNc. A partir del tejido fijado, se prepararon secciones y se tiñeron con HE (hematoxilina-eosina) (figura 4B). Las áreas de la túnica íntima y la túnica media en todas las secciones teñidas con HE se determinaron usando un software de análisis gráfico (nombre comercial: Graphic converter ver.4.02). A partir de las áreas determinadas, se calculó la razón de íntima/media y se examinó la gravedad de la hiperplasia de la íntima. Tal como se muestra en figura 4A, se observó una diferencia significativa de $p = 0,0362$ ($N = 8$) en la razón de íntima/media entre el grupo de administración de anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) y el grupo de anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG). Los resultados mostraron la inhibición de la hiperplasia de la íntima (figuras 4A y 4B).

Ejemplo 8: Estudio del efecto inhibidor del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata sobre la hiperplasia de la íntima vascular usando ratones deficientes en apoE

Ratones deficientes en ApoE, un modelo propenso a arteriosclerosis, se estimularon con una dieta alta en grasas, y simultáneamente con el inicio de la alimentación con dieta alta en grasas, se administró por vía intraperitoneal el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) o un anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) a una dosis de 100 $\mu\text{g/ml}$ una vez a la semana. Tres meses después, se diseccionó la aorta. Las lesiones arterioscleróticas desarrolladas se compararon en cuanto a los siguientes dos parámetros: la gravedad de la arteriosclerosis definida como la razón de área positiva teñida con aceite rojo O con respecto al área total de los vasos sanguíneos; y el % de cambio en la gravedad de la arteriosclerosis definida como la gravedad de la arteriosclerosis dividida entre el valor promedio del grupo de administración de IgG de la gravedad de la arteriosclerosis. Los resultados mostraron una inhibición significativa de la arteriosclerosis aórtica en el grupo de administración de anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) en comparación con el grupo de administración de anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) ($N = 3$) ($p < 0,05$) (figura 5).

Ejemplo 9: Estudio del efecto antiinflamatorio del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano usando el modelo de colitis de ratón

Se realizó un estudio para investigar el efecto del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) o un anticuerpo IgG de control de ratón (mIgG) sobre un modelo de colitis de ratón con enfermedad de Crohn inducida por dextrano de sulfato sódico (DDS) al 1,75%. Simultáneamente con la administración de DDS, cada anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 100 $\mu\text{g/animal}$ una vez a la semana. Dos semanas más tarde, se recogieron los intestinos gruesos, y se midieron y compararon las longitudes de los intestinos gruesos. Debido a la administración de DDS, las longitudes de los intestinos gruesos se acortaron significativamente en comparación con el grupo simulado ($N = 6$) ($p < 0,01$). Sin embargo, el grupo de administración de anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) mostró una inhibición significativa del acortamiento de la longitud del intestino grueso, en comparación con el grupo de administración de anticuerpo IgG de control de ratón (mIgG) y el grupo de administración de DDS solo ($N = 6$) ($p < 0,05$) (figura 6).

Ejemplo 10: Estudio del efecto inhibidor del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata sobre la angiogénesis usando el modelo de isquemia de las extremidades inferiores

Se ligó la arteria femoral de las extremidades inferiores de ratones C57BL6N para preparar un modelo de isquemia de extremidades inferiores. Tres días antes de la ligación, se administró por vía intraperitoneal el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) o un anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) a una dosis de 40 $\mu\text{g/ml}$ (dos veces a la semana). El día cero (inmediatamente antes de la administración), y 1, 7, 14, 21 y 28 días después de la administración, se midió el flujo sanguíneo de las extremidades inferiores en el lado no afectado y el lado afectado con un instrumento de obtención de imágenes Doppler de láser (LDI; Moor Instruments). Para la evaluación del flujo sanguíneo de las extremidades inferiores, se calculó la tasa de perfusión relativa definida como el flujo del lado afectado/flujo del lado no afectado, y se compararon los grupos. La tasa de perfusión relativa 28 días después mostró una disminución significativa en el flujo sanguíneo de las extremidades inferiores en el grupo de administración de anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) en comparación con el grupo de administración de anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) ($p < 0,05$) (figura 7). Se recogieron los músculos aducen de los ratones, se prepararon secciones congeladas, se inmunotñeron con un anticuerpo frente a CD31 y se sometieron a evaluación de los vasos sanguíneos. El número de los vasos sanguíneos por unidad de área fue significativamente menor en el grupo de administración de anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) que en el grupo de administración de anticuerpo IgG de control de conejo, lo que reveló una inhibición significativa de la angiogénesis ($p < 0,01$) ($N = 6$) (figura 8). El mismo conjunto de experimentos se realizó usando el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb). Como con el caso del anticuerpo policlonal, la tasa de perfusión relativa calculada con LDI indicó una disminución significativa del flujo sanguíneo en comparación con el grupo de administración de anticuerpo IgG de control de ratón (mIgG), lo que reveló una inhibición de la angiogénesis (figura 9).

Ejemplo 11: Efecto inhibidor *in vitro* del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata sobre la formación de tubos

El sobrenadante de células de cáncer de mama 4T1 se añadió a Matrigel (BD Bioscience, n.º 356231). A esto, se le

añadieron por separado un anticuerpo IgG de control de ratón (mIgG), el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb), un anticuerpo IgG de control de conejo (rIgG) y el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb), cada uno a una concentración de 1/100. Cada mezcla se añadió a una placa de 96 pocillos en una cantidad de 70 μ l/pocillo. Las mezclas se incubaron durante 30 minutos para permitir la formación de gel, y se sembraron HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana normal) a una densidad celular de $1,5 \times 10^4$ células/pocillo. Las células se incubaron durante 5 horas, se tiñeron con una disolución de cristal violeta y se fotografiaron bajo un microscopio. Se contó el número de tubos. Las propiedades angiogénicas del sobrenadante de células de cáncer de mama 4T1 se inhibieron significativamente por el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata y el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano ($p < 0,05$) (figuras 10A y 10B). El Matrigel al que se añadió proteína PN-2 en diversas concentraciones se procesó y se evaluó de la misma manera que anteriormente. La evaluación mostró que, a concentraciones de 5 μ g/ml o más, la proteína PN-2 indujo significativamente la formación de tubos de una manera dependiente de la dosis, lo que indicó las propiedades angiogénicas de la proteína PN-2 ($p < 0,05$) (figuras 11A y 11B). Los resultados del estudio mostraron que los anticuerpos anti-exon-21 tienen un efecto inhibitorio de la angiogénesis. Los resultados también indicaron las propiedades angiogénicas de la proteína PN-2.

Ejemplo 12: Estudio *in vitro* de la influencia del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata sobre el crecimiento celular

Se sembraron células de cáncer de mama 4T1 de ratón en DMEM (sin suero, PC/SM) en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a una densidad de 10^5 células/pocillo y se cultivaron en una incubadora a 37°C durante la noche. Tras la retirada del sobrenadante de cultivo, a los pocillos se les añadió medio DMEM (sin suero, PC/SM) al que se añadió el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) o un anticuerpo IgG de control de conejo (rIgG) (cada uno a 200 μ g/ml) a una concentración final de 1 μ g/ml. Entonces se cultivaron las células durante la noche. Al día siguiente, el medio en todos los pozos se reemplazó por DMEM (BSA al 10%, PC/SM), y se añadieron 20 μ l de reactivo CellTiter de un kit de ensayo de proliferación celular (nombre comercial: kit de ensayo de proliferación celular CellTiter 96 AQueous One Solution, Promega) a 100 μ l del medio en los pocillos. Las células se cultivaron a 37°C durante 1 hora. La intensidad de tinción de las células se midió con un lector de placas (BIO-RAD, LECTOR DE MICROPLACAS modelo 680) a 490 nm (figura 12A). Los resultados revelaron que el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) mostró actividad inhibitoria del crecimiento celular a una concentración elevada en comparación con el anticuerpo IgG de control del conejo (rIgG) ($p < 0,05$).

Se realizó otra investigación para determinar si el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano tiene citotoxicidad contra células de cáncer de mama 4T1 de ratón. Se sembraron células de cáncer de mama 4T1 de ratón en DMEM (sin suero, PC/SM) en una placa de cultivo celular de 96 pocillos a una densidad de 1×10^4 células/pocillo y se cultivaron en una incubadora a 37°C durante la noche. Después de la retirada del sobrenadante de cultivo, se añadió a los pocillos medio DMEM (sin suero, PC/SM) al que se añadió el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) o un anticuerpo IgG de control de ratón (mIgG) (cada uno a 100 μ g/ml) a una concentración final de 1 μ g/ml. Entonces se cultivaron las células durante 6 horas. Se recogió el sobrenadante de cultivo y la lactato deshidrogenasa (LDH) contenida en el sobrenadante se midió mediante ELISA. Para la medición, se usó un kit de ensayo de citotoxicidad (nombre comercial: kit de detección de citotoxicidad LDH, Takara Bio, Inc.). La LDH es una enzima presente en el citoplasma y habitualmente no permea a través de la membrana celular. Cuando la membrana celular está dañada, se libera LDH fuera de la célula, es decir, al medio. La LDH, por tanto, puede servir como indicador de citotoxicidad. Se sometió el sobrenadante a medición con un lector de placas (BIO-RAD, LECTOR DE MICROPLACAS modelo 680) a 490 nm. Los resultados revelaron que el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) presentaba actividad inhibitoria significativa del crecimiento celular a una concentración elevada en comparación con el anticuerpo IgG de control de ratón (mIgG) ($P < 0,01$) (figura 12B).

Ejemplo 13: Estudio del efecto del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata usando ratones modelo de metástasis pulmonar de células de cáncer de mama 4T1 de ratón

Se sembraron células de ratón 4T1 (ATCC) sobre placas de cultivo tisular de 10 cm (Greiner) que contenían RPMI 1640 (Gibco) con el 10% de albúmina sérica bovina (FBS) (Biowest) y solución mixta de penicilina-estreptomina (Nacalai Tesque), y las células se cultivaron en una incubadora a 37°C durante 24 horas. Se eliminó el sobrenadante de cultivo, se lavaron las células con PBS y luego se trataron con tripsina/EDTA. Las células flotantes se recogieron y centrifugaron a 1.500 rpm durante 3 minutos. Posteriormente, se realizaron pases de $1,5 \times 10^5$ células y se cultivaron en una incubadora a 37°C durante 72 horas. Las células en la fase de crecimiento logarítmico se suspendieron en 100 μ l de PBS para que fuesen 1×10^6 células/animal. Las células preparadas se inyectaron en la almohadilla del pie de ratones BALB/c hembra a las 8 semanas de edad usando una jeringa de insulina equipada con una aguja de inyección, 29 G Myjector (TERMO), para establecer ratones modelo de metástasis pulmonar. A los ratones modelo, se les administró el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) o un anticuerpo IgG de control de conejo (rIgG) por vía intraperitoneal a 100 μ g/animal por semana usando una jeringa de insulina equipada con una aguja de inyección, 29 G Myjector. Para el experimento usando el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) (1 mg/ml), la inyección de células se realizó simultáneamente con la administración de anticuerpos, y una semana después y dos semanas después de la inyección de células, se realizaron las administraciones de anticuerpos adicionales. El anticuerpo IgG de control de conejo (rIgG) usado fue IgG de conejo normal (R&D Systems). Después de la inyección de células, se midió el diámetro de las lesiones de hinchazón en las extremidades inferiores con un

calibre para evaluar el volumen de los tumores primarios. La evaluación se realizó según Dethlefsen LA. *et al.* J. Natl. Cancer Inst., 40, 389 (1968), usando la fórmula: (longitud de la suela del pie) X (anchura de la suela del pie) ²/2. Los ratones se diseccionaron tres semanas después de la inyección de células, y se realizaron la medición del peso corporal, el examen de la presencia o ausencia de metástasis pulmonar a partir de los tumores primarios y el recuento de las colonias metastásicas pulmonares. Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba de la t de Student. El volumen de los tumores primarios en las extremidades inferiores tres semanas después de la inyección de células se redujo significativamente mediante la administración del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) (p < 0,05) (figura 13A). Una comparación del número de colonias metastásicas pulmonares cinco semanas después de la inyección de células reveló una reducción significativa en el número de colonias por la administración del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) (P < 0,05) (figura 13B). Se realizó el mismo conjunto de experimentos usando el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb). Al igual que en el caso del anticuerpo policlonal, se observó una reducción significativa en el número de colonias metastásicas pulmonares, en comparación con un grupo de administración de anticuerpo IgG de control de ratón (mlgG) y con un grupo de administración de PBS (-) (figura 14). Los resultados revelaron el efecto inhibidor de los anticuerpos anti-exón-21 sobre los tumores primarios y focos metastásicos de células de cáncer de mama 4T1.

Ejemplo 14: Estudio del efecto del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata usando ratones modelo de metástasis pulmonar de células de melanoma B16F10 de ratón

Se cultivaron células de melanoma B16F10 de ratón (línea celular de melanoma de ratón B16F10) en una incubadora a 37°C, se lavaron con PBS y se trataron con tripsina/EDTA. Las células flotantes se recogieron y centrifugaron a 1.500 rpm durante 3 minutos. Se suspendieron las células recogidas en 100 µl de PBS para que fuesen 5 X 10⁵ células/animal. Se inyectaron las células preparadas en la almohadilla del pie de ratones C57BL/6N macho a las 8 semanas de edad usando una jeringa de insulina equipada con una aguja de inyección, 29 G Myjector (TERMO), para establecer ratones modelo de metástasis pulmonar. A los ratones modelo se les administró el anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) o un anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) a 100 µg/animal por semana usando una jeringa de insulina equipada con una aguja de inyección, 29 G Myjector. El control usado fue IgG de conejo normal (R&D Systems).

Para reproducir las condiciones cercanas a la situación clínica, la administración del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) (1 mg/ml) o de un anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) (1 mg/ml) como control a 100 µg/animal por semana se realizó una semana después de la inyección de las células de melanoma B16F10 de ratón. Los tumores primarios se midieron con un calibre para evaluar el volumen de los tumores primarios. La evaluación se realizó según Dethlefsen LA. *et al.* J. Natl. Cancer Inst., 40, 389 (1968), usando la fórmula: (longitud de la suela del pie) X (anchura de la suela del pie) ²/2. Tres semanas después de la inyección de células, la administración del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata inhibió significativamente el crecimiento de los tumores primarios en comparación con la administración del anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) (p < 0,05) (figura 15A). El número de colonias metastásicas pulmonares se contó mediante inspección visual y se comparó. Los resultados mostraron que, cinco semanas después de la inyección de células, la administración del anticuerpo policlonal anti-exón-21 de rata (ex21PoAb) inhibió significativamente la metástasis pulmonar en comparación con la administración del anticuerpo IgG de control de conejo (rlgG) (p < 0,05) (figura 15B). El análisis de datos del número de colonias metastásicas pulmonares se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney.

Ejemplo 15: Estudio del efecto del anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano usando ratones modelo de aneurisma

El estudio se realizó usando ratones deficientes en ApoE envejecidos (6 meses o más) . Se disolvió angiotensina II en solución salina fisiológica. La disolución de angiotensina II (Sigma Aldrich, A9525) se cargó en una bomba osmótica para su administración continua (Alzet, Muromachi Kikai Co., Ltd., modelo: 2004). La dosificación se fijó a 1.000 ng/kg·día. La bomba osmótica ajustada se cebó con solución salina fisiológica durante una noche y día. Se administró isoflurano vaporizado a los ratones por inhalación a una concentración del 2% y una velocidad de flujo de 1 l/min. Después de que se lograra una anestesia suficiente, los ratones se mantuvieron en decúbito prono. Se esterilizó la piel del cuello con una disolución de etanol al 70% y se realizó una pequeña incisión. A partir del sitio de la incisión, se insertaron tijeras debajo de la piel del ratón y se despegó la piel. Se creó un espacio para colocar la bomba y se implantó la bomba osmótica debajo de la piel del ratón. Después de la implantación, se cerró la incisión con grapas para cirugía de animales pequeños (Fine Science Tools, Muromachi Kikai Co., Ltd., modelo: 12040-01).

Se administró un anticuerpo IgG de control de ratón (mlgG, 100 µg/animal) o el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb; 100 µg/animal) por vía intraperitoneal una vez a la semana, comenzando a partir de la semana cero. Cuatro semanas más tarde, se midió el diámetro de la aorta con un escáner de ultrasonidos (Toshiba Medical Systems Corporation, Aplio XV). Los resultados revelaron que el anticuerpo monoclonal anti-exón-21 humano (ex21MoAb) inhibía significativamente la expansión del diámetro de la aorta (figura 16).

Aplicabilidad industrial

Puede usarse un anticuerpo contra una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular para prevenir y

tratar enfermedades asociadas a inflamación, incluyendo cánceres. El anticuerpo también puede usarse para la medición de la cantidad de tal isoforma de periostina en una muestra de un paciente para determinar la presencia o ausencia de un cáncer y la progresión de los estados patológicos.

5 **N.º de registro**

Identificación del microorganismo

Referencia de identificación: KS-0259#8, 080611 Kohjin Bio

10

N.º de registro: NITE BP-01546

Fecha de depósito

15

26 de febrero de 2013

Autoridad depositaria internacional

20

Nombre: Incorporated Administrative Agency, National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depository

Dirección: Sala 122, 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba 292-0818 JAPÓN

Lista de secuencias

25

<110> Universidad de Osaka

<120> Anticuerpo frente a péptido codificado por la región del exón-21 de periostina y composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con inflamación que contienen el mismo

30

<130> O11F4814

<150> Documento JP 2013-47097

<151> 08-03-2013

35

<160> 31

<170> PatentIn versión 3.1

40

<210> 1

<211> 838

<212> PRT

<213> *Rattus sp.*

45

<400> 1

ES 2 811 060 T3

Met Val Pro Leu Leu Pro Leu Ser Ala Leu Leu Leu Leu Phe Leu Cys
1 5 10 15

Asp Val Asp Pro Ala Asn Ala Asn Ser Tyr Tyr Asp Lys Val Leu Ala
20 25 30

His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu
35 40 45

Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Ser Cys Lys Asn
50 55 60

Trp Tyr Gln Gly Ala Ile Cys Gly Lys Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu
65 70 75 80

Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala
85 90 95

Val Met Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala
100 105 110

Thr Thr Thr Gln His Tyr Ser Asp Val Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile
115 120 125

Glu Gly Lys Gly Ser Tyr Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp
130 135 140

Asp Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Asn Asn Val Asn
145 150 155 160

ES 2 811 060 T3

Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Val Asn Lys Arg Met
165 170 175

Leu Thr Lys Asp Leu Lys His Gly Met Val Ile Pro Ser Met Tyr Asn
180 185 190

Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val
195 200 205

Asn Cys Ala Arg Val Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val
210 215 220

Val His Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln
225 230 235 240

Asp Phe Ile Glu Ala Glu Asp Glu Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala
245 250 255

Ile Thr Ser Asp Leu Leu Glu Ser Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr
260 265 270

Leu Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val
275 280 285

Leu Glu Arg Ile Met Gly Asp Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys
290 295 300

Tyr His Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ala Ile Thr Gly Gly
305 310 315 320

Ala Val Phe Glu Thr Met Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Glu
325 330 335

Gly Asp Ser Ile Ser Ile Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp
340 345 350

Ile Val Thr Lys Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Glu Val Leu Ile
355 360 365

Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr
370 375 380

Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ser Leu Lys
385 390 395 400

Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser
405 410 415

ES 2 811 060 T3

Asp Asp Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln
 420 425 430

Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Asn Gly
 435 440 445

Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr
 450 455 460

Arg Thr Ala Ile Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Val Arg Gly Ser Lys
 465 470 475 480

Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Gln Pro
 485 490 495

Ala Glu Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Arg Gln Asp Lys Arg Phe Ser
 500 505 510

Ile Phe Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Asp Leu Leu Thr
 515 520 525

Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys
 530 535 540

Gly Met Thr Asn Glu Glu Arg Glu Ile Leu Ile Gly Asp Lys Asn Ala
 545 550 555 560

Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Tyr Ile Gly
 565 570 575

Lys Gly Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly
 580 585 590

Ser Lys Ile Tyr Val Lys Gly Val Asn Glu Thr Leu Leu Val Asn Glu
 595 600 605

Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His
 610 615 620

Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Ile Pro Val Gly Asn Asp
 625 630 635 640

Gln Leu Leu Glu Leu Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys
 645 650 655

Phe Val Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Met Thr Val Tyr Thr

ES 2 811 060 T3

gaccatgttt atggcacgct gggcatcgtg ggagccacga ccaactcaaca ctattctgat 360
gtctcgaagc tcaggaaga gattgaagga aaagggctct acacatactt cgcgccgagt 420
aacgaagctt gggacaacct ggattccgac atccgcagag gactagagaa caatgtcaat 480
gttgagttac tgaacgcttt acacagccac atgggtaata agagaatgct aaccaaggac 540
ctgaaacacg gcatggttat tccttcaatg tacaacaatc tggggctttt tatcaatcat 600
tatcccaatg gggttgtcac tgtgaactgt gctcgagtaa tccacgggaa ccagattgcc 660
acaaatggtg ttgtccatgt catcgaccgt gtcctgacac aaattggcac ctccatccaa 720
gacttcattg aagcagaaga tgagctttca tcattcagag cggctgccat cacttctgac 780
cttttggagt cccttgaag agacggtcac ttcacactct ttgctcccac caatgaggct 840
ttcgagaaac tcccacgagg agtcctagaa aggatcatgg gagacaaagt ggcttctgaa 900
gctctcatga agtaccacat cctgaatacc ctccagtgtc ctgaggctat cacaggagga 960
gcggtgtttg agaccatgga aggaaacact attgaaatag ggtgtgaggg agacagcatc 1020
tccattaacg gaatcaagat ggtgaacaag aaagacattg tgacgaagaa tgggtgtcatc 1080
cacctgattg atgaagtcct cattcctgat tctgctaaac aagtattga gctggctgga 1140
aaacagcaaa ccactttcac ggacctggta gccagttag ggttggcgtc ttctctgaag 1200
ccggatggag agtacacgct gttagcgcct gtgaacaatg cgttctctga tgacactctg 1260
agcatggacc agcgccttct taagctaatt ctgcaaaatc acatattgaa agtaaaagtc 1320
ggccttagtg atctctacia tggacagatt ctggagacca ttggaggcaa acaactccgt 1380
gtcttctgt atcggacggc tatctgcata gaaaactcat gcatggtgag aggaagcaag 1440
caggggagga acggtgccat tcacatattc cgagagatca tccaaccggc ggagaagtcc 1500
ctgcacgaaa aactgcgcc aagataagcgc ttcagcatct tcctcagcct cctcgaagct 1560
gcagatctga aagatcttct gacacagccc ggagattgga ccttgtttgc accaaccaat 1620
gatgccttca agggaatgac taatgaagaa agggagattc tgattgggga taaaaatgct 1680
ctccaaaaca tcattcttta ccacctgacc ccaggggttt atattggaaa gggatttgaa 1740
cccggagtca ccaacatcct gaagaccaca caggggaagca aaatctatgt gaaaggagtc 1800
aatgagacgc ttttggtgaa tgagttgaag tccaaagaat ctgacatcat gacaacaaac 1860
ggcgtcattc acgttgtgga caaactcctc tatccagcag acattccggt tggaaatgat 1920
cagctcttgg aattactgaa caaactgata aaatacatcc aaattaagtt cgttctgtggc 1980
agcaccttca aagaaatccc catgactgtc tatacaacta aaattataac caaactcgtg 2040
gaacaaaaaa ttaaagtcac tcaaggcagt cttcagccta ttatcaaac agaaggacct 2100
gcaatgacga agatccacat tgaaggcgag cctgacttca ggctgattaa agaaggtgaa 2160
acagtgacag aagtgatcca cggagaacca gtcattaaaa agtacaccaa aatcatagac 2220

ES 2 811 060 T3

ggggttcctg ttgaaataac tgaaaaagag acccggaag aacgcatcat cacaggtcct 2280
 gagataaaat aactaggat ttccacagga ggtggggaaa cagaagagac cctgcagaaa 2340
 ttcttgcaaa aagaggtctc caaggtcaca aagttcattg aaggtggcga tggtcactta 2400
 tttgaagatg aggcgattaa aagactgctt caggagaca cacctgcaaa gaagatacaa 2460
 gccacaacaaa gggttcaagg gtctagaagg cgatcaagag aaggccgttc tcagtga 2517

<210> 3
 <211> 811
 <212> PRT
 <213> *Rattus sp.*

5

<400> 3
 Met Val Pro Leu Leu Pro Leu Ser Ala Leu Leu Leu Leu Phe Leu Cys
 1 5 10 15
 Asp Val Asp Pro Ala Asn Ala Asn Ser Tyr Tyr Asp Lys Val Leu Ala
 20 25 30
 His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu
 35 40 45
 Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Ser Cys Lys Asn
 50 55 60
 Trp Tyr Gln Gly Ala Ile Cys Gly Lys Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu
 65 70 75 80
 Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala
 85 90 95
 Val Met Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala
 100 105 110
 Thr Thr Thr Gln His Tyr Ser Asp Val Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile
 115 120 125
 Glu Gly Lys Gly Ser Tyr Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp
 130 135 140
 Asp Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Asn Asn Val Asn
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Val Asn Lys Arg Met
 165 170 175

ES 2 811 060 T3

Leu Thr Lys Asp Leu Lys His Gly Met Val Ile Pro Ser Met Tyr Asn
 180 185 190

Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val
 195 200 205

Asn Cys Ala Arg Val Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val
 210 215 220

Val His Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln
 225 230 235 240

Asp Phe Ile Glu Ala Glu Asp Glu Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala
 245 250 255

Ile Thr Ser Asp Leu Leu Glu Ser Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr
 260 265 270

Leu Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val
 275 280 285

Leu Glu Arg Ile Met Gly Asp Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys
 290 295 300

Tyr His Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ala Ile Thr Gly Gly
 305 310 315 320

Ala Val Phe Glu Thr Met Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Glu
 325 330 335

Gly Asp Ser Ile Ser Ile Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp
 340 345 350

Ile Val Thr Lys Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Glu Val Leu Ile
 355 360 365

Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr
 370 375 380

Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ser Leu Lys
 385 390 395 400

Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser
 405 410 415

Asp Asp Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln
 420 425 430

ES 2 811 060 T3

Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Asn Gly
 435 440 445

Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr
 450 455 460

Arg Thr Ala Ile Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Val Arg Gly Ser Lys
 465 470 475 480

Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Gln Pro
 485 490 495

Ala Glu Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Arg Gln Asp Lys Arg Phe Ser
 500 505 510

Ile Phe Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Asp Leu Leu Thr
 515 520 525

Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys
 530 535 540

Gly Met Thr Asn Glu Glu Arg Glu Ile Leu Ile Gly Asp Lys Asn Ala
 545 550 555 560

Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Tyr Ile Gly
 565 570 575

Lys Gly Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly
 580 585 590

Ser Lys Ile Tyr Val Lys Gly Val Asn Glu Thr Leu Leu Val Asn Glu
 595 600 605

Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His
 610 615 620

Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Ile Pro Val Gly Asn Asp
 625 630 635 640

Gln Leu Leu Glu Leu Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys
 645 650 655

Phe Val Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Met Thr Val Tyr Arg
 660 665 670

Pro Ala Met Thr Lys Ile His Ile Glu Gly Glu Pro Asp Phe Arg Leu
 675 680 685

ES 2 811 060 T3

Ile Lys Glu Gly Glu Thr Val Thr Glu Val Ile His Gly Glu Pro Val
690 695 700

Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr
705 710 715 720

Glu Lys Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys
725 730 735

Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Gln
740 745 750

Lys Phe Leu Gln Lys Glu Val Ser Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly
755 760 765

Gly Asp Gly His Leu Phe Glu Asp Glu Ala Ile Lys Arg Leu Leu Gln
770 775 780

Gly Asp Thr Pro Ala Lys Lys Ile Gln Ala Asn Lys Arg Val Gln Gly
785 790 795 800

Ser Arg Arg Arg Ser Arg Glu Gly Arg Ser Gln
805 810

<210> 4

<211> 27

<212> PRT

5 <213> *Rattus sp.*

<400> 4

Thr Thr Lys Ile Ile Thr Lys Val Val Glu Pro Lys Ile Lys Val Ile
1 5 10 15

Glu Gly Ser Leu Gln Pro Ile Ile Lys Thr Glu
20 25

10 <210> 5

<211> 2436

<212> ADN

<213> *Rattus sp.*

15 <400> 5

atgggttcctc tcctgccctt atctgctctg ctgctgctgt tcctgtgtga cgttgacccc 60

gcaaatgccca acagttacta tgacaaggctc ctagctcaca gccgcatcag gggtcgggat 120

cagggcccaa atgtctgtgc cctccagcag attctgggca ccaaaaagaa atacttcagc 180

tcctgtaaga actggtatca aggtgctatc tgcgggaaga aaaccactgt gctatatgaa 240

ES 2 811 060 T3

tgctgccccg gctatatgag aatggaaggg atgaaaggct gccagcagct gatgccatt 300
 gaccatgttt atggcacgct gggcatcgtg ggagccacga cactcaaca ctattctgat 360
 gtctcgaagc tcaggaaga gattgaagga aaagggcct acacatactt cgcgccgagt 420
 aacgaagctt gggacaacct ggattccgac atccgcagag gactagagaa caatgtcaat 480
 gttgagttac tgaacgcttt acacagccac atggttaata agagaatgct aaccaaggac 540
 ctgaaacacg gcatggttat tccttcaatg tacaacaatc tggggctttt tatcaatcat 600
 tatcccaatg gggttgtcac tgtgaactgt gctcgagtaa tccacgggaa ccagattgcc 660
 acaaatggtg ttgtccatgt catcgaccgt gtccctgacac aaattggcac ctccatccaa 720
 gacttcattg aagcagaaga tgagctttca tcattcagag cggctgccat cacttctgac 780
 cttttggagt cccttgaag agacggtcac ttcacactct ttgctcccac caatgaggct 840
 ttcgagaaac tcccacgagg agtcctagaa aggatcatgg gagacaaagt ggcttctgaa 900
 gctctcatga agtaccacat cctgaatacc ctccagtgcct ctgaggctat cacaggagga 960
 gcggtgtttg agaccatgga aggaaacact attgaaatag ggtgtgaggg agacagcatc 1020
 tccattaacg gaatcaagat ggtgaacaag aaagacattg tgacgaagaa tgggtgtcatc 1080
 cacctgattg atgaagtcct cattcctgat tctgctaaac aagtattga gctggctgga 1140
 aaacagcaaa ccactttcac ggacctggtg gccagttag ggttggcgtc ttctctgaag 1200
 ccggatggag agtacacgct gttagcgcct gtgaacaatg cgttctctga tgacactctg 1260
 agcatggacc agcgccttct taagctaatt ctgcaaaatc acatattgaa agtaaaagtc 1320
 ggcccttagtg atctctacaa tggacagatt ctggagacca ttggaggcaa acaactccgt 1380
 gtcttcgtgt atcggacggc tatctgcata gaaaactcat gcatggtgag aggaagcaag 1440
 caggggagga acggtgccat tcacatattc cgagagatca tccaaccggc ggagaagtcc 1500
 ctgcacgaaa aactgcgcca agataagcgc ttcagcatct tcctcagcct cctcgaagct 1560
 gcagatctga aagatcttct gacacagccc ggagattgga ccttgtttgc accaaccaat 1620
 gatgccttca agggaatgac taatgaagaa agggagattc tgattgggga taaaaatgct 1680
 ctccaaaaca tcattcttta ccacctgacc ccaggggttt atattggaaa gggatttgaa 1740
 cccggagtca ccaacatcct gaagaccaca cagggagca aaatctatgt gaaaggagtc 1800
 aatgagacgc ttttggtgaa tgagttgaag tccaaagaat ctgacatcat gacaacaaac 1860
 ggcgtcattc acgttgtgga caaactcctc tatccagcag acattccggt tggaaatgat 1920
 cagctcttgg aattactgaa caaactgata aaatacatcc aaattaagtt cgttcgtggc 1980
 agcaccttca aagaaatccc catgactgtc tatagacctg caatgacgaa gatccacatt 2040
 gaaggcgagc ctgacttcag gctgattaaa gaaggtgaaa cagtgacaga agtgatccac 2100
 ggagaaccag tcattaataaa gtacaccaaa atcatagacg gggttcctgt tgaataaact 2160

ES 2 811 060 T3

gaaaaagaga cccgggaaga acgcatcatc acaggtcctg agataaaata cactaggatt 2220
 tccacaggag gtggggaaac agaagagacc ctgcagaaat tcttgcaaaa agaggtctcc 2280
 aaggtcacia agttcattga aggtggcgat ggtcacttat ttgaagatga ggcgattaaa 2340
 agactgcttc agggagacac acctgcaaag aagatacaag ccaacaaaag ggttcaaggg 2400
 tctagaaggc gatcaagaga aggccgttct cagtga 2436

<210> 6
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Rattus sp.*

5

<400> 6
 Glu Val Ser Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly Gly Asp Gly His Leu
 1 5 10 15

Phe Glu Asp Glu Ala Ile Lys Arg Leu Leu Gln Gly
 20 25

10

<210> 7
 <211> 783
 <212> PRT
 <213> *Rattus sp.*

15

<400> 7
 Met Val Pro Leu Leu Pro Leu Ser Ala Leu Leu Leu Leu Phe Leu Cys
 1 5 10 15

Asp Val Asp Pro Ala Asn Ala Asn Ser Tyr Tyr Asp Lys Val Leu Ala
 20 25 30

His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu
 35 40 45

Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Ser Cys Lys Asn
 50 55 60

Trp Tyr Gln Gly Ala Ile Cys Gly Lys Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu
 65 70 75 80

Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala
 85 90 95

Val Met Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala
 100 105 110

Thr Thr Thr Gln His Tyr Ser Asp Val Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile

ES 2 811 060 T3

115	120	125																					
Glu	Gly	Lys	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Phe	Ala	Pro	Ser	Asn	Glu	Ala	Trp								
130						135						140											
Asp	Asn	Leu	Asp	Ser	Asp	Ile	Arg	Arg	Gly	Leu	Glu	Asn	Asn	Val	Asn								
145						150						155											
Val	Glu	Leu	Leu	Asn	Ala	Leu	His	Ser	His	Met	Val	Asn	Lys	Arg	Met								
				165						170													
Leu	Thr	Lys	Asp	Leu	Lys	His	Gly	Met	Val	Ile	Pro	Ser	Met	Tyr	Asn								
				180						185						190							
Asn	Leu	Gly	Leu	Phe	Ile	Asn	His	Tyr	Pro	Asn	Gly	Val	Val	Thr	Val								
			195						200						205								
Asn	Cys	Ala	Arg	Val	Ile	His	Gly	Asn	Gln	Ile	Ala	Thr	Asn	Gly	Val								
		210						215						220									
Val	His	Val	Ile	Asp	Arg	Val	Leu	Thr	Gln	Ile	Gly	Thr	Ser	Ile	Gln								
225						230						235						240					
Asp	Phe	Ile	Glu	Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Ser	Ser	Phe	Arg	Ala	Ala	Ala								
				245						250						255							
Ile	Thr	Ser	Asp	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Gly	Arg	Asp	Gly	His	Phe	Thr								
				260						265						270							
Leu	Phe	Ala	Pro	Thr	Asn	Glu	Ala	Phe	Glu	Lys	Leu	Pro	Arg	Gly	Val								
			275						280						285								
Leu	Glu	Arg	Ile	Met	Gly	Asp	Lys	Val	Ala	Ser	Glu	Ala	Leu	Met	Lys								
		290						295						300									
Tyr	His	Ile	Leu	Asn	Thr	Leu	Gln	Cys	Ser	Glu	Ala	Ile	Thr	Gly	Gly								
305						310						315						320					
Ala	Val	Phe	Glu	Thr	Met	Glu	Gly	Asn	Thr	Ile	Glu	Ile	Gly	Cys	Glu								
				325						330						335							
Gly	Asp	Ser	Ile	Ser	Ile	Asn	Gly	Ile	Lys	Met	Val	Asn	Lys	Lys	Asp								
				340						345						350							
Ile	Val	Thr	Lys	Asn	Gly	Val	Ile	His	Leu	Ile	Asp	Glu	Val	Leu	Ile								
			355						360						365								

ES 2 811 060 T3

Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr
 370 375 380
 Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ser Leu Lys
 385 390 395 400
 Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser
 405 410 415
 Asp Asp Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln
 420 425 430
 Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Asn Gly
 435 440 445
 Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr
 450 455 460
 Arg Thr Ala Ile Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Val Arg Gly Ser Lys
 465 470 475 480
 Gln Gly Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Gln Pro
 485 490 495
 Ala Glu Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Arg Gln Asp Lys Arg Phe Ser
 500 505 510
 Ile Phe Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Asp Leu Leu Thr
 515 520 525
 Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys
 530 535 540
 Gly Met Thr Asn Glu Glu Arg Glu Ile Leu Ile Gly Asp Lys Asn Ala
 545 550 555 560
 Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Tyr Ile Gly
 565 570 575
 Lys Gly Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly
 580 585 590
 Ser Lys Ile Tyr Val Lys Gly Val Asn Glu Thr Leu Leu Val Asn Glu
 595 600 605
 Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His
 610 615 620

ES 2 811 060 T3

Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Ile Pro Val Gly Asn Asp
625 630 635 640

Gln Leu Leu Glu Leu Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys
645 650 655

Phe Val Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Met Thr Val Tyr Arg
660 665 670

Pro Ala Met Thr Lys Ile His Ile Glu Gly Glu Pro Asp Phe Arg Leu
675 680 685

Ile Lys Glu Gly Glu Thr Val Thr Glu Val Ile His Gly Glu Pro Val
690 695 700

Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr
705 710 715 720

Glu Lys Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys
725 730 735

Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Gln
740 745 750

Lys Phe Leu Gln Lys Asp Thr Pro Ala Lys Lys Ile Gln Ala Asn Lys
755 760 765

Arg Val Gln Gly Ser Arg Arg Arg Ser Arg Glu Gly Arg Ser Gln
770 775 780

<210> 8
<211> 2352
5 <212> ADN
<213> *Rattus sp.*

<400> 8
atggttcctc tctgcctt atctgctctg ctgctgctgt tctgtgtga cggtgacccc 60
gcaaatgcca acagttacta tgacaaggct ctagctcaca gccgcatcag gggtcgggat 120
cagggcccaa atgtctgtgc cctccagcag attctgggca ccaaaaagaa atacttcagc 180
tctgtgaaga actggtatca aggtgctatc tgcgggaaga aaaccactgt gctatatgaa 240
tgctgccccg gctatatgag aatggaagg atgaaaggct gccagcagt gatgccatt 300
gaccatgttt atggcacgct gggcatcgtg ggagccacga ccaactcaaca ctattctgat 360
gtctcgaagc tcaggaaga gattgaagga aaagggtcct acacatactt cgcgccgagt 420
aacgaagctt gggacaacct ggattccgac atccgcagag gactagagaa caatgtcaat 480

ES 2 811 060 T3

gttgagttac tgaacgcttt acacagccac atggttaata agagaatgct aaccaaggac 540
 ctgaaacacg gcatggttat tccttcaatg tacaacaatc tggggctttt tatcaatcat 600
 tatcccaatg gggttgtcac tgtgaactgt gctcgagtaa tccacgggaa ccagattgcc 660
 acaaatgggtg ttgtccatgt catcgaccgt gtcctgacac aaattggcac ctccatccaa 720
 gacttcattg aagcagaaga tgagctttca tcattcagag cggctgccat cacttctgac 780
 cttttggagt cccttgaag agacggtcac ttcacactct ttgctcccac caatgaggct 840
 ttcgagaaac tcccacgagg agtcctagaa aggatcatgg gagacaaagt ggcttctgaa 900
 gctctcatga agtaccacat cctgaatacc ctccagtgc ctgaggctat cacaggagga 960
 gcggtgtttg agaccatgga aggaaacact attgaaatag ggtgtgaggg agacagcatc 1020
 tccattaacg gaatcaagat ggtgaacaag aaagacattg tgacgaagaa tgggtgtcatc 1080
 cacctgattg atgaagtcct cattcctgat tctgctaaac aagttattga gctggctgga 1140
 aaacagcaaa ccactttcac ggacctggtg gccagttag ggttggcgtc ttctctgaag 1200
 ccggatggag agtacacgct gttagcgcct gtgaacaatg cgttctctga tgacactctg 1260
 agcatggacc agcgccttct taagctaatt ctgcaaaatc acatattgaa agtaaaagtc 1320
 ggccttagtg atctctacaa tggacagatt ctggagacca ttggaggcaa acaactccgt 1380
 gtcttcgtgt atcggacggc tatctgcata gaaaactcat gcatggtgag aggaagcaag 1440
 caggggagga acggtgccat tcacatattc cgagagatca tccaaccggc ggagaagtcc 1500
 ctgcacgaaa aactgcgcca agataagcgc ttcagcatct tcctcagcct cctcgaagct 1560
 gcagatctga aagatcttct gacacagccc ggagattgga ccttgtttgc accaaccaat 1620
 gatgccttca agggaatgac taatgaagaa agggagattc tgattgggga taaaaatgct 1680
 ctccaaaaca tcattcttta ccacctgacc ccaggggttt atattggaaa gggatttgaa 1740
 cccggagtca ccaacatcct gaagaccaca caggggaagca aaatctatgt gaaaggagtc 1800
 aatgagacgc ttttgggtgaa tgagttgaag tccaaagaat ctgacatcat gacaacaaac 1860
 ggcgtcattc acgttgtgga caaactcctc tatccagcag acattccggt tggaaatgat 1920
 cagctcttgg aattactgaa caaactgata aaatacatcc aaattaagtt cgttcgtggc 1980
 agcaccttca aagaaatccc catgactgtc tatagacctg caatgacgaa gatccacatt 2040
 gaaggcgagc ctgacttcag gctgattaaa gaaggtgaaa cagtgcacaga agtgatccac 2100
 ggagaaccag tcattaataaa gtacacccaaa atcatagacg gggttcctgt tgaaataact 2160
 gaaaaagaga cccgggaaga acgcatcatc acaggtcctg agataaaaata cactaggatt 2220
 tccacaggag gtggggaaac agaagagacc ctgcagaaat tcttgcaaaa agacacacct 2280
 gcaaagaaga tacaagccaa caaaagggtt caaggttcta gaaggcgatc aagagaaggc 2340
 cgttctcagt ga 2352

ES 2 811 060 T3

<210> 9
 <211> 811
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 9
 Met Val Pro Leu Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Leu Leu Leu Phe Leu Cys
 1 5 10 15

 Asp Ile Asn Pro Ala Asn Ala Asn Ser Tyr Tyr Asp Lys Val Leu Ala
 20 25 30

 His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu
 35 40 45

 Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Ser Cys Lys Asn
 50 55 60

 Trp Tyr Gln Gly Ala Ile Cys Gly Lys Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu
 65 70 75 80

 Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala
 85 90 95

 Val Met Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala
 100 105 110

 Thr Thr Thr Gln His Tyr Ser Asp Val Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile
 115 120 125

 Glu Gly Lys Gly Ser Tyr Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp
 130 135 140

 Glu Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Asn Asn Val Asn
 145 150 155 160

 Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Val Asn Lys Arg Met
 165 170 175

 Leu Thr Lys Asp Leu Lys His Gly Met Val Ile Pro Ser Met Tyr Asn
 180 185 190

 Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val
 195 200 205

 Asn Cys Ala Arg Val Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val
 210 215 220

ES 2 811 060 T3

Val His Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln
 225 230 235 240
 Asp Phe Leu Glu Ala Glu Asp Asp Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala
 245 250 255
 Ile Thr Ser Asp Leu Leu Glu Ser Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr
 260 265 270
 Leu Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val
 275 280 285
 Leu Glu Arg Ile Met Gly Asp Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys
 290 295 300
 Tyr His Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ala Ile Thr Gly Gly
 305 310 315 320
 Ala Val Phe Glu Thr Met Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Glu
 325 330 335
 Gly Asp Ser Ile Ser Ile Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp
 340 345 350
 Ile Val Thr Lys Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Glu Val Leu Ile
 355 360 365
 Pro Asp Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr
 370 375 380
 Thr Phe Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ser Leu Lys
 385 390 395 400
 Pro Asp Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser
 405 410 415
 Asp Asp Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln
 420 425 430
 Asn His Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Ser Asp Leu Tyr Asn Gly
 435 440 445
 Gln Ile Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr
 450 455 460
 Arg Thr Ala Ile Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Val Arg Gly Ser Lys

ES 2 811 060 T3

Glu Lys Gln Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys
 725 730 735

Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Gly Glu Thr Leu Gln
 740 745 750

Lys Phe Leu Gln Lys Glu Val Ser Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly
 755 760 765

Gly Asp Gly His Leu Phe Glu Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln
 770 775 780

Gly Asp Thr Pro Ala Lys Lys Ile Pro Ala Asn Lys Arg Val Gln Gly
 785 790 795 800

Pro Arg Arg Arg Ser Arg Glu Gly Arg Ser Gln
 805 810

<210> 10
 <211> 2436
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 10
 atggttcctc tcctgccctt atatgctctg ctgctgctgt tcctgtgtga tattaaccct 60
 gcaaatgccca acagttacta tgacaaggct ctggctcaca gccgcatcag gggtcgggat 120
 cagggcccaa acgtctgtgc cctccagcaa attctgggca ccaaaaagaa atacttcagc 180
 tcctgtaaga actggtatca aggtgctatc tgcggaaga aaaccactgt gctatatgaa 240
 tgctgccctg gctatatgag aatggaagg atgaaaggct gccccgcagt gatgcctatt 300
 gaccatgttt atggcacgct gggcattgtg ggagccacta cactcagca ctactccgat 360
 gtctcgaagc tgagagaaga gattgaagga aaagggtcat acacgtactt cgcgccgagt 420
 aacgaggctt gggagaacct ggattctgac attcgcagag gactggagaa caatgtcaat 480
 gttgagctac tgaatgcctt acacagccac atggttaata agagaatggt aaccaaggac 540
 ctgaaacacg gcatggttat tccttcaatg tacaacaatc tggggctttt tattaacct 600
 tatcccaatg gggttgtcac tgtgaactgt gctcgagtca tccatgggaa ccagattgcc 660
 acaaatgggtg tcgtccatgt cattgaccgt gtcctgacac aaattggtac ctccatccaa 720
 gacttccttg aagcagaaga cgaccttca tcatttagag cagccgcat cacctctgac 780
 ctcttgaggt cccttggaag agatggtcac ttcacgctct ttgctcccac caatgaagct 840
 ttcgagaaac tgccacgagg tgcctagaa aggatcatgg gagacaaagt ggcttctgaa 900
 gctctcatga agtaccacat cctaaatacc ctccagtgtct ctgaggccat cactggagga 960
 gccgtgtttg agaccatgga aggaaacact attgagatag ggtgcgaagg ggacagtatc 1020

ES 2 811 060 T3

tccattaacg gaatcaagat ggtgaacaag aaagacattg tgactaagaa tgggtgtcatc 1080
cacctgattg atgaagtccct cattcctgat tctgccaac aagttattga gctggctgga 1140
aacagcaaaa ccactttcac cgacctgga gcccaattag gcttggcatc ctctctgaag 1200
ccagatggag agtacacctt attagcacct gtgaacaatg cgttctctga tgacactctg 1260
agcatggacc aacgccttct taagctaatt ctgcaaaatc acatattgaa agtaaaagtt 1320
ggccttagcg acctctacaa tggacagata ctggaaacca ttggaggcaa acaactccga 1380
gtctttgtgt atcggacggc tatctgcata gaaaactcat gcatggtgag aggaagcaag 1440
caggggaagga atggtgccat tcacatattc cgagaaatca tccaaccagc agagaaatcc 1500
ctgcacgaca agctgcggca agacaagcgc tttagcatct tcctcagcct ccttgaagct 1560
gcagatttga aagatctcct gacacagccc ggagattgga ccttgtttgc accaaccaat 1620
gatgccttca agggaatgac tagcgaagaa agggagcttc tgattgggga taaaaatgct 1680
ctccaaaaca tcattcttta tcacctgacc ccagggggtt atattggaaa gggattcgaa 1740
cccggagtca ctaatatcct gaagaccaca caggggaagca aaatctatct gaaaggagta 1800
aacgaaacgc ttctagttaa tgagttgaag tccaaagaat ctgacatcat gacgacaaat 1860
ggtgtcatcc acgtcgtgga caaactcctc tatccagcag atattccagt tggaaatgat 1920
cagctcttgg aattactgaa caaactgata aaatacatcc aaatcaagtt tgttcgtggc 1980
agcaccttca aagaaatccc catgactgtc tatagacctg caatgacgaa gatccaaatt 2040
gaaggtgatc ccgacttcag gctgattaa gaaggcgaag cggtgacaga agtgatccac 2100
ggagagccag tcattaaaaa gtacaccaaa atcatagatg gagttcctgt tgaataaact 2160
gaaaaacaga ctcgggaaga acgaatcatt acaggtcctg agataaaata taccaggatt 2220
tccacaggag gtggagaaac aggagagacc ttgcagaaat tcttgcaaaa agaggtctcc 2280
aaggtcacia agttcattga aggtggcgat ggtcacttat ttgaagatga ggagattaa 2340
agactgcttc agggagacac acctgcaaag aagataccag ccaacaaaag ggttcaaggg 2400
cctagaagac gatcaagaga aggccgttct cagtga 2436

<210> 11

<211> 783

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

5

<400> 11

Met Val Pro Leu Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Leu Leu Leu Phe Leu Cys
1 5 10 15

Asp Ile Asn Pro Ala Asn Ala Asn Ser Tyr Tyr Asp Lys Val Leu Ala
20 25 30

ES 2 811 060 T3

His Ser Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu
 35 40 45
 Gln Gln Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Ser Cys Lys Asn
 50 55 60
 Trp Tyr Gln Gly Ala Ile Cys Gly Lys Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu
 65 70 75 80
 Cys Cys Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala
 85 90 95
 Val Met Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala
 100 105 110
 Thr Thr Thr Gln His Tyr Ser Asp Val Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile
 115 120 125
 Glu Gly Lys Gly Ser Tyr Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp
 130 135 140
 Glu Asn Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Asn Asn Val Asn
 145 150 155 160
 Val Glu Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Val Asn Lys Arg Met
 165 170 175
 Leu Thr Lys Asp Leu Lys His Gly Met Val Ile Pro Ser Met Tyr Asn
 180 185 190
 Asn Leu Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val
 195 200 205
 Asn Cys Ala Arg Val Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val
 210 215 220
 Val His Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln
 225 230 235 240
 Asp Phe Leu Glu Ala Glu Asp Asp Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala
 245 250 255
 Ile Thr Ser Asp Leu Leu Glu Ser Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr
 260 265 270
 Leu Phe Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val

ES 2 811 060 T3

Gln Pro Gly Asp Trp Thr Leu Phe Ala Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys
530 535 540

Gly Met Thr Ser Glu Glu Arg Glu Leu Leu Ile Gly Asp Lys Asn Ala
545 550 555 560

Leu Gln Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Tyr Ile Gly
565 570 575

Lys Gly Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly
580 585 590

Ser Lys Ile Tyr Leu Lys Gly Val Asn Glu Thr Leu Leu Val Asn Glu
595 600 605

Leu Lys Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His
610 615 620

Val Val Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Ile Pro Val Gly Asn Asp
625 630 635 640

Gln Leu Leu Glu Leu Leu Asn Lys Leu Ile Lys Tyr Ile Gln Ile Lys
645 650 655

Phe Val Arg Gly Ser Thr Phe Lys Glu Ile Pro Met Thr Val Tyr Arg
660 665 670

Pro Ala Met Thr Lys Ile Gln Ile Glu Gly Asp Pro Asp Phe Arg Leu
675 680 685

Ile Lys Glu Gly Glu Thr Val Thr Glu Val Ile His Gly Glu Pro Val
690 695 700

Ile Lys Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr
705 710 715 720

Glu Lys Gln Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys
725 730 735

Tyr Thr Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Gly Glu Thr Leu Gln
740 745 750

Lys Phe Leu Gln Lys Asp Thr Pro Ala Lys Lys Ile Pro Ala Asn Lys
755 760 765

Arg Val Gln Gly Pro Arg Arg Arg Ser Arg Glu Gly Arg Ser Gln
770 775 780

ES 2 811 060 T3

<210> 12
 <211> 2352
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 12
 atggttcctc tcctgccctt atatgctctg ctgctgctgt tcctgtgtga tattaaccct 60
 gcaaatgcc aacagttacta tgacaaggct ctggctcaca gccgcatcag gggtcgggat 120
 cagggcccaa acgtctgtgc cctccagcaa attctgggca ccaaaaagaa atacttcagc 180
 tcctgtaaga actggtatca aggtgctatc tgcgggaaga aaaccactgt gctatatgaa 240
 tgctgccctg gctatatgag aatggaaggg atgaaaggct gccccgcagt gatgcctatt 300
 gaccatgttt atggcacgct gggcattgtg ggagccacta cactcagca ctactccgat 360
 gtctcgaagc tgagagaaga gattgaagga aaagggtcat acacgtactt cgcgccgagt 420
 aacgaggctt gggagaacct ggattctgac attcgcagag gactggagaa caatgtcaat 480
 gttgagctac tgaatgcctt acacagccac atggttaata agagaatggt aaccaaggac 540
 ctgaaacacg gcatggttat tccttcaatg tacaacaatc tggggctttt tattaacat 600
 tatcccaatg gggttgtcac tgtgaactgt gctcgagtca tccatgggaa ccagattgcc 660
 acaaatggtg tcgtccatgt cattgaccgt gtcttgacac aaattggtac ctccatccaa 720
 gacttccttg aagcagaaga cgaccttca tcatttagag cagccgcat cacctctgac 780
 ctcttgaggt cccttggaag agatggtcac ttcacgctct ttgctccac caatgaagct 840
 ttcgagaaac tgccacgagg tgcctagaa aggatcatgg gagacaaagt ggcttctgaa 900
 gctctcatga agtaccacat cctaaatacc ctccagtgt ctgaggccat cactggagga 960
 gccgtgtttg agaccatgga aggaaacact attgagatag ggtgcgaagg ggacagtatc 1020
 tccattaacg gaatcaagat ggtgaacaag aaagacattg tgactaagaa tgggtgtcatc 1080
 cacctgattg atgaagtcct cattcctgat tctgccaac aagttattga gctggctgga 1140
 aaacagcaaa ccactttcac cgacctgga gcccaattag gcttggcatc ctctctgaag 1200
 ccagatggag agtacacctt attagcacct gtgaacaatg cgttctctga tgacactctg 1260
 agcatggacc aacgccttct taagctaatt ctgcaaaatc acatattgaa agtaaaagtt 1320
 ggccttagcg acctctacaa tggacagata ctggaaacca ttggaggcaa acaactccga 1380
 gtctttgtgt atcggacggc tatctgcata gaaaactcat gcatggtgag aggaagcaag 1440
 cagggaagga atggtgccat tcacatattc cgagaaatca tccaaccagc agagaaatcc 1500
 ctgcacgaca agctgcggca agacaagcgc tttagcatct tcctcagcct ccttgaagct 1560
 gcagatttga aagatctcct gacacagccc ggagattgga ccttgtttgc accaaccaat 1620
 gatgccttca agggaatgac tagcgaagaa agggagcttc tgattgggga taaaaatgct 1680

ES 2 811 060 T3

ctccaaaaca tcattcttta tcacctgacc ccagggggtt atattggaaa gggattcgaa 1740
cccggagtca ctaatatcct gaagaccaca caggggaagca aaatctatct gaaaggagta 1800
aacgaaacgc ttctagttaa tgagttgaag tccaagaat ctgacatcat gacgacaaat 1860
gggtgcatcc acgtcgtgga caaactcctc tatccagcag atattccagt tggaaatgat 1920
cagctcttgg aattactgaa caaactgata aaatacatcc aaatcaagtt tgttcgtggc 1980
agcaccttca aagaaatccc catgactgtc tatagacctg caatgacgaa gatccaaatt 2040
gaaggtgatc ccgacttcag gctgattaa gaaggcгаа cggtgacaga agtgatccac 2100
ggagagccag tcattaataaa gtacaccaaa atcatagatg gagttcctgt tgaataaact 2160
gaaaaacaga ctcgggaaga acgaatcatt acaggtcctg agataaata taccaggatt 2220
tccacaggag gtggagaaac aggagagacc ttgcagaaat tcttgcaaaa agacacacct 2280
gcaaagaaga taccagccaa caaaagggtt caagggccta gaagacgatc aagagaaggc 2340
cgttctcagt ga 2352

<210> 13
<211> 809
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 13
Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu Ile Val
1 5 10 15
Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser
20 25 30
Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln
35 40 45
Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr
50 55 60
Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys
65 70 75 80
Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu
85 90 95
Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala Thr Thr
100 105 110
Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile Glu Gly
115 120 125

ES 2 811 060 T3

Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Asp Asn
130 135 140

Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val Asn Val Glu
145 150 155 160

Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Ile Asn Lys Arg Met Leu Thr
165 170 175

Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr Asn Asn Leu
180 185 190

Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val Asn Cys
195 200 205

Ala Arg Ile Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His
210 215 220

Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln Asp Phe
225 230 235 240

Ile Glu Ala Glu Asp Asp Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ile Thr
245 250 255

Ser Asp Ile Leu Glu Ala Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr Leu Phe
260 265 270

Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val Leu Glu
275 280 285

Arg Ile Met Gly Asp Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys Tyr His
290 295 300

Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ser Ile Met Gly Gly Ala Val
305 310 315 320

Phe Glu Thr Leu Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Asp Gly Asp
325 330 335

Ser Ile Thr Val Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val
340 345 350

Thr Asn Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Gln Val Leu Ile Pro Asp
355 360 365

Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr Thr Phe
370 375 380

ES 2 811 060 T3

Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ala Leu Arg Pro Asp
385 390 395 400

Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser Asp Asp
405 410 415

Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln Asn His
420 425 430

Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Asn Gly Gln Ile
435 440 445

Leu Glu Thr Ile Gly Gly Lys Gln Leu Arg Val Phe Val Tyr Arg Thr
450 455 460

Ala Val Cys Ile Glu Asn Ser Cys Met Glu Lys Gly Ser Lys Gln Gly
465 470 475 480

Arg Asn Gly Ala Ile His Ile Phe Arg Glu Ile Ile Lys Pro Ala Glu
485 490 495

Lys Ser Leu His Glu Lys Leu Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ser Thr Phe
500 505 510

Leu Ser Leu Leu Glu Ala Ala Asp Leu Lys Glu Leu Leu Thr Gln Pro
515 520 525

Gly Asp Trp Thr Leu Phe Val Pro Thr Asn Asp Ala Phe Lys Gly Met
530 535 540

Thr Ser Glu Glu Lys Glu Ile Leu Ile Arg Asp Lys Asn Ala Leu Gln
545 550 555 560

Asn Ile Ile Leu Tyr His Leu Thr Pro Gly Val Phe Ile Gly Lys Gly
565 570 575

Phe Glu Pro Gly Val Thr Asn Ile Leu Lys Thr Thr Gln Gly Ser Lys
580 585 590

Ile Phe Leu Lys Glu Val Asn Asp Thr Leu Leu Val Asn Glu Leu Lys
595 600 605

Ser Lys Glu Ser Asp Ile Met Thr Thr Asn Gly Val Ile His Val Val
610 615 620

Asp Lys Leu Leu Tyr Pro Ala Asp Thr Pro Val Gly Asn Asp Gln Leu

ES 2 811 060 T3

625		630		635		640									
Leu	Glu	Ile	Leu	Asn	Lys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ile	Gln	Ile	Lys	Phe	Val
			645					650						655	
Arg	Gly	Ser	Thr	Phe	Lys	Glu	Ile	Pro	Val	Thr	Val	Tyr	Arg	Pro	Thr
			660					665					670		
Leu	Thr	Lys	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Glu	Pro	Glu	Phe	Arg	Leu	Ile	Lys
		675					680					685			
Glu	Gly	Glu	Thr	Ile	Thr	Glu	Val	Ile	His	Gly	Glu	Pro	Ile	Ile	Lys
	690					695					700				
Lys	Tyr	Thr	Lys	Ile	Ile	Asp	Gly	Val	Pro	Val	Glu	Ile	Thr	Glu	Lys
705					710					715					720
Glu	Thr	Arg	Glu	Glu	Arg	Ile	Ile	Thr	Gly	Pro	Glu	Ile	Lys	Tyr	Thr
				725					730					735	
Arg	Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Gly	Glu	Thr	Glu	Glu	Thr	Leu	Lys	Lys	Leu
			740					745					750		
Leu	Gln	Glu	Glu	Val	Thr	Lys	Val	Thr	Lys	Phe	Ile	Glu	Gly	Gly	Asp
		755					760					765			
Gly	His	Leu	Phe	Glu	Asp	Glu	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Leu	Gln	Gly	Asp
	770					775					780				
Thr	Pro	Val	Arg	Lys	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Lys	Val	Gln	Gly	Ser	Arg
785					790					795					800
Arg	Arg	Leu	Arg	Glu	Gly	Arg	Ser	Gln							
				805											

<210> 14
 <211> 2430
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14	
atgattccct ttttaccat gttttctcta ctattgctgc ttattgtaa ccctataaac	60
gccacaatc attatgacaa gatcttgct catagtcgta tcaggggtcg ggaccaaggc	120
ccaaatgtct gtgcccttca acagattttg ggcacacaaa agaaatactt cagcacttgt	180
aagaactggt ataaaaagtc catctgtgga cagaaaacga ctgtgttata tgaatgttgc	240
cctggttata tgagaatgga aggaatgaaa ggctgccag cagttttgcc cattgaccat	300

ES 2 811 060 T3

gtttatggca ctctgggcat cgtgggagcc accacaacgc agcgctattc tgacgcctca 360
 aaactgaggg aggagatcga gggaaagggg tccttcactt actttgcacc gagtaatgag 420
 gcttgggaca acttggattc tgatatccgt agaggtttgg agagcaacgt gaatgttgaa 480
 ttactgaatg ctttacatag tcacatgatt aataagagaa tgttgaccaa ggacttaaaa 540
 aatggcatga ttattccttc aatgtataac aatttggggc ttttcattaa ccattatcct 600
 aatggggttg tcaactgtaa ttgtgctcga atcatccatg ggaaccagat tgcaacaaat 660
 ggtgttgtcc atgtcattga ccgtgtgctt acacaaattg gtacctcaat tcaagacttc 720
 attgaagcag aagatgacct ttcactcttt agagcagctg ccatcacatc ggacatattg 780
 gaggcccttg gaagagacgy tcacttcaca ctctttgctc ccaccaatga ggcttttgag 840
 aaacttccac gaggtgtcct agaaaggatc atgggagaca aagtggcttc cgaagctctt 900
 atgaagtacc acatcttaaa tactctccag tgttctgagt ctattatggg aggagcagtc 960
 tttgagacgc tggaagaaa tacaattgag ataggatgtg acggtgacag tataacagta 1020
 aatggaatca aaatggtgaa caaaaaggat attgtgacaa ataatggtgt gatccatttg 1080
 attgatcagg tcctaattcc tgattctgcc aaacaagtta ttgagctggc tggaaaacag 1140
 caaaccacct tcacggatct tgtggcccaa ttaggcttgg catctgctct gaggccagat 1200
 ggagaataca ctttgctggc acctgtgaat aatgcatttt ctgatgatac tctcagcatg 1260
 gatcagcgcc tccttaaatt aattctgcag aatcacatat tgaaagtaaa agttggcctt 1320
 aatgagcttt acaacgggca aatactggaa accatcggag gcaaacagct cagagtcttc 1380
 gtatatcgta cagctgtctg cattgaaaat tcatgcatgg agaaagggag taagcaaggg 1440
 agaaacggtg cgattcacat attccgcgag atcatcaagc cagcagagaa atccctccat 1500
 gaaaagttaa aacaagataa gcgcttttagc accttcctca gcctacttga agctgcagac 1560
 ttgaaagagc tcctgacaca acctggagac tggacattat ttgtgccaac caatgatgct 1620
 ttttaagggaa tgactagtga agaaaaagaa attctgatac gggacaaaaa tgctcttcaa 1680
 aacatcattc tttatcacct gacaccagga gttttcattg gaaaaggatt tgaacctggt 1740
 gttactaaca ttttaagac cacacaagga agcaaatct ttctgaaaga agtaaatgat 1800
 acacttctgg tgaatgaatt gaaatcaaaa gaatctgaca tcatgacaac aaatggtgta 1860
 attcatgttg tagataaact cctctatcca gcagacacac ctggttgaaa tgatcaactg 1920
 ctggaaatac ttaataaatt aatcaaatac atccaaatta agtttgttcg tggtagcacc 1980
 ttcaaagaaa tccccgtgac tgtctataga cccacactaa caaaagtcaa aattgaaggt 2040
 gaacctgaat tcagactgat taaagaaggt gaacaataa ctgaagtgat ccatggagag 2100
 ccaattatta aaaaatacac caaaatcatt gatggagtgc ctgtggaaat aactgaaaaa 2160
 gagacacgag aagaacgaat cattacaggt cctgaaataa aatacactag gatttctact 2220

ES 2 811 060 T3

ggaggtggag aaacagaaga aactctgaag aaattgttac aagaagaggt caccaaggtc 2280
 accaaattca ttgaaggtgg tgatgggtcat ttatttgaag atgaagaaat taaaagactg 2340
 cttcagggag acacacccgt gaggaagttg caagccaaca aaaaagttca aggatctaga 2400
 agacgattaa gggaaggtcg ttctcagtga 2430

<210> 15

<211> 781

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Met Ile Pro Phe Leu Pro Met Phe Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ile Val
 1 5 10 15

Asn Pro Ile Asn Ala Asn Asn His Tyr Asp Lys Ile Leu Ala His Ser
 20 25 30

Arg Ile Arg Gly Arg Asp Gln Gly Pro Asn Val Cys Ala Leu Gln Gln
 35 40 45

Ile Leu Gly Thr Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Thr Cys Lys Asn Trp Tyr
 50 55 60

Lys Lys Ser Ile Cys Gly Gln Lys Thr Thr Val Leu Tyr Glu Cys Cys
 65 70 75 80

Pro Gly Tyr Met Arg Met Glu Gly Met Lys Gly Cys Pro Ala Val Leu
 85 90 95

Pro Ile Asp His Val Tyr Gly Thr Leu Gly Ile Val Gly Ala Thr Thr
 100 105 110

Thr Gln Arg Tyr Ser Asp Ala Ser Lys Leu Arg Glu Glu Ile Glu Gly
 115 120 125

Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Phe Ala Pro Ser Asn Glu Ala Trp Asp Asn
 130 135 140

Leu Asp Ser Asp Ile Arg Arg Gly Leu Glu Ser Asn Val Asn Val Glu
 145 150 155 160

Leu Leu Asn Ala Leu His Ser His Met Ile Asn Lys Arg Met Leu Thr
 165 170 175

Lys Asp Leu Lys Asn Gly Met Ile Ile Pro Ser Met Tyr Asn Asn Leu
 180 185 190

ES 2 811 060 T3

Gly Leu Phe Ile Asn His Tyr Pro Asn Gly Val Val Thr Val Asn Cys
 195 200 205

Ala Arg Ile Ile His Gly Asn Gln Ile Ala Thr Asn Gly Val Val His
 210 215 220

Val Ile Asp Arg Val Leu Thr Gln Ile Gly Thr Ser Ile Gln Asp Phe
 225 230 235 240

Ile Glu Ala Glu Asp Asp Leu Ser Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ile Thr
 245 250 255

Ser Asp Ile Leu Glu Ala Leu Gly Arg Asp Gly His Phe Thr Leu Phe
 260 265 270

Ala Pro Thr Asn Glu Ala Phe Glu Lys Leu Pro Arg Gly Val Leu Glu
 275 280 285

Arg Ile Met Gly Asp Lys Val Ala Ser Glu Ala Leu Met Lys Tyr His
 290 295 300

Ile Leu Asn Thr Leu Gln Cys Ser Glu Ser Ile Met Gly Gly Ala Val
 305 310 315 320

Phe Glu Thr Leu Glu Gly Asn Thr Ile Glu Ile Gly Cys Asp Gly Asp
 325 330 335

Ser Ile Thr Val Asn Gly Ile Lys Met Val Asn Lys Lys Asp Ile Val
 340 345 350

Thr Asn Asn Gly Val Ile His Leu Ile Asp Gln Val Leu Ile Pro Asp
 355 360 365

Ser Ala Lys Gln Val Ile Glu Leu Ala Gly Lys Gln Gln Thr Thr Phe
 370 375 380

Thr Asp Leu Val Ala Gln Leu Gly Leu Ala Ser Ala Leu Arg Pro Asp
 385 390 395 400

Gly Glu Tyr Thr Leu Leu Ala Pro Val Asn Asn Ala Phe Ser Asp Asp
 405 410 415

Thr Leu Ser Met Asp Gln Arg Leu Leu Lys Leu Ile Leu Gln Asn His
 420 425 430

Ile Leu Lys Val Lys Val Gly Leu Asn Glu Leu Tyr Asn Gly Gln Ile

ES 2 811 060 T3

Glu Gly Glu Thr Ile Thr Glu Val Ile His Gly Glu Pro Ile Ile Lys
 690 695 700

Lys Tyr Thr Lys Ile Ile Asp Gly Val Pro Val Glu Ile Thr Glu Lys
 705 710 715 720

Glu Thr Arg Glu Glu Arg Ile Ile Thr Gly Pro Glu Ile Lys Tyr Thr
 725 730 735

Arg Ile Ser Thr Gly Gly Gly Glu Thr Glu Glu Thr Leu Lys Lys Leu
 740 745 750

Leu Gln Glu Asp Thr Pro Val Arg Lys Leu Gln Ala Asn Lys Lys Val
 755 760 765

Gln Gly Ser Arg Arg Arg Leu Arg Glu Gly Arg Ser Gln
 770 775 780

<210> 16
 <211> 2346
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16
 atgattccct ttttaccat gttttctcta ctattgctgc ttattgtaa ccctataaac 60
 gccacaatc attatgaca gatcttggct catagtcgta tcaggggtcg ggaccaaggc 120
 ccaaagtct gtgcccttca acagattttg ggcacaaaa agaaatactt cagcacttgt 180
 aagaactggt ataaaaagt catctgtgga cagaaaacga ctgtgttata tgaatgttgc 240
 cctggttata tgagaatgga aggaatgaaa ggctgcccag cagttttgcc cattgaccat 300
 gtttatggca ctctgggcat cgtgggagcc accacaacgc agcgctattc tgacgcctca 360
 aaactgaggg aggagatcga gggaaagga tccttcactt actttgcacc gagtaatgag 420
 gcttgggaca acttggattc tgatatccgt agaggtttg agagcaacgt gaatgttgaa 480
 ttactgaatg ctttaccatg tcacatgatt aataagagaa tgttgaccaa ggacttaaaa 540
 aatggcatga ttattccttc aatgtataac aatttggggc ttttcattaa ccattatcct 600
 aatggggttg tcaactgtaa ttgtgctcga atcatccatg ggaaccagat tgcaacaaat 660
 ggtgttgtcc atgtcattga ccgtgtgctt acacaaattg gtacctcaat tcaagacttc 720
 attgaagcag aagatgacct ttcattttt agagcagctg ccatcacatc ggacatattg 780
 gaggcccttg gaagagacg tcacttcaca ctctttgctc ccaccaatga ggcttttgag 840
 aaacttccac gaggtgtcct agaaaggatc atgggagaca aagtggcttc cgaagctctt 900
 atgaagtacc acatcttaaa tactctccag tgttctgagt ctattatggg aggagcagtc 960
 tttgagacgc tggaaggaaa tacaattgag ataggatgtg acggtgacag tataacagta 1020

ES 2 811 060 T3

aatggaatca aaatggtgaa caaaaaggat attgtgacaa ataatggtgt gatccatttg 1080
attgatcagg tcctaattcc tgattctgcc aaacaagtta ttgagctggc tggaaaacag 1140
caaaccacct tcacggatct tgtggcccaa ttaggcttgg catctgctct gaggccagat 1200
ggagaataca ctttgctggc acctgtgaat aatgcatttt ctgatgatac tctcagcatg 1260
gatcagcgcc tccttaaatt aattctgcag aatcacatat tgaaagtaaa agttggcctt 1320
aatgagcttt acaacgggca aatactggaa accatcggag gcaaacagct cagagtcttc 1380
gtatatcgta cagctgtctg cattgaaaat tcatgcatgg agaaagggag taagcaaggg 1440
agaaacggtg cgattcacat attccgcgag atcatcaagc cagcagagaa atccctccat 1500
gaaaagttaa aacaagataa gcgctttagc accttcctca gcctacttga agctgcagac 1560
ttgaaagagc tcctgacaca acctggagac tggacattat ttgtgccaac caatgatgct 1620
ttaaagggaa tgactagtga agaaaaagaa attctgatac gggacaaaaa tgctcttcaa 1680
aacatcattc tttatcacct gacaccagga gttttcattg gaaaaggatt tgaacctggt 1740
gttactaaca ttttaaagac cacacaagga agcaaaatct ttctgaaaga agtaaatgat 1800
acacttctgg tgaatgaatt gaaatcaaaa gaatctgaca tcatgacaac aatggtgta 1860
attcatgttg tagataaact cctctatcca gcagacacac ctggttgaaa tgatcaactg 1920
ctggaaatac ttaataaatt aatcaaatac atccaaatta agtttgttcg tggtagcacc 1980
ttcaaagaaa tccccgtgac tgtctataga cccacactaa caaaagtcaa aattgaaggt 2040
gaacctgaat tcagactgat taaagaaggt gaaacaataa ctgaagtgat ccatggagag 2100
ccaattatta aaaaatacac caaatcatt gatggagtgc ctgtggaaat aactgaaaaa 2160
gagacacgag aagaacgaat cattacaggt cctgaaataa aatacactag gatttctact 2220
ggaggtggag aaacagaaga aactctgaag aaattgttac agaagacac acccgtgagg 2280
aagttgcaag ccaacaaaaa agttcaagga tctagaagac gattaaggga aggtcgttct 2340
cagtga 2346

<210> 17

<211> 28

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 17

Glu Val Ser Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly Gly Asp Gly His Leu
1 5 10 15

Phe Glu Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln Gly
20 25

10

ES 2 811 060 T3

<210> 18
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 18
 Glu Val Thr Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly Gly Asp Gly His Leu
 1 5 10 15
 Phe Glu Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln Gly
 20 25
 10 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 19
 Val Thr Lys Val Thr Lys
 1 5
 20 <210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 20
 Phe Glu Asp Glu Glu Ile Lys
 1 5
 30 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 21
 Thr Lys Val Thr Lys
 35 1 5
 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 22
 Gln Gly Asp Thr Pro Val Arg Lys
 45 1 5
 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Cebador 1
 <400> 23
 55 gttcattgaa ggtggc gatg gtc 23

<210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 2
 10 <400> 24
 gagataaaat ccctgcatgg tcct 24

 <210> 25
 <211> 25
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador 3
 20 <400> 25
 cacggtcgat gacatggaca acacc 25

 <210> 26
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25

 <220>
 <223> Cebador 4
 30 <400> 26
 acggagctca gggctgaaga tg 22

 <210> 27
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Artificial
 35

 <220>
 <223> Cebador 5
 40 <400> 27
 aagctagcga agatggtcc tctcctgcc t 31
 45

 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50

 <220>
 <223> Cebador 6
 <400> 28
 55 ctttgggtt ttccagcctc 20

 <210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 60 <213> Artificial

ES 2 811 060 T3

<220>

<223> Cebador 7

<400> 29

5 ccccatgact gtctatagac ct 22

<210> 30

<211> 22

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador 8

15 <400> 30

atttcctta aaaatcagat tg 22

<210> 31

<211> 29

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

25 <223> péptido antigénico del ejemplo 6

<400> 31

Cys Glu Val Thr Lys Val Thr Lys Phe Ile Glu Gly Gly Asp Gly His
1 5 10 15

Leu Phe Glu Asp Glu Glu Ile Lys Arg Leu Leu Gln Gly
20 25

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une a uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido codificado por el exón-21 de periostina que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 para su uso en la prevención o el tratamiento, a través de la inhibición de una isoforma de periostina que tiene actividad de adhesión celular, de una enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada la isoforma de periostina, en el que la enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada la isoforma de periostina es una enfermedad seleccionada de esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, periodontosis, dermatitis atópica, asma, retinopatía diabética, arteriosclerosis, enterocolitis inflamatoria, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma, aneurisma y osteoartritis.
2. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad asociada a inflamación en la que está implicada la isoforma de periostina es una enfermedad seleccionada de polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, periodontosis, retinopatía diabética, arteriosclerosis, enterocolitis inflamatoria, cáncer de mama, cáncer de pulmón, melanoma y aneurisma.
3. Anticuerpo para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, que se une específicamente a uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20, un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21.
4. Anticuerpo para su uso según las reivindicaciones 1 a 3, que se produce usando como antígeno un péptido de exón-21 de periostina solo.
5. Anticuerpo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
6. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 5, que es un anticuerpo monoclonal.
7. Anticuerpo para su uso según la reivindicación 6, que se produce por una línea celular de hibridoma designada como NITE BP-01546, línea celular de hibridoma que se depositó en el National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depository, según el Tratado de Budapest con el número de registro NITE BP-01546.

Fig. 1

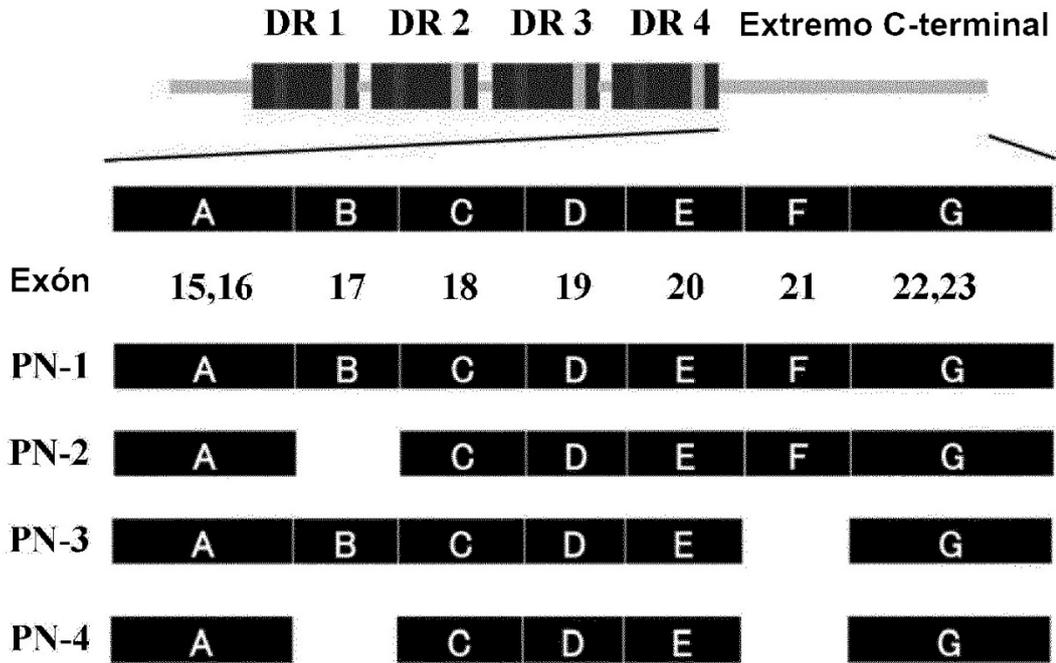


Fig. 2

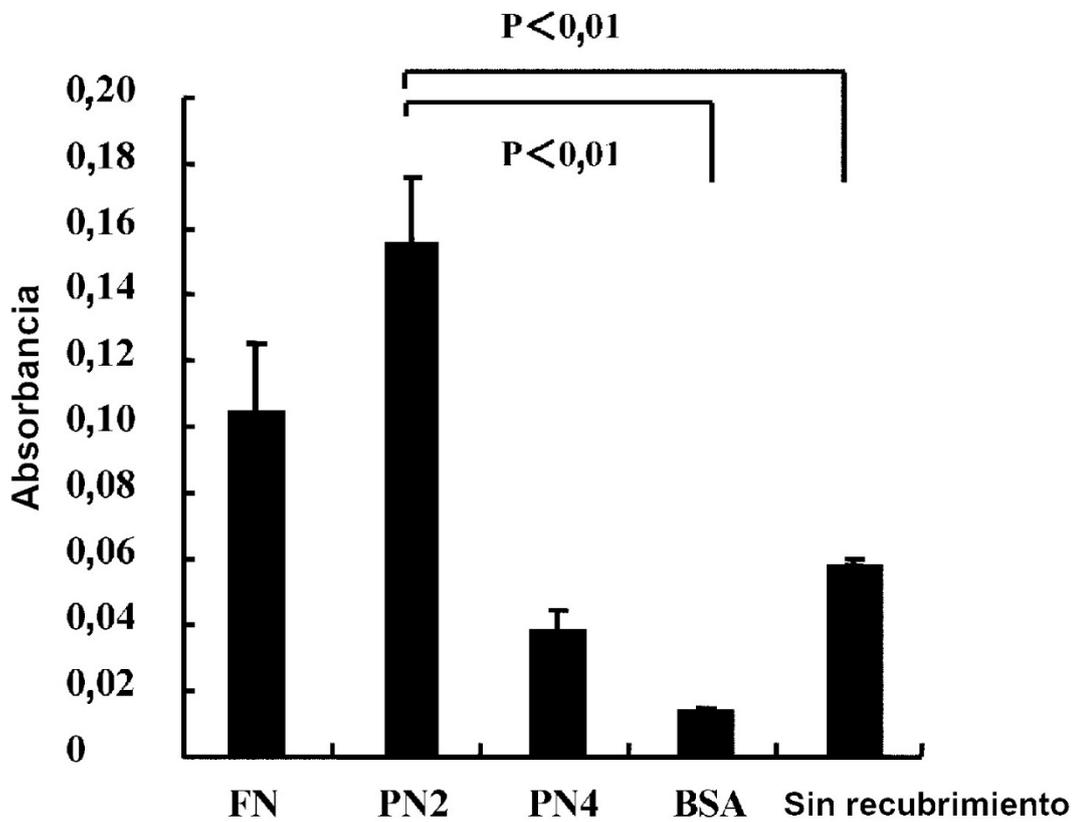
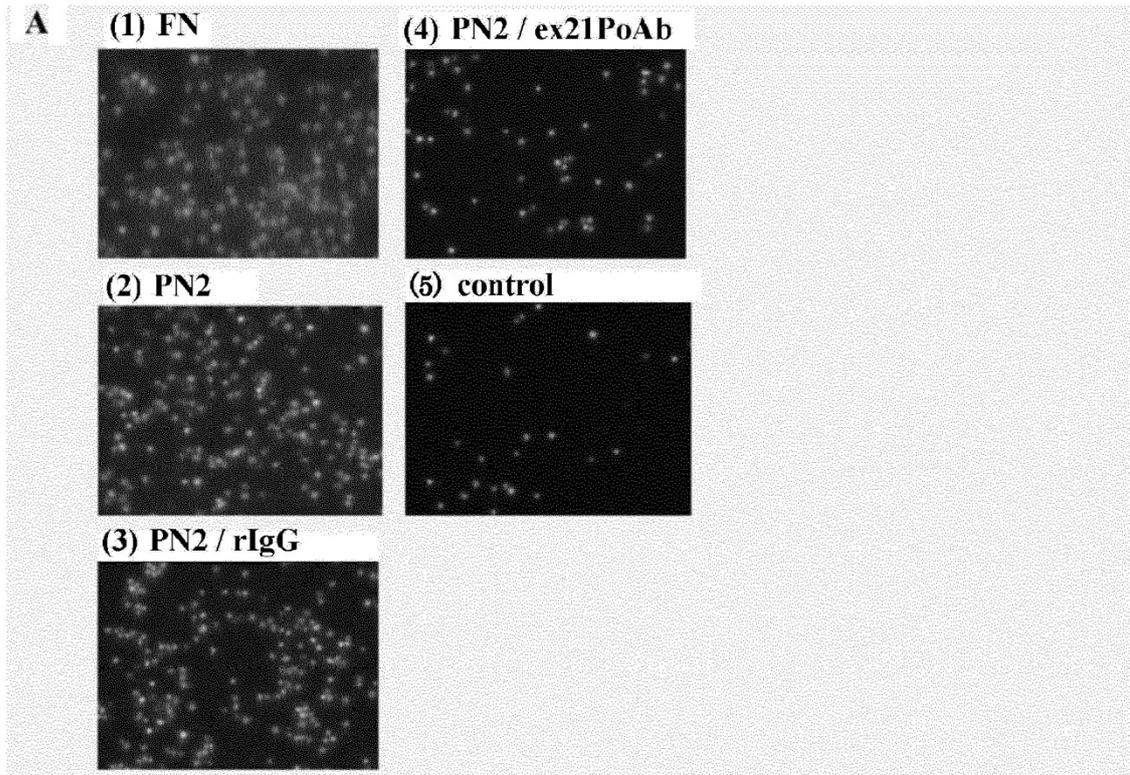


Fig. 3



B

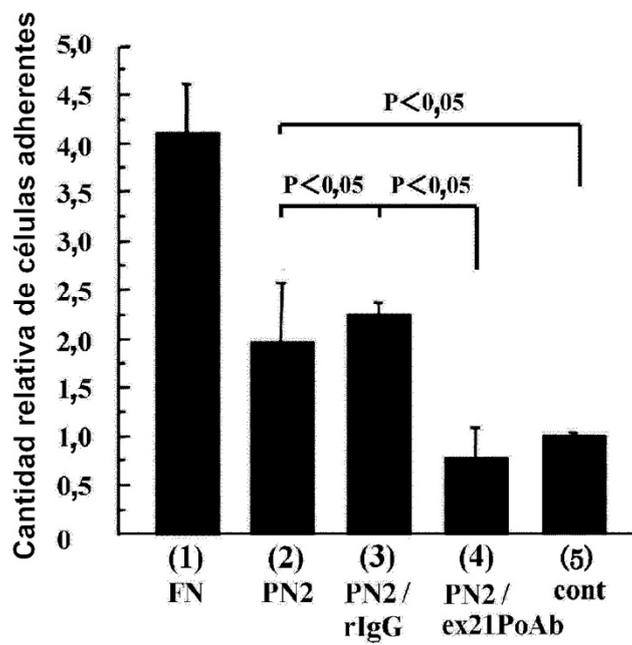
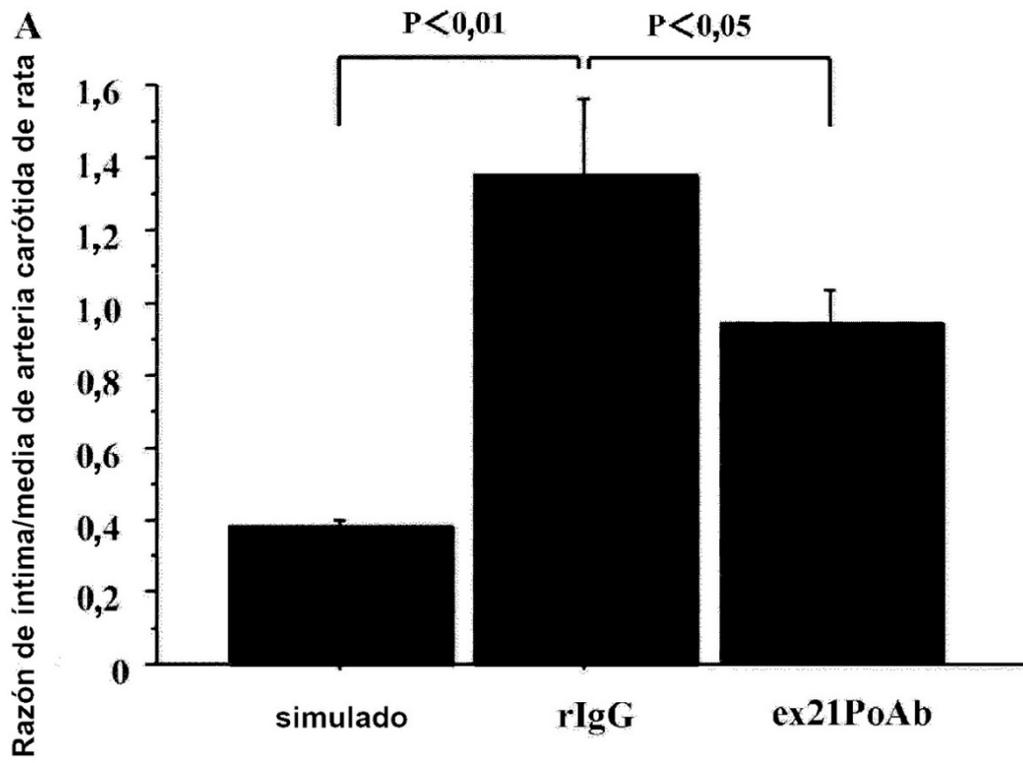
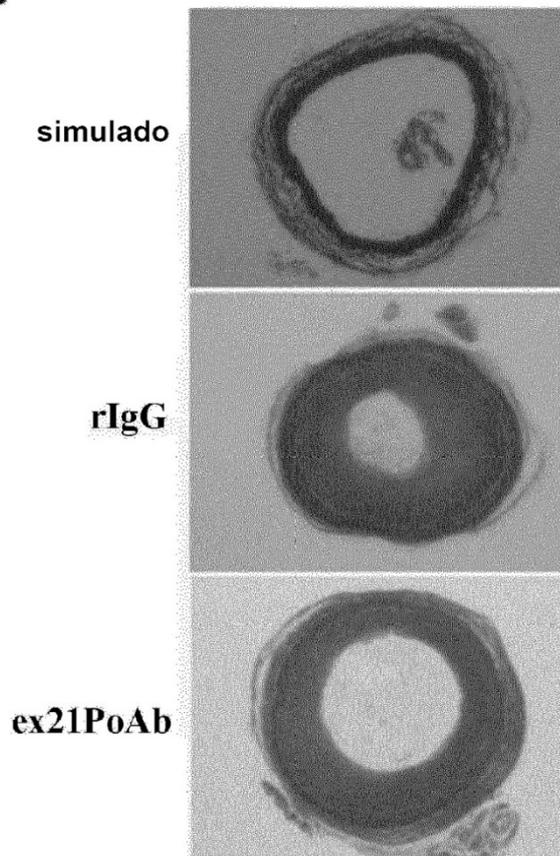


Fig. 4



B



Método de análisis : Bonferroni/Dunn

Fig. 5

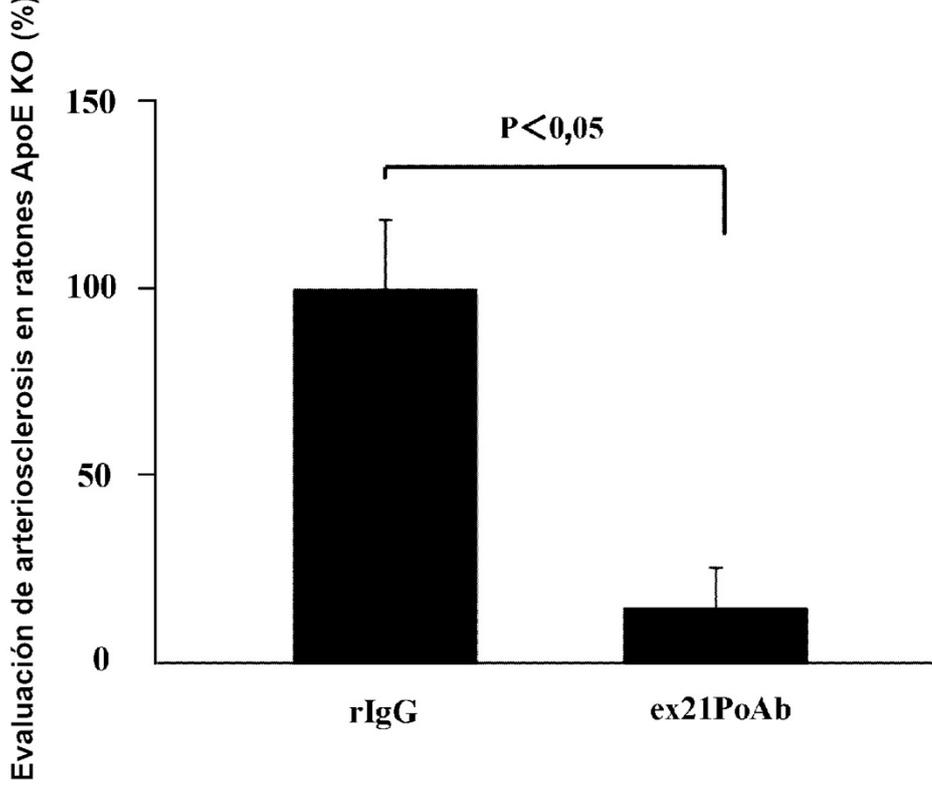


Fig. 6

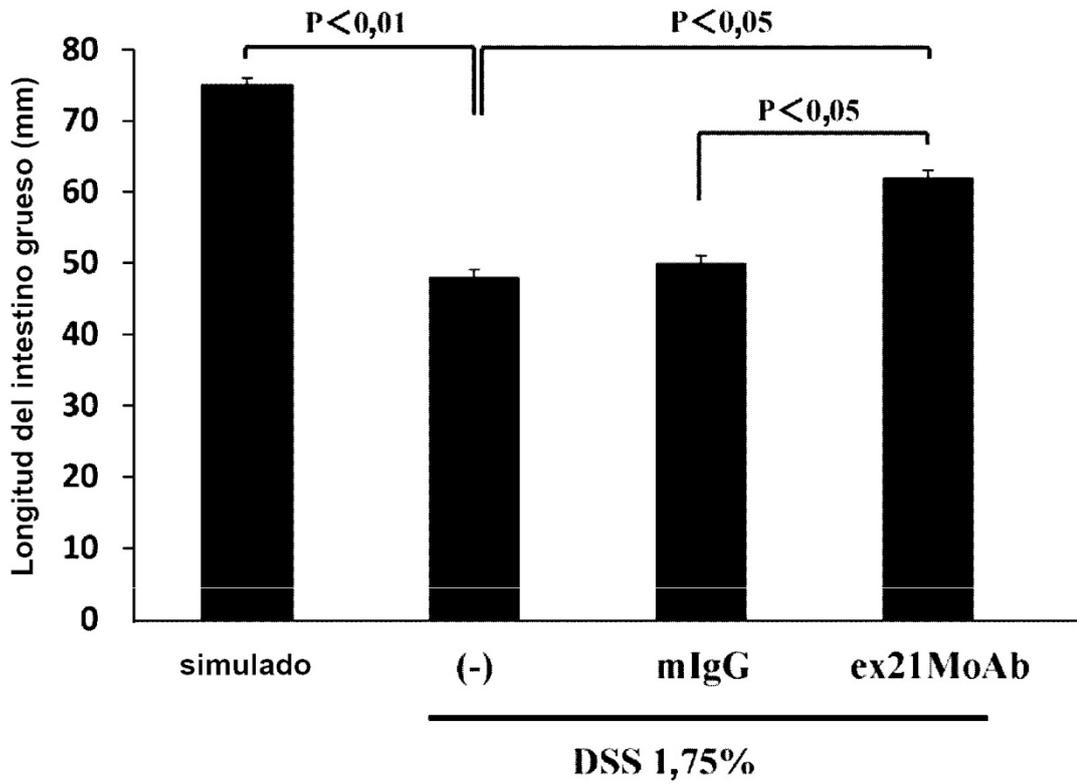
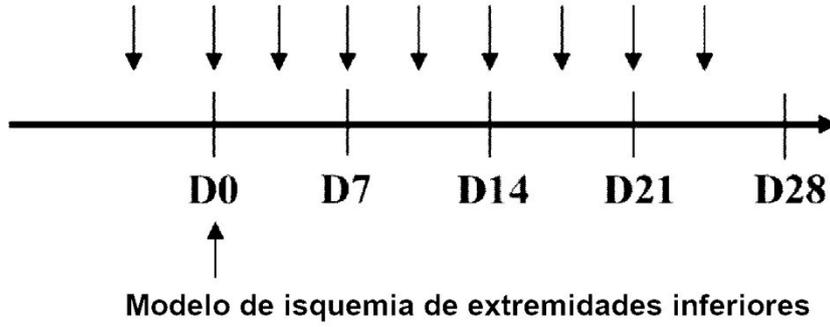


Fig. 7

A

40 µg/animal, dos veces a la semana, administración intraperitoneal



B

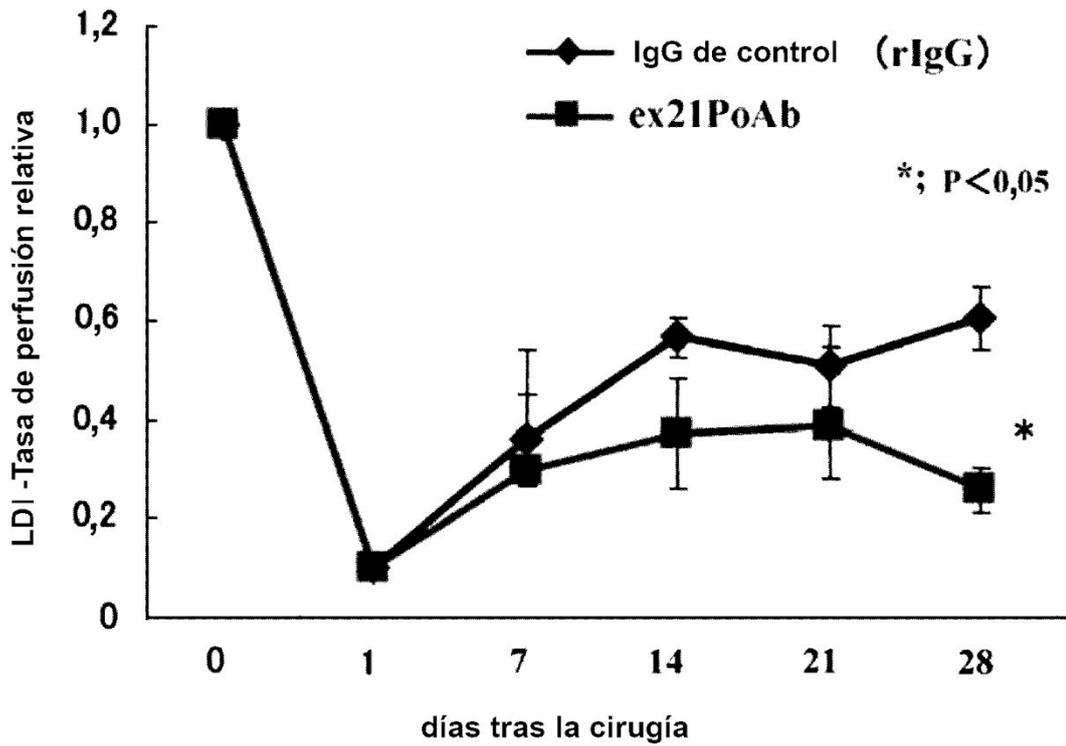


Fig. 8

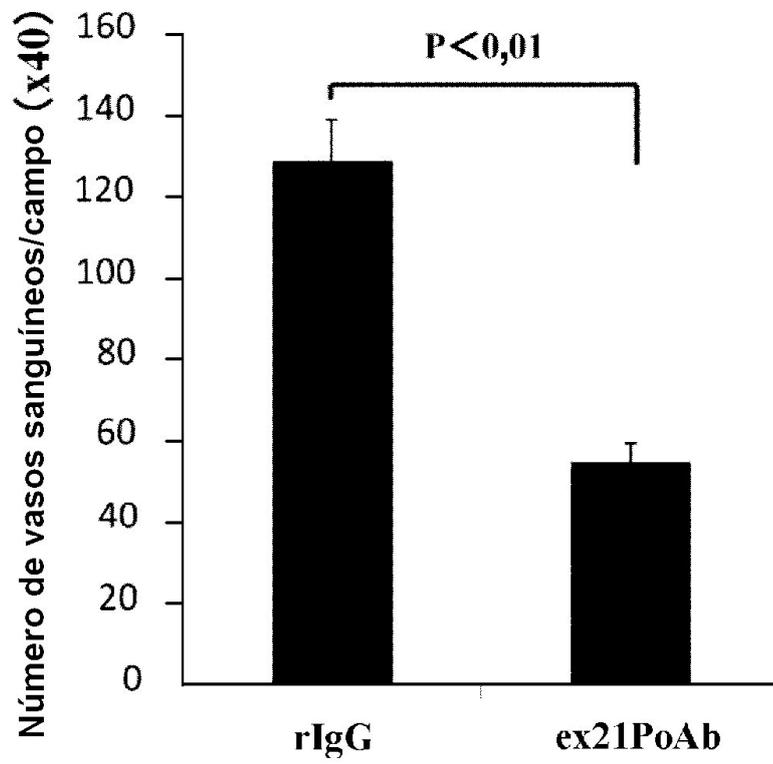


Fig. 9

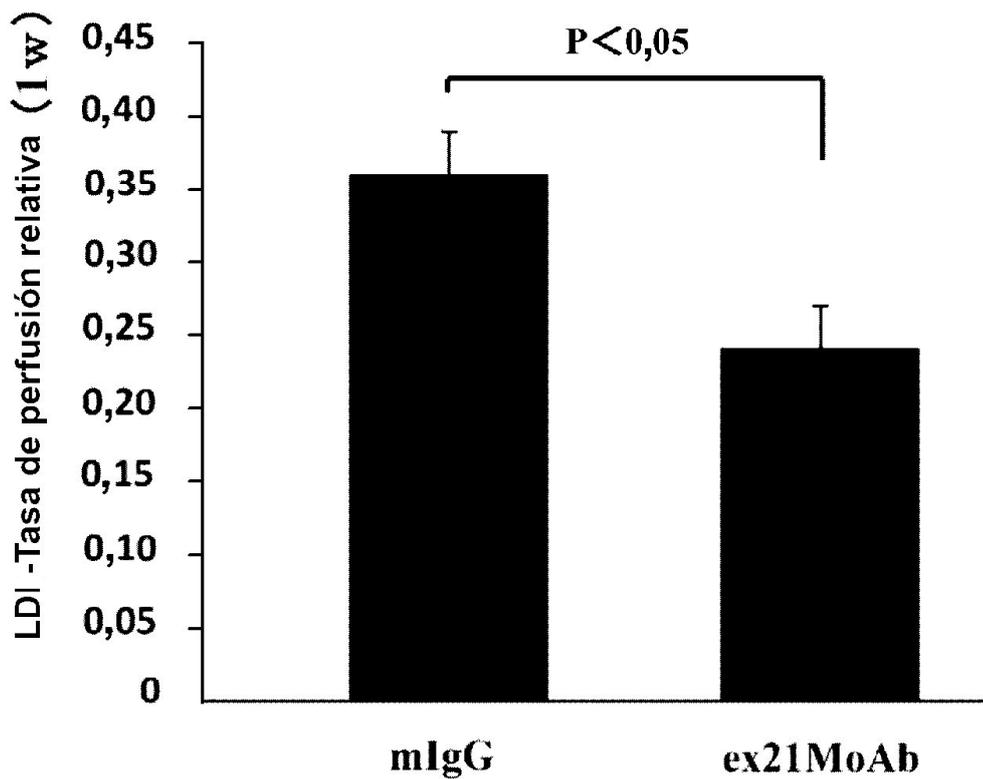


Fig. 10

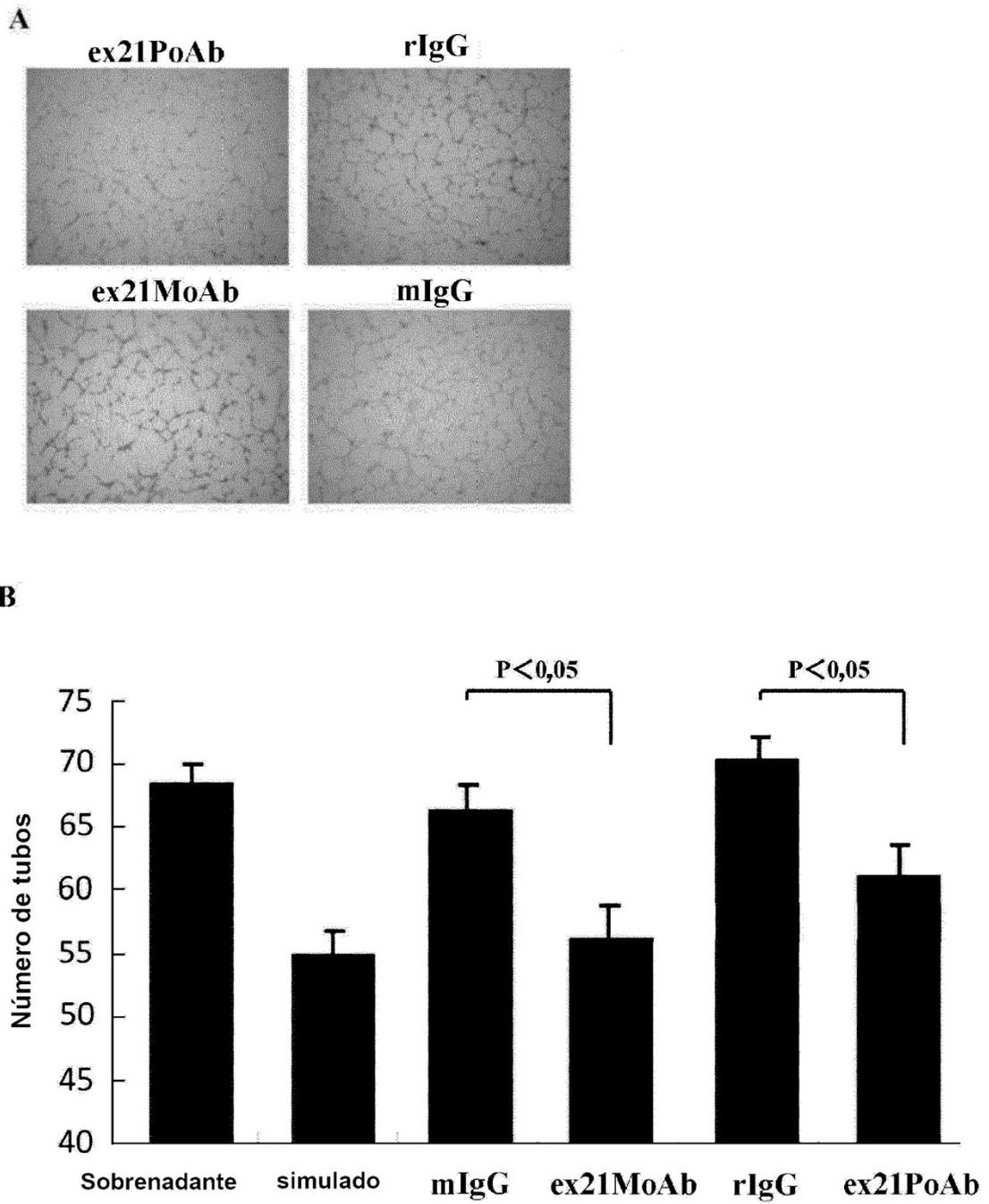


Fig. 11

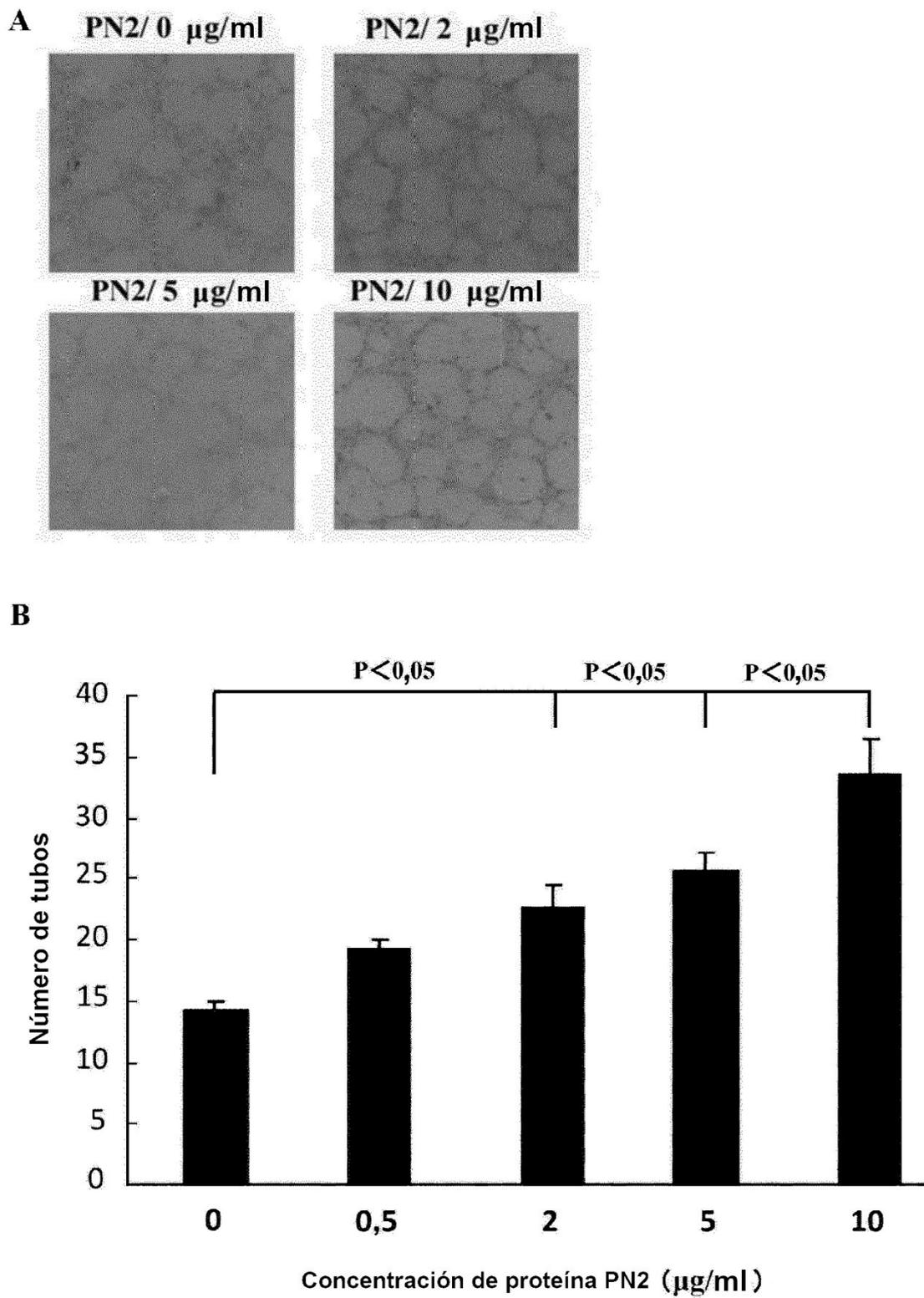


Fig. 12

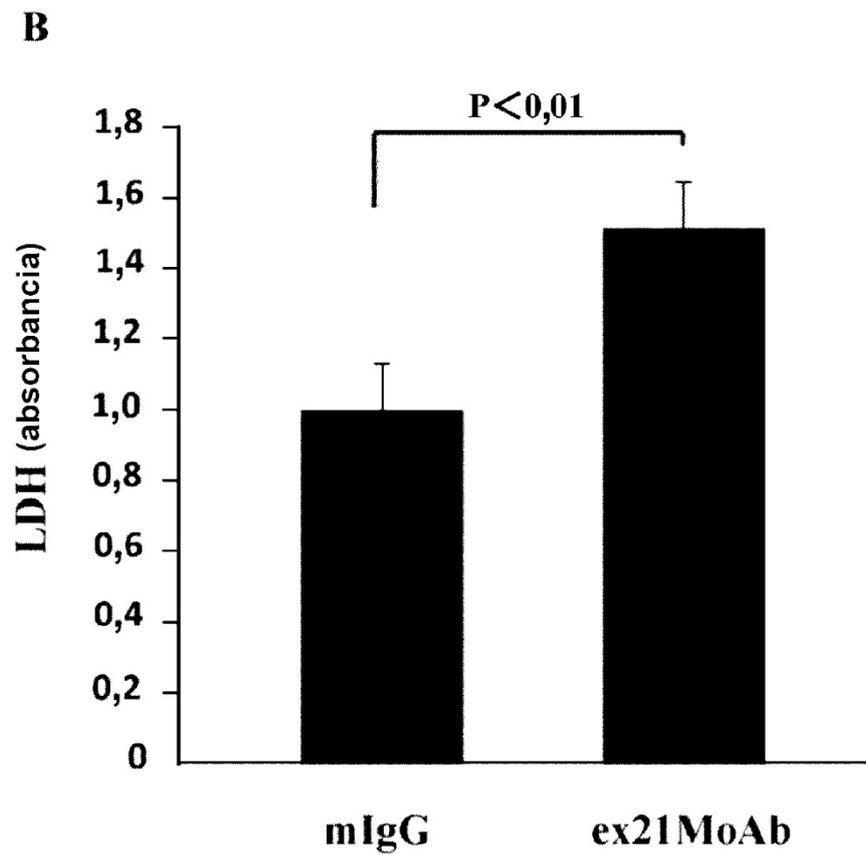
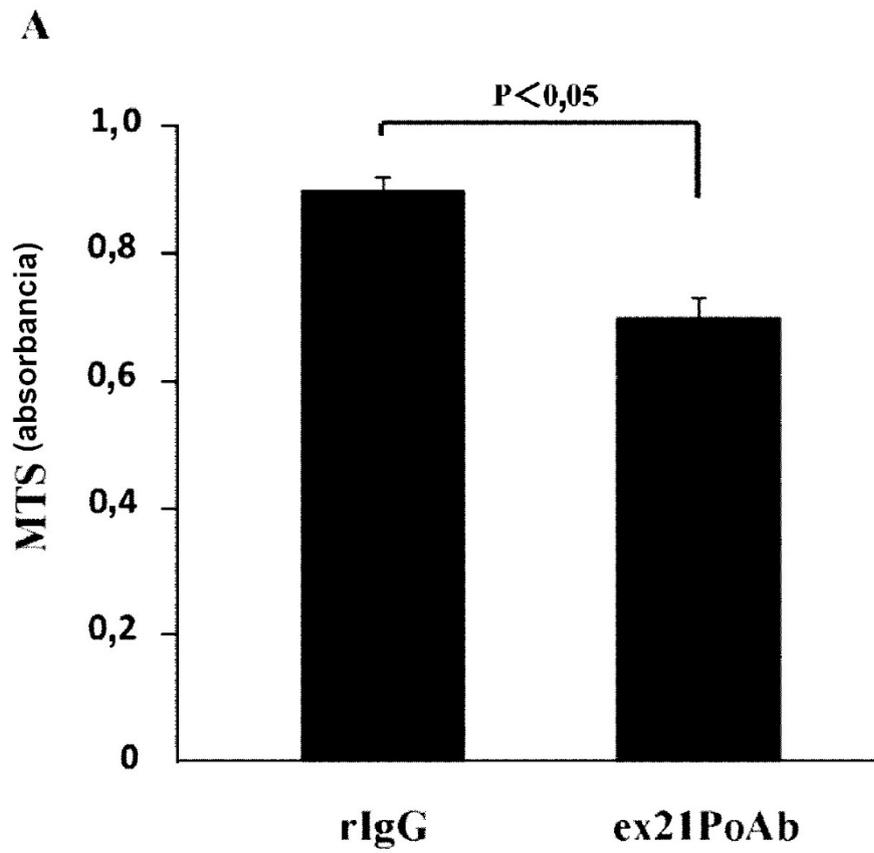


Fig. 13

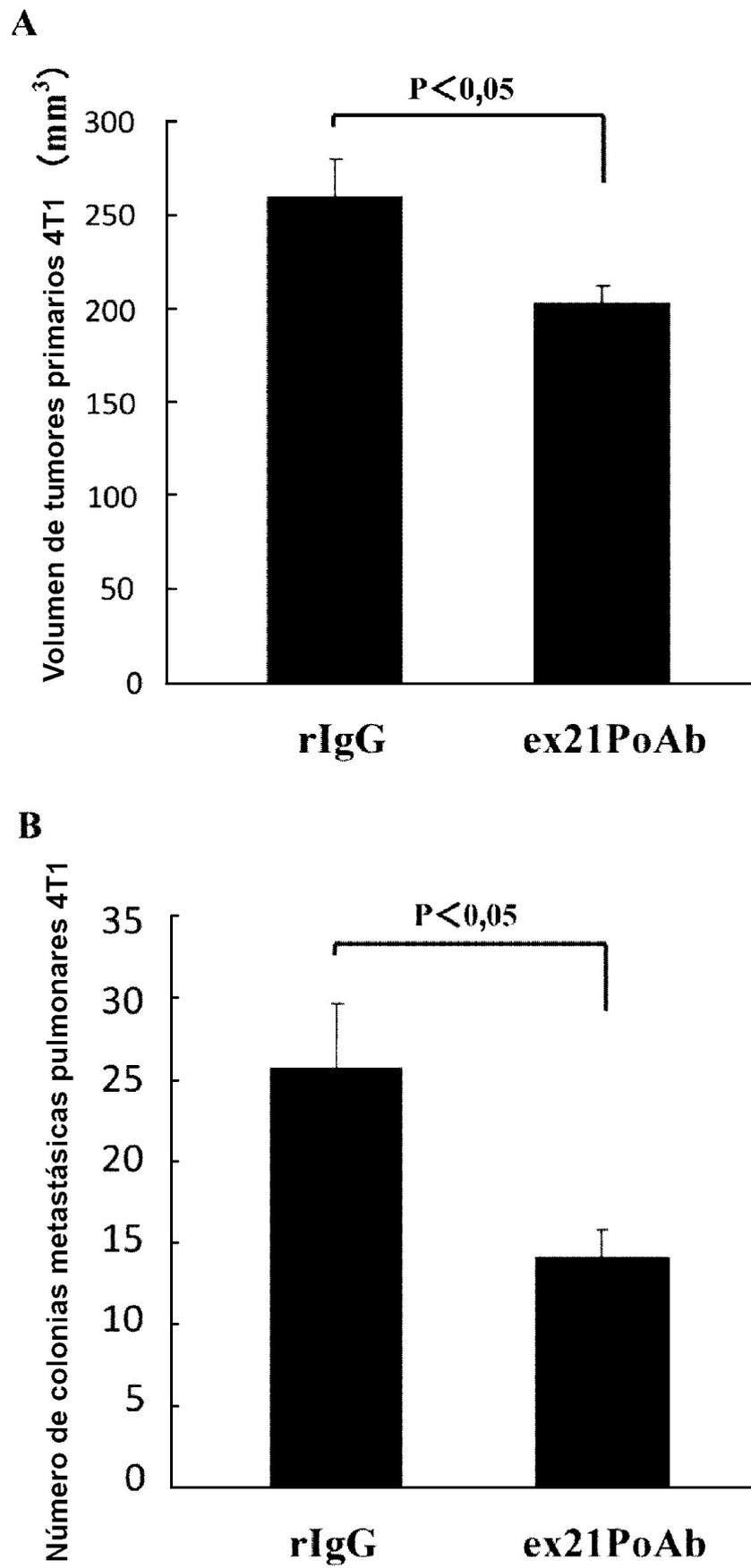


Fig. 14

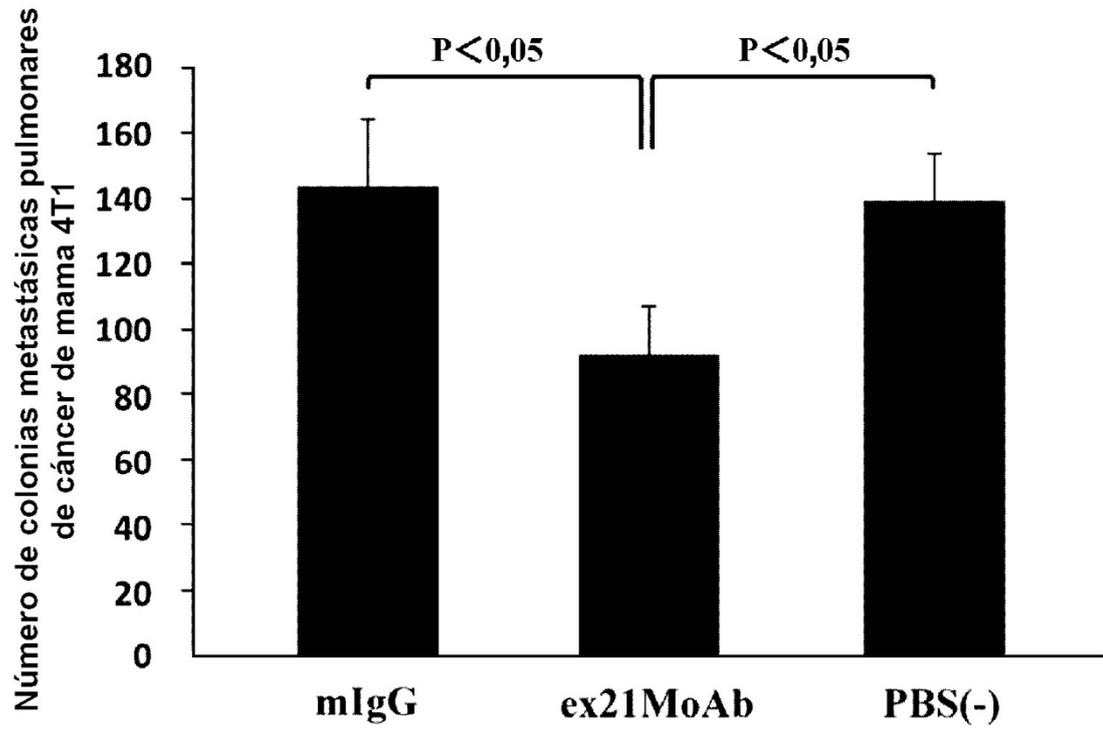


Fig. 15

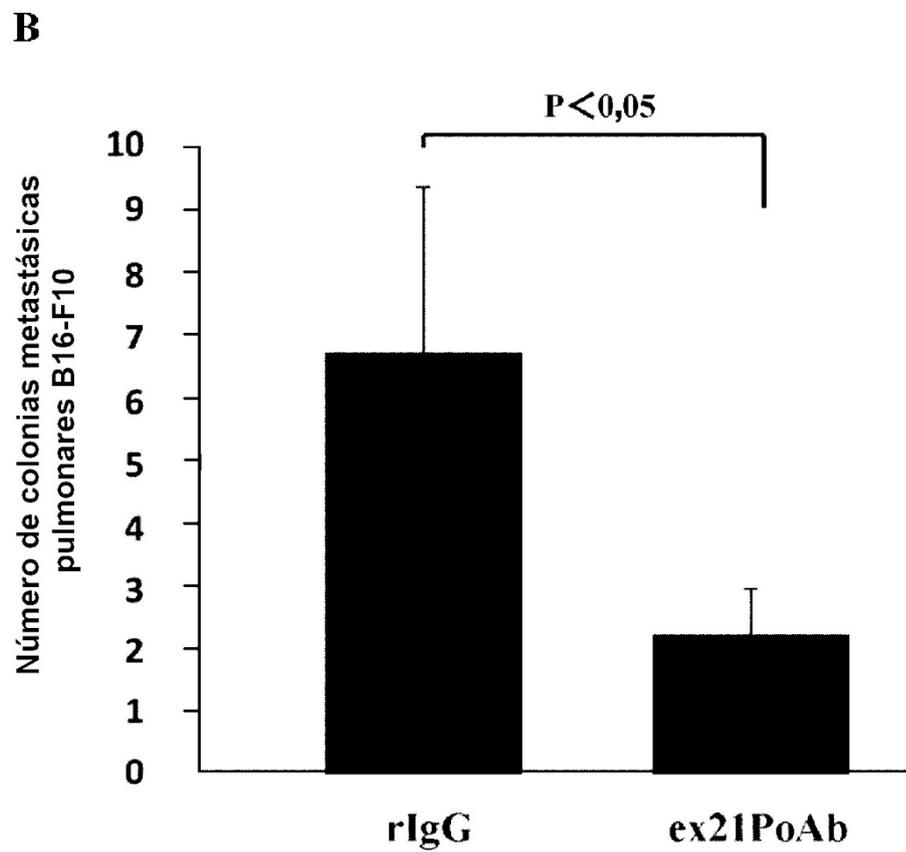
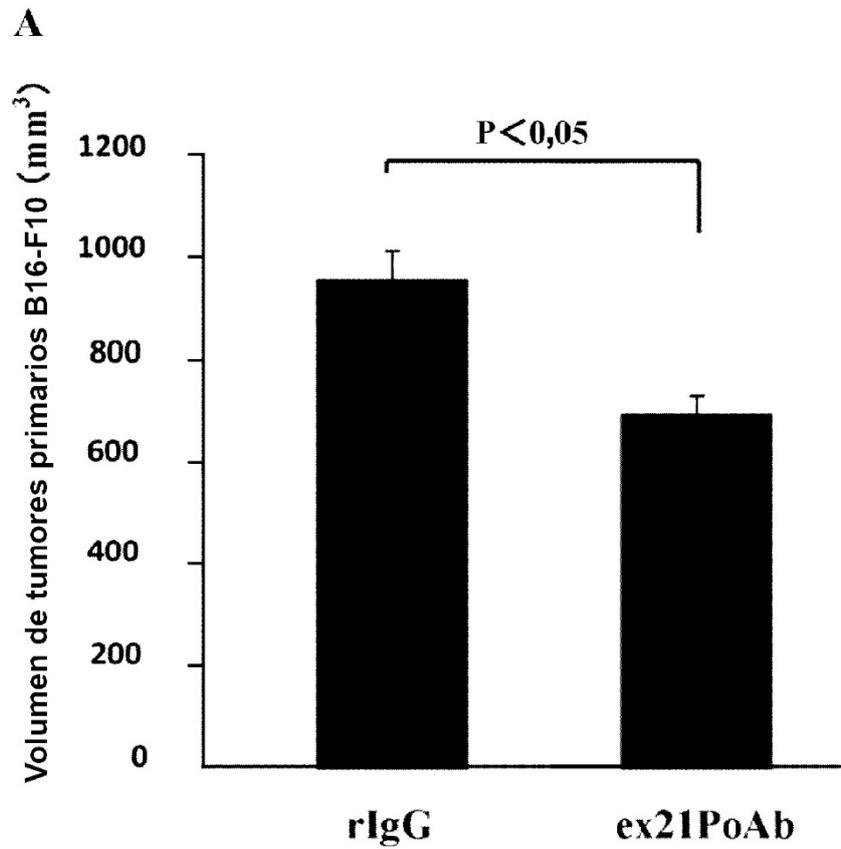


Fig. 16

