



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 324 199**

⑤① Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61P 19/10 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨⑥ Número de solicitud europea: **00926303 .9**
⑨⑥ Fecha de presentación : **24.04.2000**
⑨⑦ Número de publicación de la solicitud: **1173567**
⑨⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

⑤④ Título: **Tribonectinas.**

③⑩ Prioridad: **23.04.1999 US 298970**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.08.2009

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.08.2009

⑦③ Titular/es: **RHODE ISLAND HOSPITAL**
593 Eddy Street
Providence, Rhode Island 02903, US

⑦② Inventor/es: **Jay, Gregory, D.**

⑦④ Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 324 199 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

Tribonectinas.

5 Esta solicitud es una continuación parcial de la solicitud de patente U.S. que lleva el nº de serie 09/298,970, depositada con fecha 23 de abril de 1999, la totalidad de su contenido se incorpora a la presente como referencia.

Antecedentes de la invención

10 La invención se refiere a la lubricación de las articulaciones de los mamíferos.

15 La osteoartritis (OA) es una de las formas más frecuentes de enfermedad articular. Los factores que contribuyen al desarrollo de la OA incluyen la historia familiar de OA, la lesión previa de la articulación por lesión o cirugía y la edad de la articulación, es decir, el “desgaste” de las superficies que forman la articulación. La OA es muy frecuente en grupos de personas mayores, pero también puede afectar a los niños.

20 El tratamiento actual está destinado a aliviar el dolor y otros síntomas de la OA, p.ej. mediante la administración de fármacos analgésicos y antiinflamatorios. Otras estrategias terapéuticas incluyen la viscosuplementación mediante la administración de ácido hialurónico y sus derivados al tejido articular para aumentar la viscosidad del líquido sinovial.

Resumen de la invención

25 La invención se refiere a un nuevo tratamiento de la osteoartritis y otras enfermedades degenerativas de las articulaciones mediante la tribosuplementación. La tribosuplementación se realiza administrando directamente polipéptidos lubricantes a la articulación lesionada o artrítica. A diferencia de la viscosuplementación, la tribosuplementación no aumenta sustancialmente la viscosidad de la solución, p.ej. del líquido sinovial, a la que se añade. La viscosidad de una solución a la que añade una tribonectina aumenta como máximo en un 10%, con preferencia como máximo en un 5%, con mayor preferencia como máximo en un 2%, con preferencia especial como máximo en un 1%. Con preferencia muy especial, la viscosidad de la solución a la que se añade una tribonectina permanece invariable o disminuye.

30 Por consiguiente, la invención proporciona una tribonectina. Una tribonectina es un lubricante artificial de la capa límite, que contiene por lo menos una repetición de una secuencia de aminoácidos, que es idéntica por lo menos en un 50% con KEPAPTT (SEQ ID NO: 3). La invención proporciona una tribonectina que contiene por lo menos un resto lubricante unido a través de O, dicho resto lubricante es un resto $\beta(1-3)\text{GalGalNAc}$. La secuencia de aminoácidos de la estructura proteica de una tribonectina de origen natural puede ser diferente en función del empalme alternativo de exones del gen del factor estimulador de megacariocitos (MSF) humano. Por ejemplo, la tribonectina contiene los aminoácidos de 1 a 24 y de 200 a 1404 de la SEQ ID NO: 1, pero carece de los aminoácidos 25-199 de la SEQ ID NO: 1. La tribonectina contiene los aminoácidos de 1 a 156 y de 200 a 1404 de la SEQ ID NO: 1, pero le faltan los aminoácidos de 157 a 199 de la SEQ ID NO: 1. La tribonectina contiene los aminoácidos de 1 a 106 de la SEQ ID NO: 1 y de 200 a 1404 de la SEQ ID NO: 1, pero carece de los aminoácidos de 107 a 199 de la SEQ ID NO: 1. La tribonectina contiene los aminoácidos de 1 a 25 de la SEQ ID NO: 1, de 67 a 106 de la SEQ ID NO: 1 y de 200 a 1404 de la SEQ ID NO: 1, pero le faltan los aminoácidos de 26 a 66 de la SEQ ID NO: 1. Las tribonectinas son polipéptidos de origen natural purificados o polipéptidos sintéticos o recombinantes. La secuencia de aminoácidos de la estructura de las tribonectinas sintéticas o recombinantes es idéntica por lo menos en un 50% con la secuencia de aminoácidos de una tribonectina de origen natural y posee por lo menos un 50% de la actividad lubricante de una tribonectina de origen natural.

35 Una tribonectina se formula para la administración a una articulación de un mamífero o a otro tejido, p.ej. tejido cardíaco, cuya lubricación se desea. Con preferencia, la tribonectina es un polipéptido lubricante recombinante o sintetizado químicamente. Por ejemplo, una tribonectina incluye un polipéptido sustancialmente puro, cuya secuencia de aminoácidos incluye por lo menos una unidad repetitiva, pero menos de 76 unidades repetitivas. Cada subunidad contiene por lo menos 7 aminoácidos (y por ejemplo 10 o menos aminoácidos). La secuencia de aminoácidos de cada subunidad es idéntica por lo menos en un 50% con la SEQ ID NO: 3 y un aminoácido no idéntico de la secuencia de referencia es una sustitución conservadora de aminoácido. Por ejemplo, uno o los dos restos treonina se sustituyen por un resto serina. Con preferencia, la secuencia de aminoácidos de la subunidad es idéntica a la SEQ ID NO: 3. La tribonectina puede contener además una o más unidades repetitivas de la secuencia de aminoácidos XXXTTX (SEQ ID NO: 4). Los polipéptidos u otros compuestos aquí descritos se dice que son “sustancialmente puros” si dentro de las preparaciones el compuesto de interés está presente por lo menos en un 60% en peso (materia seca). Con preferencia, la preparación contiene por lo menos un 75%, con mayor preferencia por lo menos un 90% y con preferencia especial por lo menos un 99% en peso del compuesto de interés. La pureza puede medirse por cualquier método apropiado, por ejemplo, por cromatografía de columna, electroforesis a través de gel de poliacrilamida o por análisis HPLC.

40 Cuando se dice que un polipéptido o molécula de ácido nucleico concretos tienen una identidad porcentual específica con un polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia, de una longitud definida, la identidad porcentual se refiere al polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia. Por tanto, un péptido que es idéntico en un 50% con un polipéptido de referencia que tiene una longitud de 100 aminoácidos quiere decir que un polipéptido de 50 aminoácidos es completamente idéntico a una porción de una longitud de 50 aminoácidos del polipéptido de referen-

ES 2 324 199 T3

cia. Puede ser también un polipéptido de 100 aminoácidos que es idéntico en un 50% con el polipéptido de referencia tomando en consideración toda su longitud.

Un polipéptido o molécula de ácido nucleico que es “sustancialmente idéntico” con un polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia determinados es un polipéptido o molécula de ácido nucleico que tiene secuencia que es idéntica por lo menos en un 85%, con preferencia en un 90% y con mayor preferencia en un 95%, 98%, 99% o más con la secuencia del polipéptido de referencia o de la molécula de ácido nucleico. La “identidad” tiene un significado ya reconocido en la técnica y se calcula con arreglo a métodos publicados, bien conocidos, p.ej. Computational Molecular Biology, 1988, Lesk A.M., coord., Oxford University Press, Nueva York; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, 1993, Smith, D.W., coord., Academic Press, Nueva York; Computer Analysis of Sequence Data, parte I, 1994, Griffin, A.M. y Griffin, E.G., coord., Humana Press, New Jersey; Sequence Analysis in Molecular Biology, 1987, Heinje, G., Academic Press, Nueva York; y Sequence Analysis Primer, 1991, Gribskov, M. y Devereux, J., coord., Stockton Press, Nueva York. Existen, pues, muchos métodos para calcular la identidad entre dos secuencias de polinucleótido o de polipéptido y el término “identidad” ya es conocido por los expertos y tiene un significado definido en relación con el método especificado determinado. La identidad de secuencia aquí descrita se mide con el paquete informático Lasergene (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Se emplea el módulo MegAlign del método Clustal V (Higgins y col., CABIOS 5 (2), 151-3, 1989). Los parámetros empleados son: penalización de intervalo = 10, penalización de longitud de intervalo = 10.

Como alternativa, los ácidos nucleicos que difieren de una secuencia de referencia determinada se hibridan con gran restricción con una hebra de DNA que tiene una secuencia de referencia o su complemento. Las condiciones de alta restricción son la hibridación a 42 grados C en formamida del 50%, un primer lavado a 65 grados C en 2 X SSC y un segundo lavado a 65 grados C en 0,2 X SSC.

Una tribonectina se caracteriza por reducir el coeficiente de fricción (μ) entre superficies de apoyo. Por ejemplo, la reducción de la fricción se mide “*in vitro*” detectando una reducción de la fricción en un aparato que emplea apoyos de látex: vidrio. La reducción de fricción se mide también “*in vivo*”, p.ej. midiendo la reducción del dolor del paciente. Las tribonectinas de la invención son composiciones lubricantes. Se estudia la función lubricante de los polipéptidos que tienen por lo menos un 50% (pero menos del 100%) identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia midiendo la reducción del μ entre las superficies de apoyo.

Una tribonectina de la invención incluye a un oligosacárido unido a través de O y comprende N-acetilgalactosamina y galactosa en la forma beta(1-3)Gal-GalNAC. Por ejemplo, los dominios repetitivos KEPAPTT (SEQ ID NO: 3) y XXXTTX (SEQ ID NO: 4) se glucosilan con el beta(1-3)Gal-GalNAC (que algunas veces puede estar tapado con NeuAc en la forma de (1-3)Gal-GalNAC-NeuAc. El término “glucosilado” referido a un polipéptido significa que un resto hidrato de carbono está presente en uno o más sitios de la molécula de polipéptido. Un 10%, con preferencia por lo menos un 20%, con mayor preferencia por lo menos un 30% y con preferencia especial por lo menos un 40% de la tribonectina de la invención está glucosilada. Puede estar glucosilada hasta un 50% o más de la tribonectina. El porcentaje de glucosilación se determina en peso.

Un polipéptido de tribonectina contiene un fragmento sustancialmente puro de MSF. Por ejemplo, el peso molecular de una tribonectina sustancialmente pura que tiene una secuencia de aminoácidos de una tribonectina de origen natural se sitúa en el intervalo de 220-280 kDa. Con preferencia, el peso molecular aparente de una tribonectina es menor que 230 kDa, con mayor preferencia menor que 250 kDa y con preferencia especial menor que 280 kDa. Un fragmento de proteína o polipéptido se define como un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica parcial, pero no totalmente, con la secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido de origen natural, de los que se deriva, p.ej. el MSF. La tribonectina puede contener un polipéptido, cuya secuencia de aminoácidos es idéntica por lo menos en un 50% con la secuencia de restos 200-1140, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1; p.ej. contiene la secuencia de aminoácidos de restos 200-1140, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1. En otro ejemplo, el polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 50% con la secuencia de restos 200-1167, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1, p.ej. una que tenga la secuencia de aminoácidos idéntica a los restos 200-1167, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1. El polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 50% con la secuencia de restos 200-1212, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1, p.ej. la secuencia de aminoácidos de restos 200-1212, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1, o el polipéptido contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 50% con la secuencia de restos 200-1263, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1, p.ej. una secuencia de aminoácidos idéntica con los restos 200-1263, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1. Con preferencia, la secuencia del polipéptido carece de la secuencia de aminoácidos de restos 1-24, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1 y/o de la secuencia de aminoácidos de restos 67-104, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

La invención se refiere también a una molécula aislada de ácido nucleico que codifica a una tribonectina. Por ejemplo, el ácido nucleico incluye una secuencia que es idéntica por lo menos en un 50% con los nucleótidos 631-3453, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 2. Con preferencia, el ácido nucleico codifica a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de restos 200-1140 de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el ácido nucleico tiene una secuencia de nucleótidos idéntica a la de los nucleótidos 631-3453, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 2, o una variante degenerada de la misma. Una molécula aislada de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se ha separado de las secuencias codificadoras 5' y 3' o de las secuencias no codificadoras, de la que es inmediatamente contigua en el genoma de origen natural de un organismo. Las moléculas aisladas de ácidos nucleicos incluyen a las moléculas de

ES 2 324 199 T3

ácidos nucleicos que no son de origen natural, p.ej. las moléculas de ácidos nucleicos creadas por técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, el ácido nucleico de la invención incluye a los nucleótidos 631-3453, ambos inclusive, de la SEQ ID NO: 2, pero no a los nucleótidos que están en una posición inmediatamente contigua a aquellas secuencias en la secuencia genómica de origen natural o en el cDNA de origen natural.

5 Está también contemplado por la invención un método de lubricar una articulación de mamífero poniendo en contacto dicha articulación con MSF purificado o con una tribonectina. El mamífero es con preferencia un ser humano, un caballo, un perro, un buey, un asno, un ratón, una rata, una cobaya, una vaca, una oveja, un cerdo, un conejo, un mono o un gato y la articulación es una articulación del tipo rodilla, codo, hombro, cadena o cualquier otra articulación que pueda soportar peso. Las tribonectinas se administran por vía intraarticular. La lubricación terapéutica de la articulación se efectúa también por terapia genética, p.ej. poniendo en contacto la articulación o el líquido sinovial con un ácido nucleico que codifique a una tribonectina. Por ejemplo, se administran los ácidos nucleicos a la cavidad sinovial mediante una inyección intraarticular.

15 Además de funcionar como lubricante de la capa límite en las articulaciones de los mamíferos, una tribonectina puede utilizarse como lubricante de capa límite entre tejidos blandos de mamíferos, por ejemplo la piel u órganos internos, o entre tejidos de mamíferos y dispositivos médicos, por ejemplo un implante prostético. Por consiguiente, la invención abarca una composición biocompatible que contenga una tribonectina en forma adecuada para la inhibición de la adhesión a un tejido. Por ejemplo, la tribonectina puede adoptar la forma de una película, una membrana, una espuma, un gel o una fibra. El término “película” se emplea aquí para indicar una sustancia formada por compresión de una espuma o de un gel sobre una membrana delgada, p.ej. por vertido en un molde plano y secando con aire para formar una membrana delgada, o por compresión de un gel o de fibras, o dejando o provocando que las fibras o el gel se deshidraten. El término “espuma” se emplea aquí para indicar una sustancia que tiene estructura porosa y se forma p.ej. por introducción de aire dentro de una solución, suspensión, gel o fibra de tribonectina. El término “bioabsorbible” se emplea aquí para indicar la capacidad de material compatible con el tejido para degradarse en el cuerpo después de la implantación, dando lugar a productos no tóxicos que se eliminan del cuerpo o se metabolizan. Una sustancia “biocompatible” es una expresión que se emplea para indicar que no tiene efectos tóxicos ni lesivos inaceptables en sentido médico, que pudieran afectar la función biológica.

30 Las composiciones de tribonectina para impedir las adhesiones pueden formularse también en forma de composiciones idóneas para la extrusión, p.ej. en forma de molde sobre el que puede crecer el tejido sin adherirse a él.

35 Un método para inhibir la adhesión entre una primera superficie y una segunda superficie de un mamífero se realiza colocando una tribonectina entre la primera superficie y la segunda para impedir la adhesión de dichas superficies de un mamífero. Por ejemplo, una superficie o las dos son un tejido de mamífero y una tribonectina colocada entre ellas impide la formación de adhesiones durante el proceso de curación. Como alternativa, la primera superficie o la segunda (o ambas) son un dispositivo artificial, por ejemplo un implante ortopédico. Los tejidos a tratar incluyen a los lesionados por incisión quirúrgica o por trauma.

40 También dentro de la invención se contempla un método de diagnóstico de la osteoartritis o de la predisposición a sufrirla que consiste en extraer una muestra biológica de un mamífero y medir la cantidad de un fragmento de MSF en dicha muestra biológica. El aumento de la cantidad frente a un control, p.ej. un valor predeterminado asociado a un diagnóstico negativo o a una muestra biológica de un mamífero del que se sabe que no sufre osteoartritis, indica que el mamífero sufre osteoartritis o está predispuesto a desarrollar una osteoartritis. Cualquier muestra biológica es adecuada para el ensayo en el método de diagnóstico; por ejemplo, la muestra biológica es de líquido sinovial, sangre, suero u orina. Con preferencia, el fragmento de MSF contiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Como alternativa, el fragmento de MSF contiene la secuencia de aminoácidos de EPAPTT (SEQ ID NO: 5; un producto de descomposición de la tribonectina provocada por la tripsina) o la secuencia de aminoácidos de PTTKEP (SEQ ID NO: 6; un producto de descomposición de la tribonectina provocada por la elastasa).

50 Otras características y ventajas de la invención resultarán manifiestas a partir de la descripción que sigue de las formas de ejecución preferidas de la misma y de las reivindicaciones.

55 **Breve descripción de las figuras**

60 La figura 1 es un diagrama de un alineamiento de la secuencia de aminoácidos del MSF y de una tribonectina humana. Los exones 7, 8 y 9 del MSF se presentan completos; el exón 6 se presenta en forma abreviada, porque es muy largo (940 aminoácidos). El exón 6 contiene un total de 76 unidades repetitivas de la secuencia KEPAPPT degenerada (SEQ ID NO: 3), que actúan como sitios de O-glicosilación. Se presentan sobre fondo oscuro los restos lisina/arginina del extremo C de los fragmentos trípticos secuenciados. Se presentan sobre fondo oscuro y se subrayan los aminoácidos 214-222 y 300-309 correspondientes a los cebadores delantero e inverso específicos del exón 6.

65 Las coordenadas de la secuencia de aminoácidos se refieren a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

 Las figuras 2A-B son diagramas de isoformas fenotípicas de expresión de la tribonectina en fibroblastos sinoviales humanos y condrocitos articulares, respectivamente. En la figura 2A se representan gráficamente exones de MSF expresados en isoformas de tribonectina. En la figura 2B se representa esquemáticamente la expresión de exones

ES 2 324 199 T3

en condrocitos articulares comparadas con los fibroblastos sinoviales. Los exones 2, 4 y 5 se empalman de modo alternativo, conduciendo a la expresión en isoformas.

La figura 3 es un diagrama que representa los límites de empalme alternativo de las isoformas de tribonectina V1, V2 y V3.

Descripción detallada

Se identifica y aísla un gran número de isoformas de tribonectina de origen natural. Por ejemplo, se purifica un polipéptido lubricante humano del líquido sinovial y se observa que contiene aminoácidos codificados por los exones 2 y 4-12 del gel del MSF (pero no los exones 1 ó 3). El gen que codifica al MSF de longitud completa de origen natural contiene 12 exones y el producto genético del MSF de origen natural contiene 1404 aminoácidos con múltiples homologías de secuencia de polipéptido con la vitronectina, incluidas las regiones de tipo hemopexina y de tipo somatomedina. El exón 6 de posición central contiene 940 restos. El exón y codifica al dominio de mucina O-glucosilado. Un polipéptido codificado por los nucleótidos 631-3453 de la SEQ ID NO: 2 proporciona una lubricación de capa límite del cartílago articular.

TABLA 1

Secuencia de aminoácidos del MSF

MAWKTLPYLLLLLSVFVIQQVSSQDLSSCAGRCGEGYSRDATCNC DYNQHYMECC
PDFKRVCTAELSCKGRCFESFERGREDCDAQCKKYDKCCPDYESFCAEVHNPTSPPS
SKKAPPPSGASQTIKSTTKRSPKPPNKKKTKK VIESEEITEEHSVSENQESSSSSSSSSSSS
TIWKIKSSKNSAANRELQKKLKVKDNKKNRTKKKPTKPPVVDEAGSGLDNGDFKVT
TPDTSTTOHNKVSTSPKITTAKPINRPSLPPNSDTSKETS LTVNKETT VETKETTITNK
OTSTDGKEKTTSAKETOSIEKTS AKDLAPTSKVLAKPTPKAETTTKGPALTPKEPTPT
TPKEPASTTPKEPTPTTIKSAPTTPKEPAPTTT KSAPTTPKEPAPTTTKEPAPTTTPKEPAP
TTTKEPAPTTT KSAPTTPKEPAPTTPKKPAPTTTPKEPAPTTTPKEPTPTTPKEPAPTTKEPA
PTTPKEPAPTAPKKPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTKEPSPTTPKEPAPTTT KSAPTITKE
PAPTTT KSAPTTPKEPSPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTPKKPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTT
KKPAPTAPKEPAPTTPKETAPTTPKKLPTTPEKLA PTTPEKPAPTTPEELAPTTPEEPTP
TTPEEPAPTTPKAAAPNTTPKEPAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTPKETAPTTPKGTAPTTLK
EPAPTTPKKPAPKELAPTTTKEPTSTTSDKPAPTTPKGTAPTTTPKEPAPTTTPKEPAPTTP
KGTAPTTLKEPAPTTPKKPAPKELAPTTT KGTSTTSDKPAPTTPKETAPTTTPKEPAPTT
PKKPAPTTPETPPPTTSEVSTPTTTPKEPTTIHKSPDESTPELSA EPTPKALENSPKPEGVP
TTKTPAATKPEMTTAKDKTTERDLRTPETTIAAPKMTKETATTEKTTESKITATT
TOVSTTTODTTPFKITTLKTTTLAPKVTTT KKTITTEIMNKPEETAKPKDRATNSKA
TTTRPNQTPNSKLVVNPKSEDAGGAEGETPHMLLRPHVFMPEVTPDMDYLRVVPNQ
GIIINPMLSDETNICNGKPV DGLTTLRNGTLVAFRGHYFWMLSPFSPSPARRITEVWGI
PSPIDTVFTRCNCEGKTFFFKDSQYWRFTNDIKDAGYPKPIFKGFGGLTGQIVAALSTA
KYKNWPESVYFFKRGGSIQQYIYKQEPVQKCPGRRPALNYPVYGEMTQVRRRRFERA
IGPSQHTIRIQYSPARLAYQDKGVLHNEVKVSILWRGLPNVVTS AISLPNIRKPDGYD
YYAFSKDQYYNIDVPSRTARAITTRSGQTL SKVWYNCP (SEQ ID NO:1)

ES 2 324 199 T3

TABLA 2
cDNA del MSF

5	1	gcggccgcga	ctattcggta	cctgaaaaca	acgatggcat	ggaaaacact	tcccatttac
	61	ctgttggtgc	tgctgtctgt	tttcgtgatt	cagcaagttt	catctcaaga	tttatcaagc
	121	tgtgcaggga	gatgtgggga	aggtattctt	agagatgcca	cctgcaactg	tgattataac
	181	tgtcaacact	acatggagtg	ctgccctgat	ttcaagagag	tctgcaactg	ggagctttcc
10	241	tgtaaaggcc	gctgctttga	gtccttcgag	agagggaggg	agtgtgactg	cgacgcccac
	301	tgtaagaagt	atgacaagtg	ctgtcccgat	tatgagagtt	tctgtgcaga	agtgcataat
	361	cccacatcac	caccatcttc	aaagaaagca	cctccacctt	caggagcatt	tcaaaccatc
	421	aaatcaacaa	ccaaacgttc	acccaaacca	ccaaacaaga	agaagactaa	gaaagttata
	481	gaatcagagg	aaataacaga	agaacattct	gtttctgaaa	atcaagagtc	ctcctcctcc
15	541	tcctcctctt	cctctctctt	ttcaacaatt	tggaaaatca	agttttccaa	aaattcagct
					EXÓN 6		
	601	gctaatagag	aattacagaa	gaaactcaaa	<u>gtaaaagata</u>	acaagaagaa	cagaactaaa
	661	<u>aagaaacctc</u>	<u>cccccaaacc</u>	<u>accagttgta</u>	<u>gatgaagctg</u>	<u>gaagtggatt</u>	<u>ggacaatggt</u>
20	721	<u>gacttcaagg</u>	<u>tcacaactcc</u>	<u>tgacacgtct</u>	<u>accacccaac</u>	<u>acaataaagt</u>	<u>cgcacatctt</u>
	781	<u>ccaagatca</u>	<u>caacagcaaa</u>	<u>accaataaat</u>	<u>cccagaccca</u>	<u>gtcttcacc</u>	<u>taattctgat</u>
	841	<u>acatctaaag</u>	<u>agacgtcttt</u>	<u>gacagtgaat</u>	<u>aaagagacaa</u>	<u>cagttgaaac</u>	<u>taaagaaact</u>
	901	<u>actacaacaa</u>	<u>ataaacagac</u>	<u>ttcaactgat</u>	<u>ggaaaagaga</u>	<u>agactacttc</u>	<u>cgctaaagag</u>
	961	<u>acacaaagta</u>	<u>tagagaaaac</u>	<u>atctgctaaa</u>	<u>gatttagcac</u>	<u>ccacatctaa</u>	<u>agtgtctggt</u>
25	1021	<u>aaacctacac</u>	<u>ccaagctga</u>	<u>aactacaacc</u>	<u>aaaggccctg</u>	<u>ctctcaccac</u>	<u>tcccaggag</u>
	1081	<u>cccacgccc</u>	<u>ccactccca</u>	<u>ggagccgtgca</u>	<u>tctaccacac</u>	<u>ccaagagccc</u>	<u>cacacctacc</u>
	1141	<u>accatcaagt</u>	<u>ctgcacccc</u>	<u>caccccccaag</u>	<u>gagcctgcac</u>	<u>ccaccaccac</u>	<u>caagtctgca</u>
	1201	<u>cccaccactc</u>	<u>ccaaggagcc</u>	<u>tgaaccacc</u>	<u>accaccaagg</u>	<u>agcctgcacc</u>	<u>caccactccc</u>
30	1261	<u>aaggagcctg</u>	<u>caccaccacc</u>	<u>caccaaggag</u>	<u>cctgcaccca</u>	<u>ccaccacca</u>	<u>gtctgcaccc</u>
	1321	<u>accactccc</u>	<u>aggagcctgc</u>	<u>accaccacc</u>	<u>cccagaagc</u>	<u>ctgcccacc</u>	<u>taccccccaag</u>
	1381	<u>gagcctgcac</u>	<u>ccaccactcc</u>	<u>caaggagcgc</u>	<u>acaccacca</u>	<u>ctcccaggga</u>	<u>gcctgcaccc</u>
	1441	<u>accaccaagg</u>	<u>agcctgcacc</u>	<u>caccactccc</u>	<u>aaagagcttg</u>	<u>caccactgc</u>	<u>ccccagaag</u>
	1501	<u>cctgcccaca</u>	<u>ctaccccaca</u>	<u>ggagcctgca</u>	<u>cccaccactc</u>	<u>ccaaggagcc</u>	<u>tgaccacc</u>
35	1561	<u>accaccaagg</u>	<u>agccttcacc</u>	<u>caccactccc</u>	<u>aaggagcctg</u>	<u>caccaccac</u>	<u>caccaagctc</u>
	1621	<u>gcaccaccac</u>	<u>ctaccaagga</u>	<u>gcctgcaccc</u>	<u>accactacca</u>	<u>agtctgcacc</u>	<u>caccactccc</u>
	1681	<u>aaggagcctt</u>	<u>caccaccacc</u>	<u>caccaaggag</u>	<u>cctgcaccca</u>	<u>ccactccca</u>	<u>ggagcctgca</u>
	1741	<u>cccaccaccc</u>	<u>ccaagaagcc</u>	<u>tgcccact</u>	<u>accccccaag</u>	<u>agcctgcacc</u>	<u>caccactccc</u>
40	1801	<u>aaggaaacctg</u>	<u>caccaccacc</u>	<u>caccaagaag</u>	<u>cctgcagcca</u>	<u>ccgctccca</u>	<u>agagcctgcc</u>
	1861	<u>ccaactacc</u>	<u>ccaaggagac</u>	<u>tgaccacc</u>	<u>accccccaaga</u>	<u>agctcacgcc</u>	<u>caccaccccc</u>

45

50

55

60

65

ES 2 324 199 T3

1921 gagaagctcg caccaccac ccctgagaag cccgcaccca ccaccctga ggagctcgca
 1981 cccaccacc ctgaggagcc cacaccacc accctgagg agcctgctcc caccactccc
 2041 aaggcagcgg ctcccaacac ccctaaggag cctgctccaa ctaccctaa ggagcctgct
 5 2101 ccaactaccc ctaaggagcc tgtccaact accctaagg agactgctcc aactaccct
 2161 aaagggactg ctccaactac cctcaaggaa cctgcaccca ctactccaa gaagcctgcc
 2221 tccaaggagc ttgcaccac caccaccaag gagcccacat ccaccacctc tgaaagccc
 2281 gctccaacta ccctaaggg gactgctcca actacccta adgadctgc tccaactacc
 2341 cctaaggagc ctgctgccaac taccctaag gggactgctc caactaccct caaggaacct
 10 2401 gcaccaacta ctcccaagaa gctgcccc aaggagcttg caccaccac caccaagggg
 2461 cccacatcca ccacctctga caagcctgct ccaactacac ctaaggagac tgctccaact
 2521 acccccaagg agcctcgacc cactaccccc aagaagcctg ctccaactac tcctgagaca
 2581 cctctccaa ccaactcaga ggtctctact ccaactacca ccaaggagcc taccactatc
 15 2641 cacaaaagcc ctgatgaatc aactcctgag ctttctgcag aaccacacc aaaagctctt
 2701 gaaaacagtc ccaaggaacc tggtgtacct acaactaaga ctcctgcagc gactaaacct
 2761 gaaatgacta caacagctaa agacaagaca acagaaagag acttacgtac tacacctgaa
 2821 actacaactg ctgcacctaa gatgacaaaa gagacagcaa ctacaacaga aaaaactacc
 2881 gaatccaaaa taacagctac aaccacacaa gtaacatcta ccacaactca agataccaca
 20 2941 ccattcaaaa ttactactct taaaacaact actcttgcac ccaagtaac tacaacaaaa
 3001 aagacaatta ctaccactga gattatgaac aaacctgaag aaacagctaa acaaaaagac
 3061 agagctacta attctaaaagc gacaactcct aaacctcaaa agccaaccaa agcaccaaa
 3121 aaaccactt ctacaaaaa gccaaaaaca atgctcagag tgagaaaaac aaagacgaca
 25 3181 ccaactcccc gcaagatgac atcaacaatg ccagaattga aacctacctc aagaatagca
 3241 gaagccatgc tccaaaccac caccagacct aaccaaactc caaactccaa actagttgaa
 3301 gtaaatccaa agagtgaaga tgagggtggt gctgaaggag aaacacctca tatgcttctc
 3361 aggcccatg tgttcatgcc tgaagttact cccgacatgg attacttacc gagagtacc
 3421 aatcaaggca ttatcatcaa tcccatgctt tccgatgaga ccaatatatg ccatggtaag
 30 3481 ccagtagatg gactgactac tttgcgcaat gggacattag ttgcattcog aggtcattat
 3541 ttctggatgc taagtccatt cagtccacca tctccagctc gcagaattac tgaagtttgg
 3601 ggtattcctt ccccattga tactgttttt actaggtgca actgtgaagg aaaaactttc
 3661 ttctttaaag attctcagta ctggcgtttt accaatgata taaaagatgc agggtacccc
 35 3721 aaaccaattt tcaaaggatt tggaggacta actggacaaa tagtggcagc gctttcaaca
 3781 gctaaatata agaactggcc tgaatctgtg tattttttca agagaggtgg cagcattcag
 3841 cagtatattt ataaacagga acctgtacag aagtgcctcg gaagaaggcc tgctctaat
 3901 tatccagtg atggagaaat gacacaggtt aggagacgtc gctttgaacg tgctatagga
 3961 ccttctcaaa cacacaccat cagaattcaa tattcacctg ccagactggc ttatcaagac
 40 4021 aaagtggtcc ttcataatga agttaaagtg agtatactgt ggagaggact tccaaatgtg
 4081 gttacctcag ctatatact gcccaacatc agaaaacctg acggctatga ttactatgcc
 4141 ttttctaaag atcaatacta taacattgat gtgcctagta gaacagcaag agcaattact
 4201 actcgttctg ggcagacctt atccaaagtc tggtaacaact gtccttagac tgatgagcaa
 45 4261 aggaggagtc aactaatgaa gaaatgaata ataaattttg acactgaaaa acattttatt
 4321 aataaagaat attgacatga gtataaccagt ttatatataa aaatgttttt aaacttgaca
 4381 atcattacac taaaacagat ttgataatct tattcacagt tgttattggt tacagaccat
 4441 ttaattaata tttctctgt ttattcctcc tctcctccc attgcatggc tcacacctgt
 4501 aaaagaaaaa agaatcaaat tgaatatatc ttttaagaat tcaaaactag tgtattcact
 50 4561 taccctagtt cattataaaa aatatctagg cattgtggat ataaaactgt tgggtattct
 4621 acaacttcaa tggaaattat tacaagcaga ttaatccctc ttttgtgac acaagtacaa
 4681 tctaaaagtt atattggaaa acatggaaaat attaaaattt tacactttta ctagctaaaa
 4741 cataatcaca aagctttatc gtgttgata aaaaaattaa caatataatg gcaataggta
 55 4801 gagatacaac aatgaatat aacactataa cacttcatat tttccaaatc ttaatttggga
 4861 tttaagggaag aatcaataa atataaaata taagcacata tttattatat atctaaggta
 4921 tacaaactcg tctacatgaa gtttacagat tggtaaatat catctgctca acatgtaatt
 4981 athtaataaa actttggaac attaaaaaaa taaattggag gcttaaaaaa aaaaaaaaaa
 5041 a (SEQ ID NO: 2)

60

65

ES 2 324 199 T3

TABLA 3

Límites de los exones del MSF

exón	Secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1	Secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 2
1	1-24, inclusive	34-105, inclusive
2	25-66, inclusive	106-231, inclusive
3	67-104, inclusive	232-345, inclusive
4	105-155, inclusive	346-498, inclusive
5	156-199, inclusive	499-630, inclusive
6	200-1140, inclusive	631-3453, inclusive
7	1141-1167, inclusive	3454-3534, inclusive
8	1168-1212, inclusive	3535-3670, inclusive
9	1213-1263, inclusive	3671-3822, inclusive
10	1264-1331, inclusive	3823-4026, inclusive
11	1332-1371, inclusive	4027-4146, inclusive
12	1372-1404, inclusive	4147-4245, inclusive

El lubricante de capa límite aislado del líquido sinovial es una variante de empalme alternativo del MSF. Se ha encontrado que esta variante de empalme alternativo es la composición presente en el líquido sinovial que confiere propiedades lubricantes a la articulación. El lubricante de capa límite aislado del líquido sinovial humano contiene aminoácidos codificados por los exones 2 y 4-12 del gen del MSF, es decir, la variante de empalme alternativo carece de los aminoácidos codificados por los exones 1 y 3 del gen del MSF. Un polipéptido recombinante o producido químicamente que contengan por lo menos el exón 6 (pero no los exones 1 ó 3) del MSF es útil para prevenir y/o tratar una enfermedad osteoartrítica. Para lubricar las articulaciones de los mamíferos se administra también un polipéptido recombinante o producido químicamente lubricante que contiene por lo menos una repetición de la secuencia de aminoácidos KEPAPTT (SEQ ID NO: 3) ya sea idéntica, ya sea con una sustitución conservadora.

Producción y purificación de polipéptidos recombinantes lubricantes

Para producir polipéptidos recombinantes se transfecta el DNA que contiene el exón 6 de MSF (nucleótidos 631-3453 de la SEQ ID NO: 2) con un vector de expresión apropiado a una célula. El DNA puede contener además algunos o todos los exones 7 (nucleótidos 354-3534 de la SEQ ID NO: 2), 8 (nucleótidos 3535-3670 de la SEQ ID NO: 2) ó 9 (nucleótidos 3671-3822 de la SEQ ID NO: 2) del gen del MSF. Los cebadores para los métodos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar un DNA que abarque varios exones de MSF se indican a continuación. Otras isoformas se expresan clonando ácidos nucleicos correspondientes a los exones del MSF que codifican a las secuencias de aminoácidos que se pretenden expresar.

TABLA 4

Cebadores para la PCR

exones del MSF	cebador delantero	cebador inverso
exón 2	5'AGATTTATCAAGCTGTGCA GGGAG3' (SEQ ID NO:7)	5'TTTACAGGAAAGC TCCGCAGTG3' (SEQ ID NO:8)
exón 6	5'TCAAGGTCACAACCTCCTGA CACG3' (SEQ ID NO:9)	5'CTCTCGGTAAGTAATC CATGTCGG3' (SEQ ID NO:10)
exones 2-12	5'TTGTTGCTGCTGTCTGTTTT CG3' (SEQ ID NO:11)	5'TGGATAAGGTCTGCCC AGAACGAG3' (SEQ ID NO:12)
exones 6-12	5'TCAAGGTCACAACCTCCTGA CACG3' (SEQ ID NO: 13)	5'GATGGTGTGTGTTTGA GAAGGTCC3' (SEQ ID NO:14)

En la biología molecular ya se conocen los métodos para diseñar los cebadores delantero e inverso empleados para obtener los DNA que codifican a los polipéptidos de tribonectina de varias longitudes y que incorporan varios exones del gen del MSF, p.ej. para obtener un polipéptido codificado por los exones 2, 4-12; exones 6-9; y exones 2, 4-9. Los expertos en la biología molecular ya conocen los métodos estándar para transfectar células de ácido nucleico aislado. Por ejemplo, se transfectan células procariotas o eucariotas de cultivo con el DNA de la invención unido operativamente a las secuencias de control de expresión apropiadas para lograr un nivel alto de expresión en la célula. Estas células son útiles para producir grandes cantidades del polipéptido lubricante, que se purifican por métodos estándar. Se emplean los polipéptidos lubricantes terapéuticamente para el tratamiento o la prevención de enfermedades artríticas. Además, los polipéptidos pueden utilizarse para generar anticuerpos contra glucoproteínas o glucopéptidos lubricantes de origen natural o producidos por métodos recombinantes.

Por ejemplo, el producto genético recombinante se expresa en forma de proteína de fusión y se purifica empleando un sistema comercial de expresión y purificación, p.ej. el sistema de expresión pFLAG (IBI). Los sistemas de expresión que pueden emplearse para las finalidades de la invención incluyen, pero no se limitan a: microorganismos tales como bacterias (p.ej. *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con vectores de expresión de DNA bacteriófago recombinante, DNA plásmido o DNA cósmido que contienen la molécula de ácido nucleico aquí descrita. Para la producción de polipéptidos glucosilados se emplean sistemas de expresión eucariotas. Se emplean levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces* y *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levaduras recombinantes que contienen al ácido nucleico recombinante que codifica a un polipéptido de tribonectina. Son también útiles los sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión víricos recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las moléculas de ácido nucleico que codifican a una tribonectina y sistemas de células de mamíferos (p.ej. células COS, CEO, BEK, 293, VERO, HeLa, MDCK, W138 y NIH 3T3) que albergan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (p.ej. el promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (p.ej. el promotor tardío de adenovirus y el promotor 7.5K del virus de la vacuna). Además de las aplicaciones clínicas, se inyectan los polipéptidos recombinantes a conejos o roedores para producir anticuerpos del modo descrito a continuación.

El líquido sinovial de una articulación inflamada o lesionada contiene enzimas proteolíticas que degradan a las proteínas o polipéptidos lubricantes. Por ejemplo, las células inmunes infiltradas, por ejemplo los neutrófilos, secretan tripsina y/o elastasa. Incluso una lesión de menor importancia de una articulación o un estado inflamatorio pueden derivar en una infiltración celular y en la secreción de enzimas proteolíticas, que provocan una sinovitis traumática. La sinovitis durante un período de unos pocos días o semanas puede provocar la pérdida de la capa citoprotectora de la articulación, que a su vez conduce a la pérdida de cartílago. Los apoyos cartilagosos no lubricados pueden experimentar un desgaste prematuro que puede ser el inicio de la osteoartritis. Los individuos que presentan a nivel clínico una efusión traumática (p.ej. “agua en la rodilla”) están predispuestos a desarrollar una osteoartritis; la elaboración de enzimas proteolíticas degrada y agota las composiciones lubricantes de origen natural del líquido sinovial. El agotamiento de las composiciones lubricantes naturales se observa en otras enfermedades inflamatorias de las articulaciones, por ejemplo en la artritis reumatoide. Reemplazando o suplementando el líquido sinovial de estas articulaciones lesionadas con las composiciones lubricantes de la invención se impide el desarrollo de la osteoartritis a largo plazo (p.ej. años, incluso décadas después) y se lubrica de inmediato la articulación, minimizando el daño a corto plazo.

Para lubricar articulaciones de mamíferos se emplean análogos, homólogos o miméticos de péptidos lubricantes que son menos susceptibles de degradación “*in vivo*”. Los análogos pueden diferir de los péptidos de origen natural por la secuencia de aminoácidos, o por modificaciones que no afectan a la secuencia, o por ambas cosas. Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen la derivatización química “*in vivo*” o “*in vitro*” de los polipéptidos, p.ej. la acetilación o la carboxilación. Se incluyen también las modificaciones de glucosilación, p.ej. las realizadas modificando los modelos de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesado, o en los pasos posteriores del procesado, p.ej. exponiendo el polipéptido a enzimas que afecten a su glucosilación, p.ej. enzimas de glucosilación o desglucosilación en mamíferos.

Cuando la degradación proteolítica de los péptidos después de la inyección a un sujeto es un problema, la sustitución de un enlace peptídico especialmente sensible por un enlace peptídico mimético no rompible hace que el péptido resultante sea más estable y, por tanto, más útil como agente terapéutico. Para hacer que los péptidos terapéuticos sean menos susceptibles de descomposición por acción de las peptidasas, como son la tripsina o la elastasa, los enlaces peptídicos de un péptido podrán reemplazarse por un tipo alternativo de enlace covalente (un “péptido mimético”). La tripsina, elastasa y otras enzimas pueden obtenerse por infiltración de células inmunes durante la inflamación de la articulación. La tripsina rompe el enlace peptídico del lado carboxi de la lisina y de la arginina; la elastasa rompe el lado carboxi de la alanina y de la glicina. La trombina, una serina-proteasa que está presente en las articulaciones hemorrágicas, rompe un enlace peptídico del lado carboxi de la arginina. Las colagenasas son un grupo de enzimas producidas por los fibroblastos y condrocitos cuando el metabolismo sinovial está alterado (p.ej. durante una lesión). Estas enzimas rompen el lado carboxi de la glicina y de la prolina. Uno o más enlaces peptídicos sensibles a las peptidasas, p.ej. los que aparecen en la secuencia repetitiva del KEPAPTT (SEQ ID NO: 3), se alteran (p.ej. se sustituyen por un enlace no peptídico) convirtiendo el sitio en menos susceptible de rotura, con lo cual se aumenta la vida media clínica de la formulación terapéutica.

Tales miméticos y los métodos de incorporarlos a los polipéptidos ya son conocidos en la técnica. De igual manera, la sustitución de un resto de L-aminoácido por un resto de D-aminoácido es un método estándar para aumentar la

resistencia del polipéptido a la proteólisis. Son también útiles los grupos de bloqueo del extremo amino, por ejemplo los grupos t-butiloxicarbonilo, acetilo, teflo, succinilo, metoxisuccinilo, suberilo, adipilo, azelaílo, dansilo, benciloxicarbonilo, fluorenilmtoxycarbonilo, metoxiazelaílo, metoxiadipilo, metoxisuberilo y 2,4-dinitrofenilo.

5 Las formulaciones clínicas de las tribonectinas pueden contener también inhibidores de peptidasas, como es la N-metoxisuccinil-AlaAla-Pro-Val-clorometilcetona (inhibidor de la elastasa). Otros inhibidores de proteasa clínicamente aceptables (p.ej. los descritos en Berling y col., Int. J. Pancreatology 24, 9-17, 1998) como son la leupeptina, aprolinina, α 1-antitripsina, α 2-macroglobulina, el inhibidor de la α 1-proteasa, antiqumotripsina (ACHY), el inhibidor secretorio de proteasa en leucocitos (PSTI), se co-administran también con una tribonectina para reducir la rotura proteolítica y aumentar la vida media clínica. Puede administrarse también un cóctel de dos o más inhibidores de proteasas.

15 Las composiciones de polipéptidos de tribonectina o ácido nucleicos que codifican a estos polipéptidos se formulan en excipientes estándar, fisiológicamente compatibles, ya conocidos de la técnica, p.ej. solución salina tamponada con fosfato (PBS). Otras formulaciones y métodos para fabricar estas formulaciones son bien conocidas y pueden encontrarse p.ej. en el manual "Remington's Pharmaceutical Sciences". Las tribonectinas se formulan también con preparaciones de ácido hialurónico no reticulado o composiciones de viscosuplementación, por ejemplo preparaciones de ácido hialurónico reticulado. Cuando se añade una tribonectina a una formulación de viscosuplemento, la interacción de la tribonectina con el ácido hialurónico reduce la viscosidad del viscosuplemento.

20 Los métodos de obtención de glucopéptido y determinar el % de glucosilación ya son conocidos en la técnica, p.ej. se describen en la patente US-5,767,254. La presencia de N-acetilgalactosamina es indicativa de la presencia de oligosacáridos unidos a través de O (o de oligosacáridos unidos a través de Ser/Thr), en los que GalNAc se encuentra normalmente en el alfa-enlace O-glucosídico contiguo al aminoácido. La presencia de oligosacárido unido a través de O es se detecta también por fijación sobre Jacalín-sefarosa, una lectina vegetal inmovilizada que se fija sobre la secuencia del disacárido central Gal-beta-(1-3)-GalNAc unido a Ser/Thr en glucoproteínas, o la aglutinina de cacahuete, que se fija sobre el beta-(1-3)-Gal-GalNAc. Aplicando métodos estándar se distinguen los oligosacáridos unidos a través de O de los oligosacáridos unidos a través de N. Por ejemplo, los oligosacáridos que tienen un enlace O-glucosídico, pero no un enlace N-glucosídico, son susceptibles de separarse del péptido por tratamiento con una base suave, en presencia de borhidruro sódico (50 mM NaOH, 1M NaBH₄, 16 h a 45°C) para realizar la reacción de beta-eliminación.

35 *Aplicaciones veterinarias*

La osteoartritis canina es un trastorno clínico predominante, que se trata aplicando los métodos aquí descritos. Se estima que la osteoartritis afecta a uno de cada cinco perros adultos; se estima que 8 millones de perros sufren esta enfermedad degenerativa, potencialmente debilitante. Además, muchos dueños no se dan cuenta de los signos de dolor crónico de sus perros. Cualquier perro puede desarrollar una osteoartritis, pero los que corren un riesgo mayor son los perros de razas grandes, los perros geriátricos, los perros muy activos (p.ej. los animales empleados para el trabajo o para el deporte) y los que tienen anomalías articulares congénitas, por ejemplo la displasia de cadera o de codo.

45 Las enfermedades articulares degenerativas equinas, como la osteoartritis, es una causa de cojera y de merma de actividad de los caballos. Al igual que en los humanos y en otros mamíferos, las enfermedades degenerativas de las articulaciones que afectan a los caballos son trastornos progresivos de las articulaciones sinoviales caracterizados por la degeneración del cartílago articular y la efusión de la articulación. El trauma agudo o crónico, el abuso, la enfermedad de desarrollo, la inestabilidad de la articulación y la edad prolongada conducen a la sinovitis, al trastorno del metabolismo del condrocito y a la formación de fisuras en el cartílago articular. Las enzimas destructoras, por ejemplo la tripsina, elastasa, estromalisina y la hialuronidasa se liberan dentro de la articulación, degradan el líquido sinovial y los componentes del cartílago, provocando una menor viscosidad del líquido sinovial, peor lubricación, depresión en el metabolismo del cartílago y mayor desgaste, que conducen al dolor y a la erosión del cartílago. Las estrategias terapéuticas actuales incluyen medicaciones para paliar el dolor y los fármacos antiinflamatorios. Las composiciones y métodos aquí descritos son útiles para recuperar la capacidad lubricante de la articulación afectada.

55 *Administración de polipéptidos terapéuticos*

60 Se aplican los métodos estándar de administración de péptidos. Los expertos ya conocen estos métodos. Para la administración intraarticular, se introduce la tribonectina en la cavidad sinovial en una concentración de 20-500 mg/ml en un volumen aproximadamente de 0,1-2 ml por inyección. Por ejemplo, se inyecta 1 ml de una tribonectina de una concentración de 250 g/ml a la articulación de la rodilla empleando una jeringuilla fina (p.ej. calibre 14-22, con preferencia calibre 18-22). Las composiciones de la invención son también apropiadas para la administración parenteral, por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

65 Para impedir las adhesiones quirúrgicas, las tribonectinas aquí descritas se administran en la forma de gel, espuma, fibra o tejido. Una tribonectina formulada de este modo se coloca sobre o entre las interfases del tejido dañado o expuesto, con el fin de impedir la formación de adhesión entre las superficies yuxtapuestas. Para que sea eficaz, el gel

o la película debe permanecer en el sitio e impedir que los tejidos entren en contacto durante un tiempo suficientemente largo para que cuando el gel finalmente se disperse y los tejidos entren en contacto, ya no tengan tendencia a adherirse. Se evalúa la capacidad de las tribonectinas formuladas para la inhibición o prevención de la formación de adhesiones (p.ej. en forma de membranas, tejidos, espumas o geles) para impedir las adhesiones post-quirúrgicas en un modelo de abrasión cecal en ratas (Goldberg y col., en *Gynecologic Surgery and Adhesion Prevention*; Wiley-Liss, pp. 191-204, 1993). Se colocan las composiciones alrededor de ciegos de rata desgastados quirúrgicamente y se comparan con los controles no tratados (animales, cuyos ciegos se desgastan pero que no reciben tratamiento alguno). La reducción de la cantidad de adhesiones formadas en el modelo de ratas en presencia de la formulación de tribonectina frente a la cantidad en ausencia de tal formulación indica que la formulación es clínicamente eficaz para reducir la formación de adhesiones de tejido.

Las tribonectinas se emplean también para recubrir las extremidades y las articulaciones artificiales antes de su implantación a un mamífero. Por ejemplo, estos dispositivos se sumergen o se bañan en una solución de una tribonectina, p.ej. del modo descrito en las patentes US-5,709,020 o 5,702,456.

Los polipéptidos lubricantes tienen una longitud por lo menos de 10 aminoácidos (que contienen por lo menos una unidad repetitiva KEPAPTT (SEQ ID NO: 3) o por lo menos una XXTTTX (SEQ ID NO: 4)), normalmente una longitud de 20 aminoácidos contiguos, con preferencia por lo menos 40 aminoácidos contiguos, con mayor preferencia por lo menos 50 aminoácidos contiguos y con preferencia especial por lo menos de 60 a 80 aminoácidos contiguos. Por ejemplo, el polipéptido tiene aproximadamente una longitud de 500 aminoácidos y contiene 76 unidades repetitivas KEPAPTT (SEQ ID NO: 3). El polipéptido tiene una longitud no superior a 1404 restos, p.ej. tiene la secuencia de aminoácidos del MSF de origen natural (SEQ ID NO: 1), pero carece por lo menos de 5, 10, 15, 20 o 24 aminoácidos del MSF de origen natural. Estos péptidos se generan por métodos que los expertos ya conocen, incluida la rotura proteolítica de una proteína de MSF recombinante, la síntesis total o la ingeniería genética, p.ej. la clonación y la expresión por lo menos de los exones 6, 7, 8 y/o 9 del gen del MSF.

Los polipéptidos de tribonectina se purifican también por métodos bioquímicos. La enzima quimotripsina rompe por sitios, lo cual agrupa aminoácidos codificados por el exón 6 del gen del MSF. De este modo se obtiene un polipéptido que contiene aminoácidos codificados por el exón 6 del gen del MSF (pero no por cualquier otro exón de MSF) a partir de un producto genético de MSF de origen natural o producido por métodos recombinantes, mediante la digestión enzimática con quimotripsina. Después se somete el polipéptido a la purificación bioquímica estándar para obtener un polipéptido sustancialmente puro, apropiado para la administración terapéutica, la evaluación de la actividad lubricante o la producción de anticuerpos.

Las composiciones terapéuticas se administran en un vehículo farmacéuticamente aceptable (p.ej. solución salina fisiológica). Los vehículos se eligen en función del modo o vía de administración y de la práctica farmacéutica estándar. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición terapéutica (p.ej. un polipéptido lubricante) es una cantidad que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un animal tratado, p.ej. la lubricación de la capa límite de una articulación de un mamífero. Un resultado médicamente deseable es la reducción del dolor (medida, p.ej. empleando una escala visual analógica del dolor, descrita por Peyron y col., *J. Rheumatol.* (supl. 39), 10-15, 1993) o una mayor capacidad de mover la articulación (medida p.ej. empleando la podometría descrita por Belcher y col., *J. Orthop. Trauma* 11, 106-109, 1997). Otro método para medir la lubricación del líquido sinovial después del tratamiento consiste en reaspirar un pequeño volumen de líquido sinovial de la articulación afectada y analizar las propiedades lubricantes “*in vitro*” empleando un aparato de fricción que se describe a continuación.

Como ya se sabe en las técnicas médicas, la dosificación administrada a cualquier animal dependerá de muchos factores, incluido el tamaño del animal, la extensión de la superficie corporal, la edad, el compuesto particular que se administra, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado general de salud y los demás fármacos que puedan administrarse de modo simultáneo. La administración será normalmente local a la articulación lesionada o inflamada. Como alternativa, los polipéptidos pueden administrarse mediante un implante de liberación lenta en el tiempo, colocado en la proximidad inmediata a la articulación, para que libere lentamente el fármaco en el sitio de la articulación lesionada o inflamada.

55 *Terapia genética*

La terapia genética se realiza administrando al mamífero un ácido nucleico que codifique a un polipéptido lubricante terapéutico, p.ej. el DNA que codifica a una o más unidades repetitivas o a la secuencia de aminoácidos KEPAPTT (SEQ ID NO: 3) o el DNA que codifica un fragmento lubricante del MSF, empleando vectores estándar y/o sistemas de transporte genético. Los sistemas apropiados de transporte genético incluyen los liposomas, los sistemas de transporte mediados con receptores, los DNA desnudos o los vectores víricos, por ejemplo los herpes virus, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados.

Además del sistema de transporte genético recién descrito, la composición terapéutica puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable, p.ej. un vehículo biológicamente compatible, por ejemplo una solución salina fisiológica, idónea para la administración a un animal. Una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de ácido nucleico o polipéptido es una cantidad que es capaz de producir un resultado médicamente deseable en un animal tratado, p.ej. una reducción del dolor asociado con el movimiento de la articulación, un aumento de la función lubricante

ES 2 324 199 T3

del líquido sinovial. Para la administración del compuesto puede utilizarse la vía parenteral, por ejemplo la intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal. Con preferencia, las composiciones terapéuticas, tales como los ácidos nucleicos o los polipéptidos se administran por vía intraarticular. La dosis destinada a cada paciente dependerá de muchos factores, incluyendo la talla del paciente, la extensión de su superficie corporal, su edad, el compuesto concreto a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado general de salud y tomando en consideración otros fármacos que se administren de modo simultáneo (p.ej. fármacos antiinflamatorios, fármacos viscoterapéuticos). Una dosis preferida para la administración de ácido nucleicos se sitúa aproximadamente de 10^6 a 10^{22} copias de la molécula de ácido nucleico.

Se introducirá el DNA en las células diana del paciente con vectores estándar, p.ej. un vector que contenga el DNA que codifica a una tribonectina unida operativamente con la secuencia de promotor. Los sistemas idóneos de transporte genético pueden incluir a los liposomas, los sistemas mediados por receptores, el DNA desnudo y los vectores víricos, tales como el herpes virus, retrovirus y adenovirus, entre otros.

El DNA puede administrarse localmente empleando sistemas de transporte de tipo adenovirus o virus adenoasociados, aplicando métodos estándar. Por ejemplo, en la patente US-5,858,355 se describen métodos de administración de DNA por vía intraarticular al líquido sinovial y los métodos de administración de DNA a células del líquido sinovial (p.ej. fibroblastos sinoviales o condrocitos). Las únicas secuencias de acción cis requeridas para la replicación y empaquetado de vectores de virus recombinantes adeno-asociados (AAV) son las unidades repetitivas AAV-terminales. Hasta 4 kb de DNA se insertan entre las unidades repetitivas sin efectuar replicación ni empaquetado vírico. Para empaquetar un vector AAV recombinante se co-transfecta un plásmido que contenga las unidades repetitivas terminales y el DNA que codifique a un polipéptido terapéutico a las células con un plásmido que exprese las proteínas de AAV-rep y de cápside. Las células transfectadas se infectan entonces con virus adeno-asociados y se aísla el virus AAV recombinante que contenga las secuencias deseadas a partir de dichas células, aproximadamente 48-72 horas después de la transfección. Después se administra el virus recombinante para las aplicaciones de terapia genética, aplicando métodos ya conocidos.

La electroporación es otro método para la introducción del DNA en células diana, p.ej. fibroblastos sinoviales o condrocitos, "ex vivo". Las células que tienen que someterse a electroporación se colocan en una solución salina tamponada con Hepes (EBS), en una concentración aprox. de 10^7 células por ml. El DNA que se quiere someter a electroporación se añade en una concentración de aproximadamente 5-20 microgramos/ml de EBS. Se introduce la mezcla en un dispositivo de electroporación y se aplica un campo eléctrico según los métodos estándar, p.ej. dentro del intervalo de 250 a 300 voltios. Una vez introducido el DNA en las células sinoviales "ex vivo", se vuelven a trasplantar las células sinoviales autólogas modificadas genéticamente en el dador mediante una inyección intraarticular. Se inyectan aproximadamente 10^7 células por vía intraarticular a las articulaciones en un volumen de aproximadamente 1 ml.

Las células sinoviales a las que se introducido el DNA se obtienen aplicando métodos rutinarios, p.ej. mediante un artroscopio. El artroscopio es una varilla hueca, pequeña, insertada en la rodilla mediante una pequeña herida punzante, que permite el acceso del instrumento quirúrgico para extraer por artroscopia las células sinoviales. En algunos casos, las células sinoviales de tejido escindido por artroscopia se extraen asépticamente por digestión enzimática de la matriz de tejido conjuntivo. Por ejemplo, se corta el sinovio en pieza de aproximadamente 1 mm de diámetro y se digiere sucesivamente en tripsina (0,28 p/v en solución salina equilibrada de Gey) a 37°C durante 30 minutos y en colagenasa (0,2% p/v en solución de sal equilibrada de Gey) a 37°C durante 2 horas. Se inyecta una suspensión de las células modificadas genéticamente en la articulación del mamífero receptor. Las inyecciones intraarticulares de este tipo son acciones rutinarias que se efectúan en la consulta del médico sin necesidad de intervención quirúrgica adicional. Si fuera necesario se efectuarán inyecciones repetidas.

Como alternativa, se formula el DNA (desnudo o empaquetado en un virus) en un vehículo farmacéutico idóneo y se inyecta por vía intraarticular. La terapia genética puede aplicarse también como medida profiláctica para prevenir el desarrollo de la osteoartritis en aquellos individuos, de los que se han detectado que son muy susceptibles de desarrollar esta enfermedad, p.ej. los que han sufrido una lesión articular aguda. La inyección intraarticular directa de un DNA que codifica a un polipéptido terapéutico en una articulación se traduce en la transfección de las células sinoviales del receptor para permitir la expresión del DNA.

Los fármacos que estimulan un promotor endógeno de tribonectina, p.ej. el TGF-beta, pueden administrarse también del modo antes descrito para aumentar el nivel de expresión sinovial.

60 *Producción de anticuerpos específicos de polipéptidos lubricantes sinoviales*

Los anticuerpos específicos de polipéptidos lubricantes se obtienen por técnicas que los expertos ya conocen. Tales anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Los anticuerpos policlonales pueden obtenerse, por ejemplo, por métodos descritos en Ghose y col., *Methods in Enzymology*, vol. 93, 326-327, 1983. Por ejemplo, se emplea un polipéptido lubricante codificado por los nucleótidos 632-3453 de la SEQ ID NO: 2 como inmunógeno para estimular la producción de anticuerpos policlonales en los antisuecos de un conejo. Pueden aplicarse métodos similares para generar antisuecos en animales del tipo cabras, ovejas y roedores.

ES 2 324 199 T3

Los anticuerpos monoclonales se obtienen por procesos bien conocidos, descritos por Milstein y Kohler en Nature 256, 495-497, 1975, o modificados por Gerhard, Monoclonal Antibodies, Plenum Press, páginas 370-371, 1980. Se exploran hibridomas para identificar a los que producen anticuerpos que sean muy específicos de un polipéptido lubricante sinovial. Con preferencia, el anticuerpo tiene una afinidad por lo menos de 10^8 litros/mol y con mayor preferencia una afinidad por lo menos de 10^9 litros/mol. Los anticuerpos monoclonales o policlonales proporcionan un medio para purificar rápidamente grandes cantidades de polipéptidos recombinantes lubricantes.

Aparte de los anticuerpos dirigidos contra el núcleo peptídico de una tribonectina, es deseable también un anticuerpo dirigido contra la porción azúcar o contra un complejo glucopéptido de una tribonectina. Para generar un anticuerpo contra el núcleo peptídico se emplea un péptido que abarque los aminoácidos 200-350 de la SEQ ID NO: 1. Para generar tales anticuerpos se emplean también péptidos más cortos, p.ej. de una longitud de 8-15 aminoácidos, que son idénticos a la porción de 8-15 aminoácidos de aminoácidos 200-350 de la SEQ ID NO: 1. Otros péptidos, que pueden utilizarse como inmunógenos para los anticuerpos específicos del núcleo peptídico de una tribonectina, incluyen a los que están en la región de los aminoácidos 24-66 de la SEQ ID NO: 1, los aminoácidos 105-155 de la SEQ ID NO: 1 o los aminoácidos 156-199 de la SEQ ID NO: 1. Para generar anticuerpos que se fijan sobre un polipéptido de tribonectina glucosilada (pero no sobre la forma desglucosilada o no glucosilada), el inmunógeno será con preferencia un glucopéptido, cuya secuencia de aminoácidos abarca una porción muy glucosilada de una tribonectina, p.ej. un péptido con una secuencia de aminoácidos de restos 200-1140 de la SEQ ID NO: 1. Se emplean también como inmunógenos a glucopéptidos más cortos, p.ej. de una longitud de 8-15 aminoácidos, de la misma región altamente glucosilada. Los métodos para generar los anticuerpos contra biomoléculas muy glucosiladas ya son conocidos en la técnica, véase p.ej. los descritos por Schneerson y col., J. Exp. Med. 152, 361-376, 1980.

Métodos de diagnóstico

La osteoartritis es una enfermedad que se desarrolla lentamente y es difícil de diagnosticar hasta que alcanza sus últimos estadios, cuando el dolor articular suele compeler al individuo a recurrir al tratamiento médico. El diagnóstico temprano de la osteoartritis o la predisposición a desarrollar esta enfermedad permite una intervención temprana para prevenir o reducir el desarrollo de la osteoartritis avanzada. La invención proporciona métodos para detección precoz de esta enfermedad o de la predisposición a desarrollarla mediante la exploración de líquidos corporales, por ejemplo el suero o la orina para determinar la presencia de fragmentos de tribonectinas de origen natural o la presencia de fragmentos del MSF. La detección y cuantificación de estos péptidos en líquidos biológicos ya es conocida en la técnica. Por ejemplo, se realiza un ensayo ELISA sandwich estándar empleando dos anticuerpos diferentes (p.ej. un primer anticuerpo que se fija sobre la porción oligosacárido del glucopéptido y un segundo anticuerpo que se fija sobre el núcleo peptídico del glucopéptido) dirigidos contra una tribonectina de origen natural. Como alternativa se emplea el análisis estándar de proteínas por cromatografía líquida y espectroscopía de masas, del modo descrito a continuación, para detectar los fragmentos del MSF en muestras biológicas. El valor de control es un valor predeterminado, asociado con un diagnóstico negativo; como alternativa, una muestra de control es una muestra biológica de un mamífero del que se sabe que no padece osteoartritis. Un incremento de la cantidad, comparada con el control, de 30 veces el valor del control o muestra indica que el animal sufre osteoartritis o está predispuesto a desarrollar la osteoartritis.

Caracterización de una tribonectina de líquido sinovial humano

Se recogen partes alícuotas de líquido sinovial de pacientes sometidos a artroscopia de diagnóstico y reemplazo total de la rodilla y se ensayan en el aparato de fricción. En ambos casos se aspira el líquido sinovial antes de iniciar cualquier procedimiento quirúrgico y se centrifuga inmediatamente a $10,000 \times g$ a 4°C durante 2 h para eliminar los escombros celulares. Se desechan las muestras contaminadas con sangre. Las partes alícuotas de capacidad lubricante normal se reúnen y se almacenan a -20°C .

Purificación y aislamiento de la tribonectina

Se filtra el líquido sinovial humano (200 ml) a través de unidades de filtro estériles de 0,22 micras (Nalgene) a 4°C durante dos días. Se rascan de las membranas del filtro los materiales retenidos y se suspenden de nuevo en un tampón 50 mM NaAc, de pH 5,5, hasta un volumen original del líquido sinovial que contiene inhibidores proteolíticos: 1 mM fluoruro de fenilmetil-sulfonilo (PMSF), 1 mM ácido paracloromercúrico-benzoico (PCMB) y 10 mM etilendiamina-tetraacetato (EDTA). La digestión del ácido hialurónico se realiza a 37°C con estreptomices-hialuronidasa en 1 U/ml de líquido sinovial resuspendido. Se introduce el material digerido en una columna DEAE (Whatman International, Maidstone, UK), se completa el volumen a 300 ml, se equilibra con tampón NaAc, 50 mM y se lava con 1,5 l del mismo tampón. Se eluye el material con actividad lubricante a través de la matriz DEAE con NaCl 1M. Se recoge 1 l de lavado y se concentra mediante una celdilla de flujo Amicon de 500 ml con una membrana XM-100 (corte de peso molecular: 100 kDa). Se dializa la muestra concentra frente a tampón fosfato 25 mM, de pH 7,4, que contiene 0,15 M NaCl y 0,5 mM CaCl_2 .

Se introduce el material concentrado, fijado sobre DEAE, en la parte superior de una columna de afinidad de aglutinina de cacahuete (PNA)-agarosa, con un tamaño de lecho ajustado a 25 ml, equilibrada a temperatura ambiente con tampón fosfato 25 mM y 0,15 M NaCl, de pH 7,4. Se eluye la proteína no fijada con el mismo tampón hasta que la absorbancia a 230 y 280 nm desciende hasta la línea de base. El material con actividad lubricante se eluye sobre todo en presencia de un gradiente gradual de α -lactosa en una concentración de 0,07 M en Tris 25 mM y 0,15 M NaCl, de pH 7,4. Se introduce este material en la parte superior de una columna de Actigel ALD-agarosa (Sterogene Bioseparations,

ES 2 324 199 T3

Arcadía, CA) unida a través de los grupos amina al anticuerpo monoclonal murino contra la fibronectina humana (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA) para eliminar la fibronectina, que es un contaminante. Se evalúa la pureza del material eluido con un análisis SDS-PAGE (5-15% acrilamida) teñido con azul Coomassie y con un análisis HPLC.

Los patrones de electroforesis de proteína se adquieren a GibcoBRL (Grand Island, NY) y el patrón de escalera de DNA se adquiere a FMC Bioproducts (Rockland, ME).

Cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC)

Se eluye una columna Bondpak C18 de 3,9 x 150 mm (Waters, Milford, MA) en fase inversa con un 45% (v/v) de metanol (Sigma) y un 5% (v/v) de acetonitrilo (Aldrich) de calidad HPLC, con un caudal de 1 ml/min a 35°C. Se somete el líquido eluido a análisis en un detector de matriz de fotiodos PDA 996 (Waters) y se analizan las fracciones de los picos de material con gráficos de pureza calculados con el programa informático Millennium 32 (Waters).

Aparato de fricción

Se emplea un aparato de fricción estándar (p.ej. el aparato descrito por Jay y col., Conn. Tiss. Res. 28, 71-88, 1992, o Jay y col., J. Biomed. Mater. Res. 40, 414-418, 1998) para medir la actividad lubricante. Se hace oscilar látex natural contra un anillo de vidrio pulido, con una zona constante de contacto de 1,59 cm². El sistema de apoyo se carga axialmente dentro de un sistema de articulaciones cardán, libre para girar con respecto a dos ejes horizontales perpendiculares. Se eligen el látex y el vidrio como materiales de apoyo porque presentan una superficie plana con poca altura de asperezas, del orden de 0,05 mm. El látex, al igual que el cartílago, se adapta. Dentro del sistema de cardanes, estas superficies poseen una coplanaridad casi perfecta. Por tanto no se generan cuñas de líquido y solamente está presente una capa fina de líquido frontera. La velocidad de arrastre (es decir, la velocidad de desplazamiento) es de 0,37 mm/s, con una presión constante de contacto de 0,35 x 10⁶ N/m².

El aparato de fricción registra desplazamientos del sistema de cardanes alrededor del eje vertical de carga gracias a un transductor de tensión por desplazamiento lineal, cuyo voltaje de salida es directamente proporcional a la magnitud del par de fricción. El pico de la amplitud de pico de esta señal se relaciona con μ mediante el calibrado previo con pares de fricción conocidos.

Se limpian a fondo las superficies a ensayar antes de utilizarlas. Se lava una pieza de 3,8 x 3,8 cm de látex, fijada sobre un espárrago de acero inoxidable, con una corriente de agua desionizada destilada (ddw) durante 2 min. Después se coloca en un baño poco profundo de solución salina fisiológica NaCl al 0,9% (PS). Se ducha el marco de vidrio con una solución de detergente 7X al 1% (v/v) (Flow Laboratories, McLean, VA) en ddw durante 10 min y se deja impregnar en la misma solución a 100°C. Se realiza también una ducha de 5 min con la solución 7X caliente y posterior enjuague durante 2-4 min en una corriente de ddw.

Se mide el μ a 35°C, pero antes se realiza una medición de línea base del μ con la PS. La lubricación se manifiesta en una reducción del μ con respecto al μ de la PS. Los valores delta negativos indican lubricación, mientras que los valores positivos indican fricción. La adición de 200 ml de PS y después 200 ml del lubricante a ensayar se realizan colocando las superficies de apoyo en una proximidad suficiente para que la solución humecte las dos superficies. Pasados 5 min de equilibrado, se deja descansar el apoyo recubierto con látex sobre el vidrio, de modo que oscile. Los voltajes de pico a pico se registran automáticamente después de 1, 3 y 5 min. Entonces se separan las superficies durante 2 min y se vuelven a poner en contacto para otra sesión de 5 min. Los valores μ de los 3 y 5 min de las dos últimas sesiones de 5 min se estabilizan típicamente y se registran.

Se adquiere la fibronectina de suero humano a la empresa Sigma Chemical (F0895, St. Louis, MO) y se dializa frente a una PS antes de utilizarse en el aparato de fricción.

Los lubricantes de capa límite ejercen su efecto cambiando las características físico-químicas de la superficie. Las superficies de apoyo tienen que generar una repulsión mutua para lubricarse en el modo de límites. Los ejemplos típicos de lubricantes límites a temperatura ambiente son el grafito, el Teflón y el sulfuro de molibdeno. Estas composiciones reducen la fricción entre las superficies de apoyo y por ello se emplean como controles positivos del ensayo para medir las propiedades lubricantes de las tribonectinas. Las tribonectinas son lubricantes límites que pueden tener un carácter anfipático recubriendo superficies hidrófobas no biológicas, como son las del látex. El componente oligosacárido de una tribonectina se entrelaza con el entorno acuoso circundante. Cuando se eliminan los azúcares último y penúltimo de una tribonectina de origen natural purificada a partir de líquido sinovial, se elimina la capacidad lubricante.

El artrotipsómetro de látex: vidrio ofrece una vía directa para ensayar repetidamente los factores lubricantes biológicos purificados con buena reproducibilidad. El látex natural y el vidrio pulido son superficies de apoyo con poca variación (o quizá ninguna) en las características físico-químicas de un ensayo al siguiente. En cambio, un cartílago resectado apoyado sobre vidrio pulido o sobre otro cartílago sufrirá una deformación, que no puede controlarse con precisión. El valor μ observado en un apoyo de cartílago-cartílago lubricado con líquido sinovial se sitúa entre 0,005 y 0,024. Los valores de μ del sistema látex: vidrio son considerablemente más elevados y se sitúan por ejemplo en 0,04 o menos. Las diferencias del μ entre los materiales de apoyo se atribuyen al contenido de agua del 80% (p/p) que tiene el cartílago.

ES 2 324 199 T3

Análisis de proteínas por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas (LC-EM)

El análisis LC-EM estándar se realiza con materiales digeridos trópticos del material lubricante purificado descrito en páginas anteriores. Se analizan bandas escindidas de geles de SDS-PAGE de 2 mm de grosor y gradiente 5-20% (Biorad Laboratories, Hercules, CA) que contienen el material lubricante. Se desglucosila el material con NaNasa III y O-glucosidasa DS (Glyko, Novato; CA). Se efectúa la desglucosilación con las enzimas anteriores de actividades de 0,17 U/ml y 0,10 U/ml, respectivamente, durante 18 h en presencia de 0,5 mg/ml de una tribonectina purificada de líquido sinovial. En todos los casos, las rebanadas de gel se cortan por el centro de la banda y tienen un tamaño de 16 mm³. Todas las superficies de contacto se limpian cuidadosamente con acetonitrilo del 50% (v/v). Los datos de secuencia se introducen en el algoritmo de búsqueda BLAST GENBANK[®] y se identifican las coincidencias.

Aislamiento y cultivo de fibroblastos sinoviales humanos

Se obtiene sinovio humano de aspecto normal a partir de un varón blanco de 30 años, sometido a artroscopia. En 1 h después de la cirugía se lava el explante de tejido sinovial tres veces con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, exenta de calcio y de magnesio (GIBCO). Se introducen piezas de 2 mm³ de tamaño en medio Dulbecco modificado por Eagle (GIBCO), suplementado con 100 U de penicilina y 100 mg de estreptomycin por ml (GIBCO), que contiene 4 mg/ml de clostridio-peptidasa A (Worthington Biochemical CLS, 125-200 U/mg) esterilizada a través de un filtro de 0,22 µm (Nalgene). Se dividen además los fragmentos de tejido en una cápsula petri de plástico de 100 mm (Falcon) y se incuban en 20 ml de medio a 37°C durante 4 h en atmósfera húmeda que contiene un 5% de dióxido de carbono y un 95% de aire.

Se mezcla bien el material digerido varias veces por aspiración a y expulsión de una pipeta Pasteur. Se añade un volumen igual de tripsina del 0,05% y EDTA del 0,02% en solución salina A modificada de Puck (GIBCO) y se continúa la incubación durante una hora más en las mismas condiciones. Se centrifuga la suspensión a 400 x g a 23°C durante 10 min y se lava tres veces con 40 ml de solución salina tamponada con fosfato, exenta de calcio y de magnesio, cada vez. Se suspende el culote en medio modificado de Eagle (20 ml) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Flow Laboratories), 100 U de penicilina y 100 mg de estreptomycin por ml. Se depositan dos mililitros de esta mezcla final por cápsula de petri de plástico de 60 mm (Falcon). Se cultivan los fibroblastos sinoviales hasta confluencia y se recolectan las células. Se cultivan también fibroblastos de piel humana (American Type Culture Collection (ATCC), denominación: CCD-10995K; ATCC, Mannassas, VA) que sirven de control y se recolectan del modo recién descrito.

Extracción de RNA y análisis por RT-PCR

Se purifica el RNA de fibroblastos sinoviales y cutáneos en columna y reactivos RNeasy (Qiagen, Crawley, Ltd., UK). Se elimina el DNA genómico contaminante con DNashredder y DNasa (libre de RNasa) (Qiagen). Se sintetiza el cDNA de la primera hebra por transcripción inversa y amplificación PCR empleando los siguientes cebadores oligonucleótidos. Exón 6 de MSF: cebador delantero de 5'-CCAAACCACCAGTTGTAGATGAAGC-3' (SEQ ID NO: 15) y exón 6 de MSF cebador inverso de 5'-GCGGAAGTAGTCTTCTCTTTTCCATCAG-3' (SEQ ID NO: 16). Estos cebadores corresponden a los números de posiciones de nucleótidos 674-698 y 953-926, respectivamente, del gen del MSF humano (SEQ ID NO: 2; GENBANK[®]; número de acceso: U70136). Las condiciones de los ciclos térmicos son: 42°C durante 12 min, 95°C durante 10 min, después 43 ciclos entre 94°C x 20 s y 55-65°C x 30-90 s. La extensión final se realiza a 72°C durante 7 min (Perkin Elmer Biosystems).

Variante alternativa de empalme del MSF como tribonectina

Se purifica un polipéptido lubricante de líquido sinovial humano aplicando métodos bioquímicos estándar, por cromatografía de afinidad con aglutinina de cacahuete. La fracción final, la única que posee capacidad lubricante, contiene un producto de peso molecular aparente de 280 kDa. No se observan componentes de un peso molecular aparente superior a 280 kDa. El análisis LC-EM realizado en fragmentos trópticos de la banda escindida de 280 kDa indica la presencia de dos proteínas diferentes que, en el algoritmo de búsqueda BLAST, coinciden con el precursor de la fibronectina y con el MSF (GENBANK[™], n° de acceso: U70136). Las secuencias de MSF se identifican tanto en polipéptidos lubricantes nativos como en desglucosilados. Por consiguiente, el esquema de purificación termina en una columna anti-fibronectina que produce la eliminación de la fibronectina que es una impureza (ensayos realizados por HPLC analítica en columna C18 y análisis con gráfico de pureza). Además, las bandas más bajas de peso molecular aparente de 70 y 160 kDa del SDS-PAGE no están presentes en la preparación de tribonectina purificada eluida de la columna de anti-fibronectina. Se ensaya la tribonectina purificada en el aparato de fricción y se constata que ejerce una actividad lubricante de capa límite similar a la del líquido sinovial completo (tabla 5). En cambio, la tribonectina de suero purificada produce fricción, lo cual indica que la capacidad lubricante del líquido sinovial es un resultado de la presencia de la tribonectina purificada.

65

ES 2 324 199 T3

TABLA 5

Coefficientes de fricción de una tribonectina purificada de líquido sinovial humano y de una fibronectina (media ± desviación estándar (SD); N = 3)

5

lubricante*		(PS**)	
tribonectina	0,047±0,006	0,131±0,007	-0,084±0,004
HSF†	0,040±0,005	0,135±0,009	-0,095±0,011
fibronectina	0,161	0,136	+0,045±0,005
* ensayado en una concentración de 250 µg/ml en PS			
** PS = solución salina fisiológica			
† líquido sinovial humano "post-mortem"			

10

15

20

25

30

35

45

50

55

65

Además, con el análisis LC-EM de fragmentos trípticos se identifican porciones de los exones de 6 a 9 del MSF, ambos incluidos. La tribonectina purificada reacciona con la aglutinina de cacahuete, lo cual indica la presencia de oligosacáridos beta(1-3)Gal-GalNAC a raíz de su purificación. Se observa un aumento de la movilidad electroforética después de la digestión con la NaNasa III y la O-glucosidasa DS, lo cual indica que la tribonectina purificada está muy glucosilada por los oligosacáridos unidos a través de O. El peso molecular aparente de la tribonectina desglucosilada purificada a partir de líquido sinovial es de 120 kDa.

El análisis por RT-PCR se completa empleando cebadores específicos de las secuencias de nucleótidos que codifican al extremo N-terminal del exón 6 del MSF. Las RT-PCR que emplean RNA de fibroblasto sinovial humano generan un producto de 280 bp, la distancia prevista entre los cebadores designados. Los experimentos similares sin transcriptasa inversa no generan este producto, lo cual indica que el RNA está libre de DNA genómico. El RNA purificado de fibroblastos cutáneos no produce producto alguno empleando los mismos cebadores.

En primer lugar se aísla el MSF de monocitos humanos; se encuentra que un fragmento de MSF de 25 kDa estimula el desarrollo de megacariocitos. La proteína precursora de MSF tiene un tamaño de 1404 restos y se construye con 12 exones. Parece que el exón 6 codifica una mucina situada en posición central, que tiene una longitud de 940 restos. El exón 6 es homólogo de la vitronectina, los exones 2 y 3 parecen homólogos de las regiones similares a la somatomedina B y los exones 8 y 9 son similares de las regiones de vitronectina similares a la homopexina. La homopexina es una proteína eliminadora de la hema del suero que interacciona con el hialuronato.

Una tribonectina purificada del líquido sinovial y una proteína de zona superficial (SZP) de cartílago articular purificada de cartílago articular tienen en común la identidad de secuencia con el MSF, pero difieren en sus pesos moleculares aparentes y secuencias de aminoácidos.

Ejemplo 1

Expresión del gen de MSF en fibroblastos sinoviales humanos

Se constata que una tribonectina de origen natural se expresa en fibroblastos sinoviales humanos de un gen que codifica al MSF. Algunos, pero no todos los exones del gen del MSF se representan en el producto genético de la tribonectina. Por ejemplo, la tribonectina contiene secuencias codificadas por los exones 6-9 del gen del MSF, pero carece de las secuencias codificadas por lo menos por un exón del gen de MSF de origen natural.

La expresión del gen de MSF se evalúa del modo siguiente. Se reúnen las rebanadas de gel desde una banda de pesos moleculares aparentes de 240 kDa de la tribonectina purificada a partir de líquidos sinoviales humanos, de capacidad lubricante normal, y se digieren con tripsina. Se realiza la secuenciación N-terminal de los fragmentos trípticos por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas y los resultados se comparan con secuencias ya conocidas del GenBankTM. Se emplea la digestión de la tribonectina purificada con O-glucosidasa DS y NaNasa III para indicar el peso molecular de la proteína del núcleo. Se ensaya la capacidad lubricante con un aparato de fricción estándar por oscilación de látex natural contra un anillo de vidrio pulido.

Dos especies proteicas identificadas previamente están presentes en la fracción lubricante final del líquido sinovial humano. Se identifican fragmentos trípticos del precursor de fibronectina (FN) y el factor estimulador de megacario-

ES 2 324 199 T3

5 citos (MSF). Se observa una coincidencia del 100% (valor E comprendido entre 0,31 y 0,047) con secuencias de MSF específicas de los exones de 6 a 9. El MSF tiene un tamaño de 1104 aminoácidos con dominios funcionales múltiples similares a la vitronectina. Esta tribonectina reduce el coeficiente de fricción (μ) de 0,142 a 0,036, mientras que la fibronectina de suero purificada genera un μ de 0,136 a 0,181. Los cebadores delantero e inverso de la RT-PCR correspondientes a las posiciones de aminoácidos 214-222 y 300-309 de la SEQ ID NO: 1 se emplean para probar el mRNA purificado de fibroblastos sinoviales humanos cultivados “*in vitro*”. Se observa un producto genético de 280 bp que es consistente con la secuencia de aminoácidos prevista. Los datos aquí descritos indican que una tribonectina de origen natural se secreta en los fibroblastos sinoviales a través de la expresión del gen del MSF.

10 Los métodos descritos a continuación se emplean para caracterizar un componente lubricante del líquido sinovial.

Recogida de líquido sinovial humano

15 Se recogen partes alícuotas de líquido sinovial de pacientes sometidos a una artroscopia de diagnóstico o a una sustitución completa de la rodilla y se ensayan en el aparato de fricción. En ambos casos, se aspira el líquido sinovial antes de iniciar cualquier intervención quirúrgica e inmediatamente después se centrifuga a 10,000 x g a 4°C durante 2 h para eliminar los escombros celulares. Se descartan las muestras que están contaminadas con sangre. Se reúnen las partes alícuotas de capacidad lubricante normal y se almacenan a -20°C.

Purificación y aislamiento de tribonectinas humanas

20 Se filtran 200 ml de líquido sinovial humano a través de unidades filtrantes estériles de 0,22 μ m (Nalgene) a 4°C durante dos días. Se raspa el material retenido en las membranas filtro y se suspende de nuevo con tampón NaAc 50 mM, de pH 5,5, hasta el volumen original del líquido sinovial. El tampón de la resuspensión contiene inhibidores proteolíticos: 1 mM PMSF, 1 mM PCMB y 10 mM EDTA. Se realiza la digestión del ácido hialurónico a 37°C con estreptomicinas-hialuronidasa en una concentración de 1 U/ml de líquido sinovial resuspendido. Se introduce el material digerido en una columna DEAE (Whatman International, Maidstone, UK) volumen establecido de 300 ml, equilibrada con tampón NaAc, 50 mM y se lava con 1,5 l del mismo tampón. Se eluye el material deseado de la matriz de DEAE con NaCl 1 M. Se recoge 1 l de lavado y se concentra en una celdilla de flujo Amicon de 500 ml con una membrana XM-100 (corte de pesos moleculares = 100 kDa). Se dializa la muestra concentrada frente a un tampón fosfato 25 mM, de pH 7,4, que contiene NaCl 0,15 M y CaCl₂ 0,5 mM.

30 El material concentrado, fijado sobre la DEAE, se introduce en la parte alta de una columna de afinidad de aglutinina de cacahuete (PNA)-agarosa con un volumen de lecho predeterminado de 25 ml, se equilibra a temperatura ambiente con tampón fosfato 25 mM y NaCl 0,15 N, de pH 7,4. Se eluye la proteína no fijada con el mismo tampón hasta la absorbancia a 230 y 280 nm disminuye hasta la línea de base. Se eluye el máximo del material deseado en presencia un gradiente gradual de α -lactosa en una concentración de 0,07 M en 25 mM Tris y 0,15M NaCl de pH 7,4. Se introduce la tribonectina prepurificada en la parte superior de una columna de Actigel ALD-agarosa (Sterogene Bioseparations, Arcadia, CA) unida a través de los grupos amina con el anticuerpo monoclonal murino contra la fibronectina humana (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA). Se analiza el material eluye en un ensayo SDS-PAGE 5-15%, con tinción de azul Coomassie y por análisis HPLC.

Cromatografía de líquidos de alta eficacia

45 Se eluye en una columna μ Bondapak C18 de 3,9 x 150 mm (Waters, Milford, MA) en fase inversa con un 45% (v/v) de metanol (Sigma) y un 5% (v/v) de acetonitrilo (Aldrich) de calidad HPLC, con un caudal de 1 ml/min a 35°C. Se analiza el líquido eluido en un detector PDA 996 de matriz de fotodiodos (Waters) y se determina la pureza de los picos de la gráfica con el programa Millennium 32 (Waters).

Aparato de fricción

Se emplea un aparato de fricción estándar para medir la actividad lubricante tal como se ha descrito antes.

55 Se mide el μ a 35°C; esta medición va precedida por una medición de línea base del μ con PS. La lubricación se manifiesta en una reducción de μ con respecto al μ de la PS. Los valores $\Delta\mu$ negativos indican lubricación, mientras que los valores positivos indican fricción. Se efectúa la adición de 200 ml de PS y después 200 ml del lubricante a ensayar, a continuación se ponen en contacto las superficies de apoyo hasta una proximidad suficiente, de modo que la solución moje las dos superficies. Pasados 5 min de equilibrado, se deja descansar el apoyo recubierto de látex sobre el vidrio mientras se halla en oscilación. Después de 1, 3 y 5 min se registran automáticamente los voltajes de pico a pico. Entonces se separan las superficies durante 2 min y se vuelven a poner en contacto para otra sesión de 5 min. Se estabilizan los valores μ de los 3 y de los 5 min de las dos últimas sesiones de 5 min y se registran.

LC-EM

65 La LC-EM de los materiales digeridos trópticos se efectúa del modo descrito antes. Se escinde bandas de 2 mm de grosor de geles SDS-PAGE de un gradiente 5-20% (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA) para el siguiente análisis. Se efectúa la desglucosilación empleando la NaNasa III y la O-glucosidasa DS (Glyko, Novato, CA) (en concentraciones de 0,17 U/ml y 0,10 U/ml, respectivamente), durante 6 h, en presencia de 0,5 mg/ml de proteína. En todos los casos

ES 2 324 199 T3

se cortan las rebanadas de gel a través del centro de la banda y tienen un tamaño de 16 mm³. Todas las superficies de contacto se limpian cuidadosamente con acetonitrilo del 50% (v/v). Se introducen los datos de secuencia en el algoritmo de búsqueda BLAST GenBank™ y se identifican las coincidencias.

5 Extracción de RNA y análisis por RT-PCR

Se purifica el RNA de fibroblastos sinoviales y cutáneos en columna y reactivos RNeasy (Qiagen, Crawley, Ltd., UK). Se elimina el DNA genómico contaminante con DNashredder y DNasa (libre de RNasa) (Qiagen). Se sintetiza el cDNA de la primera hebra por transcripción inversa y amplificación PCR empleando los siguientes cebadores oligonucleótidos (las posiciones relativas en los cebadores específicos del MSF se representan en la figura 1): exón 6 de MSF: cebador delantero de 5'-CCAAACCACCAGTTGTAGATGAAGC-3' (SEQ ID NO: 15) y exón y de MSF cebador inverso de 5'-GCGGAAGTAGTCTTCTCTTTTCCATCAG-3' (SEQ ID NO: 16). Estos cebadores corresponden a los números de posiciones de nucleótidos 674-698 y 953-926, respectivamente, del GENBANK®; número de acceso: U70136 (MSF humano). Las condiciones de los ciclos térmicos son: 42°C durante 12 min, 95°C durante 10 min, después 43 ciclos entre 94°C x 20 s y 55-65°C x 30-90 s. La extensión final se realiza a 72°C durante 7 min (Perkin Elmer Biosystems).

Reactivos diversos

20 Se adquiere la fibronectina de suero humano a la empresa Sigma Chemical (F0895, St. Louis, MO) y se dializa frente a PS antes de utilizarse en el aparato de fricción. Los patrones de electroforesis de proteínas son de GibcoBRL (Grand Island, NY) y el patrón de escalera de DNA se adquiere a FMC Bioproducts (Rockland, ME).

25 Se purifica una tribonectina de líquido sinovial humano. La fracción final, la única que posee capacidad lubricante, contiene un producto de peso molecular aparente de 280 kDa. Esta fracción contiene además una menor cantidad de componentes de bajo peso molecular, que se eliminan en el paso final de purificación basado en anticuerpos. No se observan componentes de un peso molecular aparente superior a 280 kDa. El análisis LC-EM realizado en fragmentos trípticos de la banda escindida de 280 kDa indica la presencia de dos proteínas diferentes que, en el algoritmo de búsqueda BLAST, coinciden con el precursor de la fibronectina y con el MSF (GENBANK™, n° de acceso: U70136).
30 Las secuencias de MSF se identifican tanto en la tribonectina nativa como en la desglucosilada. Por consiguiente, el esquema de purificación termina en una columna anti-fibronectina que produce la eliminación de la fibronectina que es una impureza (ensayos realizados por HPLC analítica en columna C18 y análisis con gráfico de pureza). Además, las bandas más bajas de peso molecular aparente de 70 y 160 kDa del SDS-PAGE no están presentes en la preparación de tribonectina purificada eluida de la columna de anti-fibronectina. Se ensaya la tribonectina purificada en el aparato de fricción y se constata que ejerce una actividad lubricante de capa límite similar a la del líquido sinovial completo (tabla 6).
35

TABLA 5

Coefficientes de fricción de tribonectina humana y de fibronectina

lubricantet		(PS*)	
tribonectina	0,035	0,142	-0,106
fibronectina	0,161	0,136	+0,045
† PS = solución salina fisiológica			
* ensayado en una concentración de 250 µg/ml en PS			

En cambio, la fibronectina de suero purificada genera una fricción, lo cual indica que la capacidad lubricante del líquido sinovial lubricante se debe a la presencia de la tribonectina.

60 Con el análisis LC-EM de fragmentos trípticos se identifican porciones de los exones de 6 a 9 del MSF, ambos incluidos. Se encuentran los fragmentos codificados por las secuencias de ácido nucleico en el inicio y al final del exón. La tribonectina purificada reacciona con la PNA, lo cual indica la presencia de oligosacáridos $\beta(1-3)\text{Gal-GalNAC}$ a raíz de su purificación. Se observa además un aumento muy significativo de la movilidad electroforética después de la digestión con la Nana III y la O-glucosidasa DS, lo cual indica que la tribonectina purificada está muy glucosilada por los oligosacáridos unidos a través de O. El peso molecular aparente de la tribonectina desglucosilada purificada a partir de líquido sinovial es de 120 kDa.
65

ES 2 324 199 T3

El análisis por RT-PCR se completa empleando cebadores específicos de las secuencias de nucleótidos que codifican al extremo N-terminal del exón 6 del MSF. Las RT-PCR que emplean RNA de fibroblasto sinovial humano generan un producto de 280 bp, la distancia prevista entre los cebadores designados. Los experimentos similares sin transcriptasa inversa no generan este producto, lo cual indica que el RNA está libre de DNA genómico. El RNA purificado de fibroblastos cutáneos no produce producto alguno empleando los mismos cebadores.

Los datos aquí descritos indican que los exones del gen de MSF se empalman de modo alternativo para que expresen los polipéptidos lubricantes en las articulaciones sinoviales. Los fibroblastos sinoviales son una de las fuentes de tales tribonectinas en las articulaciones. Una tribonectina aislada de origen natural aquí descrita (PM ~ 280 kDa) y la SZP (PM ~ 345 kDa) son moléculas diferentes porque sus pesos moleculares aparentes difieren en 65 kDa. Es posible que el MSF sea un precursor de ambas moléculas en virtud de una expresión diferente de los exones del MSF en dos líneas celulares independientes, que pueblan la cavidad sinovial. La secuenciación repetitiva por LC-EM de materiales digeridos trópicos no permite identificar a ninguno de los exones que abarcan desde el exón 6 al exón 9 del MSF. Se encuentra que una tribonectina de origen natural purificada a partir de ternera bovina tiene el mismo peso molecular aparente que la tribonectina purificada a partir de fuentes humanas.

Los lubricantes de capa límite ejercen su efecto cambiando las características físico-químicas de la superficie. Las superficies de apoyo tienen que generar una repulsión mutua para lubricarse en el modo de límites. Los ejemplos típicos de lubricantes límites a temperatura ambiente son el grafito, el Teflón y el sulfuro de molibdeno. Las tribonectinas son lubricantes límites que pueden tener un carácter anfipático recubriendo superficies hidrófobas no biológicas, como son las del látex. Las glucosilaciones amplias son importantes para reticular con el entorno acuoso circundante. Cuando se eliminan los azúcares último y penúltimo de una tribonectina de origen natural purificada a partir de líquido sinovial, se elimina la capacidad lubricante. La posibilidad del hialuronato de fijarse sobre la SZP o sobre una tribonectina mediante la proteína expresada por el exón 9 confirma un mecanismo, según el cual el hialuronato desempeña un papel importante en el líquido sinovial. Un polímero hialuronato puede servir para fijar muchas moléculas de SZP o de tribonectina en un codo a codo de tipo tándem, de este modo reparten los esfuerzos de cizallamiento y estabilizan a las moléculas lubricantes.

La estructura primaria del precursor del MSF (productos genéticos de empalme alternativo, como las tribonectinas) es diferente de la del MG2, una glucoproteína rica en estaterina y en prolina, que se halla en la saliva y lubrica los apoyos dentales. Pero se ha ensayado el MG2 en el presente apoyo de látex: vidrio y se ha encontrado que lubrica con la misma eficacia de una tribonectina. Ambas glucoproteínas tienen en común el mismo resto $\beta(1-3)\text{GalGalNAc}$ unido a través de O. Estos datos indican que el resto $\beta(1-3)\text{GalGalNAc}$ unido a través de O es importante para la lubricación de la capa límite.

Los ensayos de digestión enzimática indican que la lubricación de la capa límite con el líquido sinovial es muy sensible a la tripsina. Estos ensayos demuestran que la eliminación de la capacidad lubricante con las fosfolipasas (contaminadas con cantidades muy pequeñas de proteasas de tipo tripsina) podría eliminarse con la co-incubación con inhibidores de proteasas, la leupeptina y la aprotinina. La lisina y la arginina constituyen el 13,5% y el 1,3%, respectivamente, del producto del exón 6, en el que se basa la observación de la sensibilidad a la tripsina, incluso cuando es la misma región de la tribonectina la que está ampliamente glucosilada y, por ello, podría impedir la proteólisis. Es probable que incluso los estados inflamatorios menos importantes, que dan lugar a la producción de tripsina y elastasa, tengan efectos nocivos en la capacidad lubricante de las tribonectinas de origen natural. Los apoyos cartilagosos no lubricados pueden sufrir un desgaste prematuro que puede ser el inicio de una osteoartritis. Estas condiciones patológicas se tratan con polipéptidos lubricantes, es decir, con las tribonectinas aquí descritas.

Ejemplo 2

Homología de una tribonectina con la SZP: Productos de la expresión del gen del MSF en fibroblastos sinoviales humanos y condrocitos articulares localizados en el cromosoma 1q25

Se evalúa la expresión de las tribonectinas en fibroblastos sinoviales primarios y en cartílago articular primario humanos. Se purifica el RNA de fibroblastos sinoviales y condrocitos articulares humanos cultivados "*in vitro*" a partir de explantes de tejido obtenidos de sujetos que no padecen enfermedad articular degenerativa. Se realiza una RT-PCR con múltiples pares de cebadores complementarios, que abarcan el exón 6 central del gen MSF que se expresa en la mucina y exones individuales tanto de los lados N-terminal como C-terminal del exón 6. Parece que los exones 2, 4 y 5 se expresan de modo variable en fibroblastos sinoviales y condrocitos articulares. Se expresa un polipéptido lubricante, una tribonectina, expresada por varios exones del gen del MSF, tanto en condrocitos como en fibroblastos sinoviales "*in vitro*". Tanto la tribonectina como la proteína de zona superficial (SZP), un proteoglicano afín, tienen en común una estructura primaria similar (pero no idéntica). Las tribonectinas y la SZP difieren también en las modificaciones post-traduccionales con oligosacáridos unidos a través de O; las tribonectinas contienen oligosacáridos unidos a través de O, mientras que las modificaciones post-traduccionales no se detectan en la SZP. Los oligosacáridos son predominantes en las tribonectinas; en la SZP se han encontrado cantidades limitadas de condroitina y de sulfato de queratina. La mayoría de exones del MSF participan en la expresión de la tribonectina, por lo cual persiste una fuerte homología con la vitronectina. La exploración de la biblioteca BAC genómica humana con un par de cebadores de cDNA, complementario con el exón 6, permite identificar dos clones. Ambos clones son complementarios del cromosoma 1q25 por una hibridación "*in situ*". Esto lugar está implicado en el síndrome de la camptodactilia-artropatía-pericarditis (CAP) según el mapeo genético. La CAP, una amplia artropatía articular, está asociada con una lubricación

ES 2 324 199 T3

de capa límite ineficaz, causada por el líquido sinovial. Por consiguiente, las tribonectinas aquí descritas son útiles para prevenir y/o tratar la CAP.

Los datos descritos a continuación se centran en las preguntas siguientes: 1) ¿cuáles de los 12 exones del MSF se expresan en los fibroblastos sinoviales y presumiblemente dan lugar a la secreción de tribonectina en la cavidad sinovial?; 2) ¿en qué difiere esta de la expresión del MSF en los condrocitos articulares que da lugar a la secreción de la SZP en la superficie del cartílago?; 3) ¿comparten las tribonectinas y la SZP la misma estructura primaria?; 4) ¿se modifican las tribonectinas después de la traducción con sulfato de condroitina? (esta es una característica de la SZP) y 5) ¿un producto aislado del exón 6 posee capacidad lubricante de la capa límite?

Se recoge líquido sinovial humano y se procesa del modo antes descrito y se purifican y aíslan las tribonectinas de tejido humano aplicando los métodos antes descritos. Se mide la actividad lubricante empleando un aparato de fricción estándar.

15 *Inmunodetección del sulfato de condroitina-6*

Se emplea el anticuerpo monoclonal M621C (ICN, Aurora, OH) para detectar la presencia del sulfato de condroitina-6 en la tribonectina purificada. Se aplican las técnicas de “Standard dot” y “Western blotting”.

20 *Digestión de una tribonectina con quimotripsina*

Se incubaba a 37°C durante 1 h la quimotripsina tratada con TLCK 0,1 BTEE U/ml de líquido sinovial humano. Inmediatamente después de la digestión se ensaya la actividad lubricante en el aparato de fricción. Se efectúan digestiones adicionales del mismo modo, pero también en presencia de 10 mg/ml de leupeptina y 5 mg/ml de aprotinina, en el caso de que el tratamiento con TLCK comercial inactivo de modo incompleto a la tripsina contaminante.

Aislamiento y cultivo de condrocitos articulares humanos

Además de aislar los fibroblastos sinoviales humanos del modo antes descrito, se aíslan también condrocitos. Se obtienen cartílagos de cóndilos femorales y de mesetas tibiales de articulaciones de rodilla humana durante la autopsia de donantes sin historial conocido de enfermedad articular o de donantes sanos de órganos procedentes de bancos de tejidos. Se cortan rebanadas de cartílago en piezas de 2-3 mm³, se lavan con DMEM (Whittaker MAB Bioproducts, Walkerville, MD) y se tratan durante 15 min con tripsina al 10% (v/v) en un baño de agua a 37°C. Se transfieren los tejidos a DMEM, 5% de FBS, penicilina-estreptomicina-fungizona y 2 mg/ml de colagenasa de *C. perfringens* de tipo IV (Sigma) y se digieren en un agitador giratorio durante una noche. Se lavan las células 3 veces con DMEM y se cultivan en DMEM que contiene un 5% de FBS.

Cultivo de monocitos humanos

Se adquieren los monocitos humanos CRL-9855 en suspensión de la American Type Culture Collection (Manassas, VA). Se concentran las células por centrifugación y después se vuelven a suspender en un matraz T75 hasta una concentración entre 0,2 y 1,0 x 10⁶/ml con medio Dulbecco modificado por Iscove suplementado con un 10% de suero fetal bovino, que no se ha inactivado por calor (Flow Laboratories), 0,03 mM timidina, 0,1 mM hipoxantina y 0,05 mM 2-mercaptoetanol. A medida que se multiplican los monocitos, el cultivo se expande para mantener el anterior intervalo de concentración.

Extracción de RNA y análisis por RT-PCR

Se purifica el RNA de condrocitos y de monocitos sinoviales y articulares humanos en mini-columnas y reactivos RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Se elimina el DNA genómico contaminante con el DNase shredder y la DNase (libre de RNase) (Qiagen). Se efectúa la síntesis del DNA complementario incubando a 25°C durante 10 min para extender los cebadores hexaméricos con la transcriptasa inversa y la síntesis del cDNA a 42°C durante 12 min y activación del Ampli Taq/desnaturalización del complejo RNA-cDNA a 95°C durante 10 min. Las condiciones de trabajo de los ciclos térmicos son las siguientes: 43 ciclos de 94°C, 20 s para la desnaturalización y 62°C, 60 s y una extensión final a 72°C durante 7 min (Perkin Elmer Biosystems, Foster City, CA). Se analizan los productos de la RT-PCR mediante electroforesis a través de gel de agarosa 3% NuSieve GTG (FMC, Rockland, ME) con tinción de bromuro de etidio. Se escinden las bandas que no corresponden a los tamaños de los productos esperados de la RT-PCR y se extraen de la agarosa (Qiagen).

60 *Exploración de la biblioteca de clones BAC*

Se explora una biblioteca BAC de *E. coli* que contiene el genoma humano (Research Genetics Inc., Huntsville, AL) con un par de cebadores de cDNA complementario del exón 6 del MSF mediante PCR. Cebador delantero 5'-CCAAACCACCAGTTGTAGATGAAGC-3' (SEQ ID NO: 15) y cebador inverso 5'-GCGGAAGTAGTCTTCTCTTTCCATCAG-3' (SEQ ID NO: 16) complementarios del par de bases de los números de posición 674-698 y 953-926 de la SEQ ID NO: 2. Los clones candidatos de *E. coli* se cultivan en agar LB que contiene 12,5 mg/ml de cloranfenicol a 37°C durante 16 h. Se purifica un constructo grande de DNA libre de DNA genómico por intercambio aniónico y digestión con exonucleasa (Large-construct kit, Qiagen, Valencia, CA).

ES 2 324 199 T3

Hibridación “*in situ*” del DNA del clon BAC y cromosomas

Se preparan los cromosomas de metafase a partir de cultivos de linfocitos de corta duración a partir de individuos normales con arreglo a métodos establecidos. Se marcan dos microgramos de DNA BAC de clones positivos empleando un kit de marcado BioNick (Life Technologies, MD) empleando la biotina-14-dATP en una reacción de traducción de doblado con arreglo a las instrucciones del fabricante. Después de la traducción de doblado se purifican los productos de reacción en una columna G-50. Se co-precipitan con etanol 100 ng de DNA marcado y 20 μ g de cot1 DNA. Se recupera el DNA por centrifugación y se disuelve en 20 μ l de solución de hibridación (Hybrisol vii, Oncor). La hibridación con sonda, el lavado, la microscopía y el mapeo de las sondas se realiza con arreglo a procedimientos estándar.

Digestión de tribonectinas con quimotripsina y ensayo de la capacidad lubricante

Se purifica una tribonectina del líquido sinovial humano recogido que tiene una capacidad lubricante normal, definida como $\Delta\mu < -0,06$ y posee un peso molecular aparente de 280 kDa. El término de la purificación con un paso antifibronectina se efectúa para eliminar las bandas contaminantes. En este paso se reduce también el ángulo de pureza a $<6^\circ$. Una tribonectina de una concentración de 250 mg/ml lubrica el apoyo de látex: vidrio con la misma eficacia que un líquido sinovial “*post-mortem*” de un sujeto sin enfermedad articular degenerativa (tabla 7).

TABLA 7

Coefficientes de fricción de una tribonectina humana y una fibronectina

lubricante	μ	$\mu(\text{PS}\ddagger)$	$\Delta\mu$	M
tribonectina	0,047 \pm 0,006	0,131 \pm 0,007	-0,084 \pm 0,004	3
HSF*	0,040 \pm 0,005	0,135 \pm 0,009	-0,095 \pm 0,011	3
quimotripsina§	0,130 \pm 0,041	0,107 \pm 0,024	+0,02 \pm 0,035	3
media \pm desviación estándar				
† ensayado en una concentración de 250 μ g/ml en PS				
‡ solución salina fisiológica				
* líquido sinovial humano “ <i>post-mortem</i> ”				
§ HSF digerido con quimotripsina tratada con TLCK en presencia de leupeptina y aprotinina				

Las digestiones enzimáticas con quimotripsina tratada con TLCK se realizan para determinar si el producto proteico del exón 6 aislado posee capacidad lubricante, dado que este dominio no contiene aminoácidos aromáticos. El producto digerido resultante aumenta la μ a 0,130 desde el valor de control de la solución salina, $\mu = 0,107$. Las digestiones similares en presencia de leupeptina/aprotinina continúan sin mostrar capacidad lubricante ($\Delta\mu = +0,02$).

Inmunodetección de sulfato de condroitina-6

Se emplea el anticuerpo monoclonal M621C para ensayar las tribonectinas transferidas a nitrocelulosa. No se observa reacción que corresponda a la banda de 280 kDa en el ensayo SDS-PAGE original. Esto indica que las tribonectinas no contienen el sulfato de la condroitina-6.

Análisis RT-PCR de RNA de fibroblasto sinovial y condrocito articular

La RT-PCR del mRNA del condrocito y fibroblasto sinovial se efectúa empleando los cebadores que se indican en la tabla 8. De las dos líneas celulares se observan productos de la RT-PCR del tamaño previsto y otros de tamaño inferior al previsto. El par de cebadores que abarca desde el extremo C-terminal del exón 6 hasta el extremo N-terminal del exón 12 se observa que tiene 769 bp, su longitud prevista, para las dos líneas celulares. De manera similar, el par de cebadores que abarca desde la misma posición del exón 6 hasta el exón 11 produce un producto esperado de RT-PCR de 654 bp. El par de cebadores de los exones 5 y 6 produce un producto de RT-PCR esperado, de 278 bp, para las dos líneas celulares.

ES 2 324 199 T3

TABLA 8

Pares de cebadores empleados para las RT-PCR con RNA de fibroblastos sinoviales y de condrocitos articulares humanos

5

cebadores inter-exón	pares de bases	(5' - 3') cebador delantero	pares de bases	(5' - 3') cebador trasero
1 - 6	64 - 85	TGTGTGCTGCTGTCTGTT TTTCG (SEQ ID NO:17)	819 - 796	GGGTCTGGGATTTATTG GTTTTGC (SEQ ID NO:23)
2 - 6	128 - 149	GGAGATGTGGGGAAGG GTATTC (SEQ ID NO:18)	819 - 796	GGGTCTGGGATTTATTG GTTTTGC (SEQ ID NO:24)
4 - 6	371 - 394	CACCATCTTCAAAGAAA GCACCTC (SEQ ID NO:19)	819 - 796	GGGTCTGGGATTTATTG GTTTTGC (SEQ ID NO:25)
5 - 6	542 - 566	CCTCCTCTTCCTCTTCTT CTTCAAC (SEQ ID NO:20)	819 - 796	GGGTCTGGGATTTATTG GTTTTGC (SEQ ID NO:26)
6 - 11	3427 - 448	GGCATTATCATCAATCC CATGC (SEQ ID NO:21)	4080 - 4057	CACATTTGGAAGTCCTC TCCACAG (SEQ ID NO:27)
6 - 12	3427 - 448	GGCATTATCATCAATCC CATGC (SEQ ID NO:22)	4195 - 4171	TTGCTCTTGCTGTTCTAC TAGGCAC (SEQ ID NO:28)

Los números de posición de los pares de bases corresponden al número de acceso U 70136 del GENBANK™.

10

15

20

25

TABLA 9

Pares de cebadores empleados para las RT-PCR con RNA de monocitos humanos

30

cebadores inter-exón	pares de bases	(5' - 3') cebador delantero	pares de bases	(5' - 3') cebador trasero
1-3	64 - 85	TGTGTGCTGCTGTCTGTT TTTCG (SEQ ID NO:29)	313 - 291	CATACTTCTTACATTGG GCGTCG (SEQ ID NO:32)
1-4	64 - 85	TGTGTGCTGCTGTCTGTT TTTCG (SEQ ID NO:30)	375 - 354	TGGTGGTGATGTGGGAT TATGC (SEQ ID NO:33)
2-5	128-149	GGAGATGTGGGGAAGG GTATTC (SEQ ID NO:31)	540 - 517	GGAGGAGGAGGACTCT TGATTTTC (SEQ ID NOL34)

Los números de posición de los pares de bases corresponden al número de acceso U 70136 del GENBANK™.

35

40

45

El par de cebadores que abarca desde el exón 1 hasta el exón 6 no consigue generar a título individual un producto del tamaño previsto de 756 bp. En su lugar se observan tres bandas de menor tamaño (350, 450 y 490 bp) en las dos líneas celulares. El par de cebadores que abarca desde exón 2 hasta el extremo N del exón 6 genera un producto de un tamaño de apenas 420 bp para las dos líneas celulares y cuya longitud es menor en 272 bp (692 bp - 420 bp) al tamaño previsto. El producto previsto de la RT-PCR de 692 bp apenas se observa en los condrocitos y menos todavía en los fibroblastos sinoviales. El par de cebadores del exón 2 al 6 genera un producto de 420 bp, que se escinde y se secuencian, revelando la ausencia del exón 6 y de la mayor parte del exón 4, excepto en los dos primeros aminoácidos del extremo N, el Ala¹⁰⁵ y el Leu¹⁰⁶ de la SEQ ID NO: 1. Por secuenciación de los productos de la RT-PCR de longitud 490 y 450 bp, generados con el par de cebadores del exón 1 al 6, se identifican las mismas deleciones. Por secuenciación del producto de menor tamaño, de 350 bp, generado por el par de cebadores del exón 1 al 6, se manifiestan las mismas deleciones además del exón 6, excepto para el Q²⁵ del extremo N. El par de cebadores que se extiende del exón 4 al 6 genera el producto RT-PCR esperado de 449 bp para las dos líneas celulares y un producto menor, de 340 bp. Por secuenciación de este producto de 340 bp se pone de manifiesto una deleción del exón 5, excepto para el E¹⁵⁶ del extremo N.

50

55

60

Se observa un empalme alternativo que provoca la generación de 4 isoformas de fenotipo diferentes del MSF tanto de los fibroblastos sinoviales como de los condrocitos (figura 2A y 2B).

65

El fenotipo V0 está formado por los 12 exones, el V1 carece del exón 5, el V2 carece del exón 5 y de la mayor parte del 4 y el V3 carece del exón 5 y de la mayor parte del 4 y del 2. Otra isoforma adicional es un polipéptido que está formado por aminoácidos codificados por los exones 1 y 6-12 del MSF (que carece del exón 5); esta es probablemente

la tribonectina de origen natural de tamaño más pequeño. Cada isoforma contiene el dominio lubricante del exón 6. El dominio codificado por el exón 6 desempeña un papel mediando en la fijación de la tribonectina sobre superficies hidrófobas, como son los cartílagos.

5

Análisis RT-PCR del RNA de monocitos

Las RT-PCR efectuadas con RNA de monocitos purificados empleando pares de cebadores (tabla 9) complementarios del exón 6 del MSF no generan producto alguno. Un par de cebadores, que se extiende del exón 1 al 3, genera un producto de PCR de 250 bp, su tamaño previsto. Otro par de cebadores que abarca del exón 1 al 4 genera un producto PCR que tiene un tamaño aproximadamente 130 bp menor que el previsto, que era de 312 bp. Otro par de cebadores adicional, que abarca del exón 2 al 5, no genera producto PCR alguno, lo cual indica que el exón 5 no se expresa. Estos datos parecen demostrar que los monocitos expresan a los exones de 1 a 3, de 1 a 4 de modo variable y no expresan al exón 6. La secuencia del cebador delantero del exón 1 es común a todos los anteriores trabajos de RT-PCR con monocitos, fibroblastos sinoviales y condrocitos.

15

Hibridación "in situ" del DNA del clon BAC y cromosomas

La exploración de la biblioteca de clones BAC del genoma humano con el par de cebadores de cDNA del anterior exón 6 del MSF da lugar a 2 clones candidatos. Los clones BAC 330 y 285 se hibridan con el cromosoma 1 en la región q25 (bandas DAPI). Para confirmar la localización en el cromosoma 1, se hibridan los cromosomas de metafase con sondas BAC a lo largo de la sonda centrómera específica del cromosoma 1 (VYSIS). Tanto las sondas centrómeras como las sondas BAC se hibridan con el cromosoma 1. La posterior generación de bandas G de los mismos marcos confirman la localización q25.

25

Se empalman alternativamente los fibroblastos sinoviales cultivados "in vitro" con los exones 2, 4 ó 5 del MSF o con una combinación de los mismos. En el caso del exón 4, la expresión se interrumpe después de los dos primeros codones del exón (Ala¹⁰⁵ y Leu¹⁰⁶). Existen también las isoformas sin exón 5, excepto para el resto E¹⁵⁶ y una sin exón 2, excepto para el Q²⁵. Se forman tres productos de RT-PCR con el par de cebadores del exón 1 al 6, que parecen corresponder a los fenotipos V1 - 3. Sin embargo, se observa el producto esperado de la RT-PCR, de 692 bp, para el par de cebadores de los exones 2-6, lo cual indica que también existe una isoforma V0, que contiene cada uno de estos exones. Parece que 4 ó 5 isoformas de fenotipos diferentes de tribonectinas se expresan en los fibroblastos sinoviales. Los condrocitos comparten esta expresión de fenotipos. Un resumen de los sitios de empalme alternativo para las dos líneas celulares se ilustra en la figura 3. La intensidad relativamente mayor de los productos de los pares de cebadores de los exones 2-6 (692 bp) y de los exones 4-6 (449 bp) en el caso de los condrocitos sugiere que estas células potencialmente podrían elegir un isotipo de peso molecular aparente más elevado.

35

El exón 6 del MSF ocupa una posición entre una región de fijación análoga de sulfato de heparina (exón 4 del MSF) y las unidades repetitivas de tipo hemopexina (exones 8, 9 del MSF). La separación de estos dominios favorece una mayor interacción con el glucosaminoglicano, que sería diferente de la vitronectina, en la que estos dominios se piensa que compiten por fijarse sobre el glucosaminoglicano debido a su proximidad. Tal vez la capacidad de fijarse sobre el glucosaminoglicano por uno o por ambos extremos del dominio lubricante sirve para estabilizar la actividad lubricante en un cartílago cubierto con "lamina splendens". Como alternativa, existe una interacción entre una tribonectina y el colágeno de tipo II, dicha interacción sirve para fijar la tribonectina directamente sobre el cartílago.

45

Los lubricantes de capa límite, como son las tribonectinas, se fijan sobre las superficies de apoyo y generan una repulsión mutua con el fin de lubricar en modo de límite. Este atributo bifuncional aparece como comportamiento anfipático recubriendo superficies hidrófobas no biológicas, como el látex. Las glucosilaciones amplias interaccionan con el entorno acuoso circundante. Cuando se eliminan los azúcares último y penúltimo, se elimina la capacidad lubricante. La expresión del exón 6 del MSF se necesaria para la actividad lubricante; una actividad lubricante óptima probablemente requiere la expresión de un dominio expresado por lo menos por un exón adicional del MSF, p.ej. el exón 1. El ensayo de digestión con quimotripsina se realiza para intentar escindir el producto del exón 6 y estudiar la capacidad lubricante del material digerido, suponiendo que los productos liberados por el exón no interferirán en la capacidad lubricante. El material digerido no lubrica bien, a pesar de la replicación en presencia de leupeptina y aprotinina, lo cual sugiere que pueden requerirse otros productos de exón. Puede ser necesario, por ejemplo, el exón 3, que tiene un número de restos cisteína que son importantes para la agregación de polímeros de mucina. La capacidad de una tribonectina de recubrir la superficie probablemente depende del carácter hidrófobo y de la capacidad de los polímeros individuales de tribonectina de agregarse.

50

Los estudios inmunohistoquímicos no han conseguido detectar el sulfato de la condroitina-6, lo cual indica que no está presente o que está impedida estéricamente detrás de las glucosilaciones unidades a través de O, que ocupan posiciones adyacentes al D²²⁰EASG²²⁴, al que estaría unido el sulfato de condroitina. La presencia de sulfato de condroitina y de queratina en la SZP se ha confirmado por marcado con S³⁵ y liberación después de la digestión con queratinasa y condroitina-liasa ABC. Sin embargo, no se observa un cambio significativo en el peso molecular aparente de la SZP después de esta digestión, lo cual indica que solamente es probable un pequeño grado de sustitución. Es posible que el glucosaminoglicano esté conjugado con una tribonectina.

65

ES 2 324 199 T3

Las tribonectinas y la SZP son moléculas similares que comparten los exones 1, 3 y de 6 a 12 del MSF y los exones de empalme alternativo de 2 a 5. A pesar de su estructura primaria similar, se han detectado diferencias en las modificaciones post-traduccionales entre las dos proteínas. La presencia del resto lubricante $\beta(1-3)\text{GalGalNAc}$ unido a través de O no se ha detectado en el caso de la SZP, pero sí en las tribonectinas aquí descritas. La diferencia de pesos moleculares aparentes entre tribonectinas y SZP se confirma con el análisis “Western blotting” con anticuerpos desarrollados contra la SZP, que se purifica a partir de condrocitos de zona superficial.

Síndrome de camptodactilia-artropatía-pericarditis (CAP)

Los ensayos de hibridación “*in situ*” indican que las secuencias de DNA que codifican a las tribonectinas residen en el cromosoma 1q25, ya que las dos sondas de clones BAC se han localizado independientemente en la misma ubicación. La investigación booleana de la “herencia mendeliana ”on-line“ en el hombre” (OMIM) revela una enfermedad artrítica que se ha mapeado genéticamente en el mismo lugar. El síndrome de la camptodactilia-artropatía-pericarditis (CAP) se caracteriza por el inicio juvenil de la artropatía no inflamatoria de articulaciones grandes y las contracturas de flexión no traumática congénitas de una o más articulaciones interfalángicas (camptodactilia). El aspecto histopatológico de los tejidos sinoviales y tenosinoviales de pacientes que padecen esta enfermedad congénita autosómica es el de la hiperplasia sinoviocítica de tipo B y de la fibrosis de estadio terminal. El síndrome CAP es un resultado directo de la lubricación ineficaz que se manifiesta en un desgaste prematura de la articulación. Algunos pacientes de CAP también desarrollan pericarditis. Las tribonectinas aisladas, de origen natural o sintéticas, son útiles para tratar el CAP y para lubricar los tejidos del pericardio. El CAP se diagnostica detectando una mutación del gen MSF.

Otras formas de ejecución se definen en las siguientes reivindicaciones.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 324 199 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una tribonectina que contiene una secuencia de aminoácidos que abarca por lo menos una, pero menos de 76 subunidades, en la que
- (a) cada subunidad consta por lo menos de 7 aminoácidos;
 - (b) la secuencia de aminoácidos de dicha subunidad es idéntica por lo menos en un 50% con la SEQ ID NO: 3, en la que un aminoácido no idéntico es una sustitución conservadora de aminoácido;
 - (c) dicha tribonectina consta por lo menos de un resto $\beta(1-3)\text{Gal-GalNAc}$; y
 - (d) por lo menos un 10% en peso de dicha tribonectina está formado por oligosacáridos unidos a través de O.
- 15 2. La tribonectina de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos de dicha subunidad es la SEQ ID NO: 3.
3. La tribonectina de la reivindicación 1, dicha tribonectina contiene además una o más unidades repetitivas de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4.
- 20 4. La tribonectina de la reivindicación 1, dicha tribonectina contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 95% con los aminoácidos 200-1140, inclusive, de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.
- 25 5. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene los aminoácidos 1-24 y 200-1404 de la SEQ ID NO: 1, dicha tribonectina carece de los aminoácidos 25-199 de la SEQ ID NO: 1.
6. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene los aminoácidos 1-156 y 200-1404 de la SEQ ID NO: 1, dicha tribonectina carece de los aminoácidos 157-199 de la SEQ ID NO: 1.
- 30 7. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene los aminoácidos 1-106 de la SEQ ID NO: 1 y 200-1404 de la SEQ ID NO: 1, dicha tribonectina carece de los aminoácidos 107-199 de la SEQ ID NO: 1.
- 35 8. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene los aminoácidos 1-25 de la SEQ ID NO: 1, 67-106 de SEQ ID NO: 1 y 200-1404 de la SEQ ID NO: 1, dicha tribonectina carece de los aminoácidos 26-66 de la SEQ ID NO: 1.
9. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina se **caracteriza** porque reduce el coeficiente de fricción en las superficies de apoyo.
- 40 10. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina se **caracteriza** porque reduce el coeficiente de fricción entre las superficies de apoyo "*in vitro*".
11. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina se **caracteriza** porque reduce el coeficiente de fricción entre superficies de apoyo "*in vivo*".
- 45 12. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina no aumenta sustancialmente la viscosidad de la solución a la que se añade.
13. La tribonectina de la reivindicación 1, en la que por lo menos el 20% de dicha tribonectina está glucosilado con restos oligosacárido unidos a través de O.
- 50 14. La tribonectina de la reivindicación 1, en la que por lo menos un 40% de dicha tribonectina está glucosilado con restos oligosacárido unidos a través de O.
- 55 15. La tribonectina de la reivindicación 1, en la que el peso molecular de dicha tribonectina se sitúa en el intervalo de 220-280 kDa.
16. La tribonectina de la reivindicación 1, dicha tribonectina contiene un fragmento de factor de estimulación de megacariocitos.
- 60 17. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 98% con la secuencia de los restos 200-1140, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.
18. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene la secuencia de aminoácidos de los restos 200-1140, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.
- 65 19. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 95% con la secuencia de los restos 200-1167, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

ES 2 324 199 T3

20. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene la secuencia de aminoácidos de restos 200-1167, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

5 21. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 95% con la secuencia de los restos 200-1212, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

22. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene la secuencia de aminoácidos de restos 200-1212, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

10 23. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 95% con la secuencia de los restos 200-1263, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

15 24. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina contiene la secuencia de aminoácidos de restos 200-1263, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

25 25. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina carece de la secuencia de aminoácidos de restos 1-24, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

20 26. La tribonectina de la reivindicación 4, dicha tribonectina carece de la secuencia de aminoácidos de restos 67-104, inclusive, de la SEQ ID NO: 1.

27. El uso de la tribonectina de la reivindicación 1 ó 4 para la fabricación de un medicamento destinado a lubricar una articulación de un mamífero.

25 28. El uso de la reivindicación 27, en el que dicha articulación es una articulación de un ser humano.

29. El uso de la reivindicación 27, en el que dicha articulación es una articulación de un perro.

30 30. El uso de la reivindicación 27, en el que dicha articulación es una articulación de un caballo.

31. El uso de la reivindicación 27, en el que dicho medicamento se administra por vía intraarticular.

32. El uso de una tribonectina de la reivindicación 1 ó 4 para la fabricación de un medicamento destinado a prevenir o a tratar el síndrome de la camptodactilia-artropatía-pericarditis en un mamífero.

35 33. Una composición biocompatible que contiene la tribonectina de la reivindicación 1 ó 4, dicha composición se presenta en una forma apropiada para inhibir la formación de adhesiones de tejidos.

40 34. La composición de la reivindicación 33, dicha composición se presenta en forma de membrana, espuma, gel o fibra.

35. El uso de una tribonectina de la reivindicación 1 ó 4 para la fabricación de un medicamento destinado a inhibir la formación de adhesiones entre una primera superficie y una segunda superficie de un mamífero.

45 36. El uso de la reivindicación 35, en el que dicha primera superficie y dicha segunda superficie son, ambas, tejidos lesionados de dicho mamífero.

37. El uso de la reivindicación 35, en el que dicha primera superficie o dicha segunda superficie es un dispositivo artificial.

50 38. El uso de la reivindicación 37, en el que dicho dispositivo artificial es un implante ortopédico.

39. El uso de la reivindicación 35, en el que dicho medicamento se presenta en forma de una membrana, una espuma, un gel o una fibra.

55 40. El uso de la reivindicación 35, en el que dicha lesión se debe a una incisión quirúrgica.

41. El uso de la reivindicación 35, en el que dicha lesión se debe a un trauma.

60 42. El uso de la reivindicación 35, en el que dicha primera superficie o dicha segunda superficie es el tejido del pericardio.

43. La tribonectina de la reivindicación 1 ó 4, dicha tribonectina contiene además una tapa NeuAc.

65 44. La tribonectina de la reivindicación 1 ó 4, dicha tribonectina contiene un polipéptido recombinante.

45. La tribonectina de la reivindicación 1 ó 4, dicha tribonectina contiene un polipéptido sintetizado químicamente.



Fig. 1

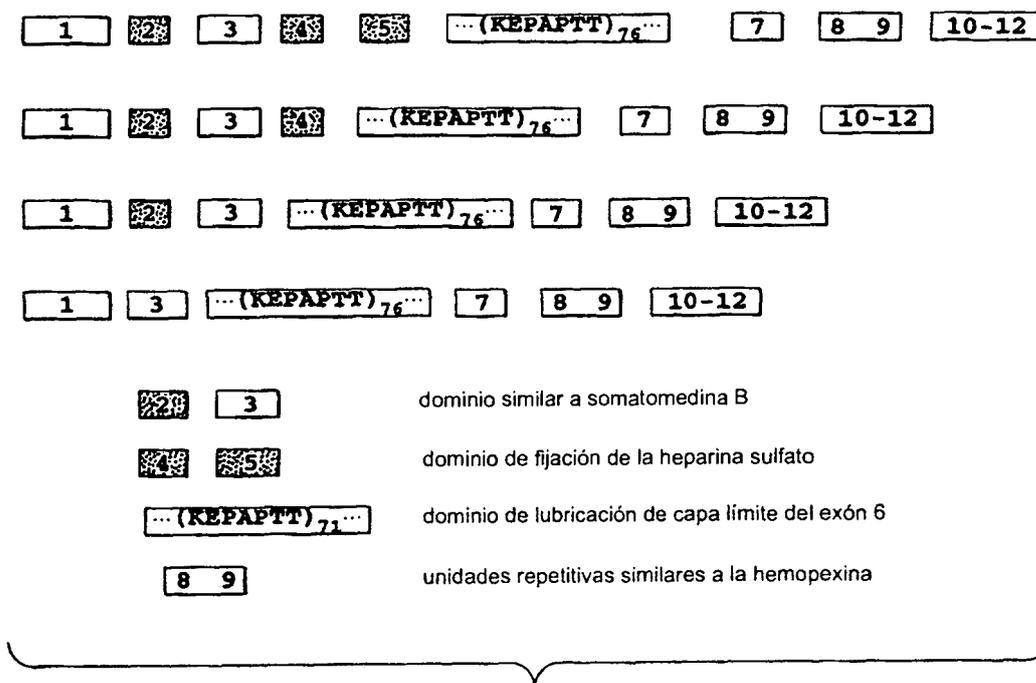


Fig.2A

ISOFORMA	condrocitos articulares			fibroblastos sinoviales			PESO MOLECULAR PREVISTO
	EXON 2	EXON 4	EXON 5	EXON 2	EXON 4	EXON 5	
V0	+	+	+	+	+	+	151.096 kDa
V1	+	+	-	+	+	-	146.327 kDa
V2	+	-	-	+	-	-	140.894 kDa
V3	-	-	-	-	-	-	135.207 kDa

Fig.2B

