



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 767**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00909754 .4**

96 Fecha de presentación : **21.03.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1164190**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **19.12.2001**

54

Título: **Gen de artritis reumatoide y método para diagnosticar artritis reumatoide.**

30

Prioridad: **20.03.1999 JP 11-116933**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.11.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.11.2011

73

Titular/es: **Shunichi Shiozawa**
11-6, Takenodai 2-chome
Nishiku, Kobe-shi, Hyogo 651-2274, JP

72

Inventor/es: **Shiozawa, Shunichi y**
Komai, Koichiro

74

Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 367 767 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

Gen de artritis reumatoide y método para diagnosticar artritis reumatoide

5 Campo técnico

La presente invención se refiere al gen de enfermedad de la artritis reumatoide presente en cromosoma humano X y a un método *in vitro* para diagnosticar artritis reumatoide que detecta la presencia del gen de enfermedad o su producto de expresión.

10

Antecedentes técnicos

Aunque se han aclarado aspectos, en particular el proceso patológico, de la artritis y artritis mutilante que causan artritis reumatoide, a través de varias investigaciones, debido a que la mayoría de las enfermedades autoinmunes asociadas con artritis reumatoide se desarrollan o empeoran en la enfermedad solo cuando coinciden varios factores causantes, la interacción misma de múltiples factores se debe aclarar para entender la enfermedad y para desarrollar métodos apropiados de tratamiento.

15

El número de pacientes con artritis reumatoide en el mundo es del 1% o menos (N. Engl. J. Med. 322: 1277-1289, 1990), pero entre hermanos de pacientes, más del 8% desarrollan la enfermedad (Cell. 85: 311-318, 1996), lo que lleva a la noción de que debe estar implicado algún factor genético. Sin embargo, los procedimientos de genética molecular y procesos de ingeniería genética usados convencionalmente para descubrir el factor genético de enfermedades pueden no ser eficaces para enfermedades autoinmunes. Tal problema se produce por el hecho de que las enfermedades autoinmunes no se desarrollan a través de mecanismos tan sencillos como los del cáncer, en donde se produce el crecimiento anormal de un gen mutado. Además, aunque los procedimientos genéticos clásicos que buscan la base genética de una enfermedad revelaron que las enfermedades autoinmunes están producidas por múltiples factores genéticos, no ha tenido éxito en el descubrimiento de sus entrañas o su cuerpo. Por tanto, no se ha sabido casi nada sobre la entidad, o incluso el locus, de los genes asociados con artritis reumatoide.

20

25

Mediante la realización de análisis de ligamiento usando marcadores de microsatélite en pacientes de artritis reumatoide y sus familiares, los presentes inventores identificaron tres locus de genes de artritis reumatoide (International Immunology 10(12): 1891-1895, 1998; Journal of Clinical Rheumatology 4 (3): 156-158, 1998) y presentaron una solicitud de patente para los siguientes genes de enfermedad (PCT/JP98/01665).

30

35

(1) Un gen de enfermedad de artritis reumatoide localizado en la región a \pm 1 centimorgan de una secuencia de ADN en el cromosoma humano 1 con el que hibrida(n) el/los marcador(es) de microsatélite D1S214 y/o D1S253.

(2) Un gen de enfermedad de artritis reumatoide localizado en la región a \pm 1 centimorgan de una secuencia de ADN en el cromosoma humano 8 con el que hibrida el marcador de microsatélite D8S556.

40

(3) Un gen de enfermedad de artritis reumatoide localizado en la región a \pm 1 centimorgan de una secuencia de ADN en el cromosoma humano X con el que hibrida(n) el/los marcador(es) de microsatélite DXS1001, DXS1047, DXS1205, DXS1227 y/o DXS1232.

45

Los presentes inventores identificaron, como resultado de estudios adicionales en cada uno de los genes de artritis reumatoide especificados en la solicitud previa descrita anteriormente, el gen específico respecto al gen de enfermedad (3) descrito anteriormente y determinaron su estructura molecular.

Divulgación de la invención

50

Para resolver los problemas descritos anteriormente, la presente invención proporciona un fragmento de ADN como se reivindica en la reivindicación 1 de un gen de enfermedad para artritis reumatoide que es un mutante del protooncogén Db1, en donde la secuencia normal de nucleótidos 2679 a 2952 del protooncogén Db1 se muestra en SEQ ID NO: 1, y en donde en dicho mutante la región desde el nucleótido 19 al 274 en SEQ ID NO: 1 se sustituye con los nucleótidos de la secuencia de SEQ ID NO: 2.

55

La presente invención también proporciona un ADN que consiste en una parte del ADN de la reivindicación 1 en donde dicha parte comprende la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3 o un complemento de la misma y que se puede usar como una sonda para el diagnóstico genético; una proteína que consiste en SEQ ID NO: 2; un péptido que consiste en una parte de la proteína de SEQ ID NO: 2 donde dicho péptido comprende 5 residuos de aminoácidos o más de dicha secuencia y que se puede usar como un antígeno para preparar un anticuerpo; y un anticuerpo contra tal péptido.

60

Además, la presente invención proporciona un método *in vitro* para el diagnóstico de artritis reumatoide que comprende la detección del ARNm complementario al ADN de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la proteína de la reivindicación 3 o el péptido de la reivindicación 4 en una muestra biológica.

65

Mejores maneras para llevar a cabo la invención

De aquí en adelante, se describirán formas de realización de la presente invención que tienen las características descritas anteriormente.

El gen de enfermedad de la artritis reumatoide divulgado aquí (de aquí en adelante denominado "gen de enfermedad AR") es una secuencia variante del protooncogén conocido gen Db1 (EMBO J. 7(8): 2463-5473, 1998; No. de acceso de GenBank X12556) que se aísla del cromosoma humano X por el método descrito en los ejemplos mencionados posteriormente. En otras palabras, este gen Db1 transcribe el ARNm que codifica el ADNc para el que la secuencia de las bases 2679 a 2952 se representa en SEQ ID NO: 1, mientras que en el ADNc del gen variante, la secuencia del lado 3' de la base 241 en SEQ ID NO: 1 está unida al lado posterior a la base 18 para inducir un cambio en el marco de lectura en la traducción de aminoácidos, lo que produce que las bases 19 a 274 en SEQ ID NO: 1 se sustituyan por la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2. La figura 1 muestra la secuencia de bases de las bases 2679 a 2952 (las misma que en SEQ ID NO: 1) del ADNc del gen Db1 en un gen normal, la secuencia de bases correspondiente del gen de enfermedad AR, y las secuencias de aminoácidos respectivas (notación de una letra) codificadas por estas secuencias.

Además, en general, con frecuencia se encuentra polimorfismo de diferencias individuales para genes humanos.

Los ADNc divulgados en el presente documento se pueden aislar fácilmente, por ejemplo, mediante el método descrito en el ejemplo posteriormente mencionado. Además, los ADNc se pueden clonar de una genoteca de ADNc por un método conocido (Mol. Cell. Biol. 2:161-170, 1982; J. Gene 25: 263-269, 1983; Gene 150: 243-250, 1994) usando ARN poli(A)+ extraído de células de un paciente con artritis reumatoide. Tal clonación se puede realizar mediante, por ejemplo, síntesis de oligonucleótidos basados en la información de secuencia proporcionada en el presente documento y cribado mediante hibridación en colonia o placa por un método conocido usando los oligonucleótidos resultante como sondas. Además, se pueden sintetizar oligonucleótidos que hibriden con ambos extremos del fragmento de ADNc diana, y usándolos como cebadores, se puede producir el ADNc por el método de RT-PCR a partir de los ARNm aislados de células de un paciente con artritis reumatoide.

El fragmento de ADN de la presente invención comprende una parte del ADNc anteriormente mencionado y contiene la secuencia de bases mostrada en SEQ ID NO: 3. En otras palabras, SEQ ID NO: 3 es la secuencia subrayada en la figura 1 y es una región característica, que no está presente en el gen Db1 normal o sus ADNc. Además, el fragmento de ADN incluye las hebras tanto sentido como antisentido. Estos fragmentos de ADN se pueden usar como sondas para el diagnóstico genético.

La proteína de la presente invención es una parte de un producto de expresión resultante de los genes de enfermedad AR divulgados en el presente documento y tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. Esta proteína se puede obtener por un método de síntesis química de péptidos basado en la secuencia de aminoácidos proporcionada por la presente solicitud, o mediante técnicas de ADN recombinante usando los ADNc divulgados en el presente documento. Por ejemplo, cuando se usa la técnica del ADN recombinante para obtener las proteínas, se puede preparar el ARN mediante transcripción *in vitro* usando un vector que contiene el ADNc divulgado en el presente documento; usando este ARN como molde, las proteínas se pueden obtener mediante traducción *in vitro*. Además, la región codificante del ADNc se puede recombinar en un vector de expresión apropiado por cualquier método conocido y el vector recombinante obtenido se puede usar para transformar células de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, levadura, animales o similares, por lo que sería posible la expresión de la proteína en masa mediante el uso de estas células recombinantes.

Cuando se usa traducción *in vitro* para producir la proteína de la presente invención, parte de la región codificante del ADNc del divulgado en el presente documento se puede recombinar en un vector con el promotor de la ARN polimerasa e introducir en el sistema de traducción *in vitro* que contiene la ARN polimerasa correspondiente al promotor, tal como lisado de eritrocitos reticulares de conejo o extractos de embriones de trigo. Se pueden enumerar T7, T3 y SP6 como ejemplos de promotores de ARN polimerasas. Los ejemplos de vectores que contienen cualquiera de estos promotores de ARN polimerasas son pKA1, pCDM8, pT3/T7 18, pT3/T7 19 y pBluescript II.

Además, cuando la proteína de la presente invención se expresa usando microorganismos tales como *E. coli*, se puede preparar un vector de expresión recombinante incorporando parte de la región codificante del ADNc divulgado aquí en un vector de expresión que contiene un origen de replicación replicable en microorganismos, promotor, sitio de unión a ribosomas, sitio de clonación de ADNc, terminador y similares, que se usa después para transformar una célula huésped e incubando la célula huésped. En tales casos, mediante la adición de codones de iniciación y terminación antes y después de una región codificante arbitraria, se pueden obtener fragmentos de proteína que contengan la región arbitraria. De forma alternativa, la proteína se puede obtener como una proteína de fusión con otra proteína. La proteína diana también se puede aislar mediante corte de la proteína de fusión usando una proteasa apropiada. Ejemplos del vector de expresión para *E. coli* son el sistema pUC, pBluescript II, sistema de expresión pET y sistema de expresión pGEX.

5 Cuando se expresa la proteína de la presente invención en células eucariotas, parte de la región codificante del ADNc se puede incorporar en un vector de expresión para células eucariotas que contiene un promotor, una región de ajuste, un sitio de adición de poli(A) y similares, que se puede introducir en células eucariotas. Tales vectores de expresión pueden ser pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, vector EBV, pRS y pYES2. En general, se usan como células eucariotas células de mamífero en cultivo tales como células de riñón de mono COS7 o células de ovario de hámster chino CHO, levadura con reproducción por gemación, levadura con reproducción por fisión, células de gusanos de seda y ovocitos de *Xenopus laevis*, pero en la presente invención, no están limitadas a estos ejemplos. Para introducir el vector de expresión en células eucariotas, se puede usar cualquier método conocido tal como electroporación, método del fosfato de calcio, método del liposoma y método de DEAE dextrano.

10 Después de expresar las proteínas en células procariontas o eucariotas por los métodos descritos anteriormente, la proteína de interés se puede separar del cultivo y purificar mediante el uso de combinaciones de métodos de separación/purificación conocidos. Ejemplos son, tratamiento con agentes degenerantes tales como urea o tensioactivos, ultrasonificación, digestión enzimática, precipitación con sal o solvente, diálisis, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, método de isoelectroenfoque, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de fase inversa y similares.

15 El péptido de la presente invención es un fragmento peptídico, que contiene 5 residuos de aminoácidos o más de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2. Tal péptido se puede usar como un antígeno para preparar un anticuerpo.

20 El anticuerpo de la presente invención se puede obtener como un anticuerpo policlonal o monoclonal por cualquier método conocido usando el péptido como antígeno.

25 El método para diagnosticar artritis reumatoide de la presente invención se puede realizar, por ejemplo, mediante la detección *in vitro* de la presencia de los ARNm complementarios a los ADN de las reivindicaciones 1 o 2 en una muestra biológica (líquido corporal, célula) obtenida de un sujeto. Tales ARNm se pueden detectar, por ejemplo, mediante amplificación por RT-PCR del ARNm que contiene la región característica (por ejemplo, la región subrayada en la figura 1), o mediante análisis de hibridación *in vitro* o *in situ* usando cualquier región de la secuencia característica del ARNm para el gen de enfermedad AR como sonda.

30 Además, el método para diagnosticar artritis reumatoide de la presente invención también se puede realizar mediante detección *in vitro* de la presencia de la proteína de la reivindicación 3 expresada a partir del gen de enfermedad AR en una muestra biológica de un sujeto. Tal detección se puede realizar, por ejemplo, mediante inmunoensayo enzimático o radioinmunoensayo usando el anticuerpo de la presente invención.

35 Además, la presencia de tal expresión génica o proteína se puede detectar mediante el uso de cualquier kit de diagnóstico; por ejemplo, se puede usar un kit de análisis por hibridación tal como un chip de ADN y similar o un kit de inmunoensayo tal como un kit de ELISA.

40 El defecto de Db1 se puede complementar, por ejemplo, mediante proteína o compuestos de bajo peso molecular.

Ejemplos

45 De aquí en adelante, se describirá en mayor detalle el gen de enfermedad AR divulgado en el presente documento a través de los siguientes ejemplos; sin embargo, la presente invención no está limitada a estos ejemplos.

<Ejemplo 1> Identificación del gen de enfermedad AR

50 Para el análisis genético mediante el método de análisis de parejas de hermanos afectados usando marcador de microsatélite, se prepararon los ADN de sangre periférica recogida de una familia de dos pacientes de artritis reumatoide y uno normal, mediante el método del tiocianato de guanidina (The Japan Society of Blood Transfusion Report 40(2), 413). Además, se seleccionaron 11 marcadores (DXS1047, DXS8072, DXS8041, DXS8094, DXS1192, DXS1205, DXS1227, DXS8106, DX8043, DX8028 y DXS1200) (Nature 360, 1996) como marcadores de microsatélite con una heterocigosidad mayor de alrededor de 0,7, del intervalo de los locus genéticos candidatos previamente divulgados por los presentes inventores (International Immunology 10 (12): 1891-1895; Journal of Clinical Rheumatology 4 (3): 156-158, 1998), y se sintetizaron cebadores marcados con fluorescencia que pudieran amplificar cada locus en Perkin Elmer Inc. Las secuencias de los cebadores se divulgan en la bibliografía anterior y son conocidas. Cada región marcadora se aisló por PCR en las siguientes condiciones. La solución de reacción se preparó mezclando 5 pmoles de cebador, aproximadamente 0,5 µg de ADN molde, 1,5 µg de tampón II (Perkin Elmer Inc.), 1,0 µl de mezcla de dNTP 2 mM (Perkin Elmer Inc.), 0,12 µl de enzima Ampli Taq Gold (Perkin Elmer Inc.) y 0,9 µl de MgCl₂ 25 mM (Perkin Elmer Inc.) y añadiendo agua esterilizada para obtener un volumen total de 15 µl. La reacción se realizó en un ciclador térmico (PTC-200) de MJ Research Inc. Primero, se realizaron un ciclo de activación de enzima a 95°C durante 12 minutos, 10 ciclos de desnaturalización por calor a 94°C durante un minuto, hibridación del cebador a 47°C durante un minuto y extensión a 72°C durante 2 minutos, después de lo cual se realizaron 20 ciclos de desnaturalización por calor a 89°C durante un minuto, hibridación del cebador a 47°C durante

un minuto y extensión a 72°C durante 2 minutos. Cada uno de los fragmentos resultantes de ADN se analizó en un secuenciador de ADN (Perkin Elmer Inc., Tipo AB1377) sometidos a electroforesis con marcadores de tamaño para Genescan (Perkin Elmer Inc.) de la especificación del fabricante y se realizó el análisis de ADN usando las aplicaciones informáticas adjuntas, Genescan y Genotyper. Los datos obtenidos se analizaron en sistema Unix usando la aplicación informática Mapmaker Sibs (Am J Hum Genet, 57, 439-454, 1995), que está disponible al público, para análisis de ligamiento genético, y se calculó el valor máximo de Lod por análisis de punto único.

Como resultado, se determinó que el valor Lod máximo era 2,03 para DXS984, que está situado en la región a 1 centimorgan de DXS1232, uno de los locus genéticos candidato divulgado por los presentes inventores (International Immunology 10(12): 1891-1895; Journal of Clinical Rheumatology 4(3): 156-158, 1998), que muestra una correlación significativa. Mediante búsqueda en bases de datos internacionales en internet (Genemap98, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap98/>) se determinó que la localización física de DXS984 era 4259 cR10000 (F) en el mapa híbrido de radiación G3, y por tanto se demostró que el protooncogén Db1 estaba situado lo más cerca a DXS984.

<Ejemplo 2> Análisis del gen Db1 anormal

Para comparar los ADNc entre genes Db1, se sintetizó ADNc mediante transcripción inversa, usando un kit de RT-PCR (Perkin Elmer Inc.) a partir del ARN total obtenido de sangre periférica de pacientes de la enfermedad AR recogida usando el agente Isogen (Nippongene Co. Ltd.), y se disolvió en 20 µl de agua esterilizada. Además, se prepararon cebadores (SEQ ID NO: 4 y 5) usando la secuencia de ADNc de Db1 (No. de acceso de GenBank X12556) (Amersham Pharmacia), y se aisló parte de la secuencia del ADNc de Db1 mediante el método de PCR. La composición de la solución de reacción para la PCR fue: 10 pmoles de cada uno del cebador directo (SEQ ID NO: 4) y cebador inverso (SEQ ID NO: 5), aproximadamente 0,1 µg de ADN molde, 2,5 µl de tampón LA-PCR (Takara Shuzo Co. Ltd.), 4,0 µl de mezcla de dNTP 2,5 mM, 0,25 µl de enzima LA Taq (Takara Shuzo Co. Ltd.) y 2,5 µl de MgCl₂ 25 mM mezclado, después de lo cual se añadió agua esterilizada para obtener un volumen total de 25 µl. La reacción se realizó en un ciclador térmico (PTC-200) de MJ Research repitiendo 35 ciclos del proceso de desnaturalización por calor a 94°C durante 30 segundos, hibridación del cebador a 52°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 2 minutos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis de métodos convencionales, en solución tampón TAE usando un gel de agarosa L al 1% (Nippongene Co. Ltd.) y marcadores de peso molecular de ADN (escalera de 200 pb) de Promega Co., para confirmar las bandas amplificadas. Como resultado, se determinó que el tamaño del ADN normal era 660 pb mientras que el tamaño de la cadena de ADN de algunos pacientes era distintivamente más corta (aproximadamente 440 pb).

A continuación, después de cortar cada banda respectiva, los geles se fundieron a 65°C durante 10 minutos, y los ADN se purificaron mediante métodos convencionales de extracción con fenol y métodos de precipitación con etanol. Después, usando 100 ng de del ADN resultante como molde, se realizaron reacción de secuencia de ciclo y purificación según las especificaciones del fabricante del kit de secuenciación por terminador de ciclo BigDye por Perkin Elmer Inc., y se determinó la secuencia mediante un secuenciador de ADN de tipo AB1377 de Perkin Elmer Inc. Como resultado, fue evidente que en el ADN anormalmente corte descrito anteriormente, como se muestra en la figura 1, los 223 pb desde la base número 2697 hasta la número 2919 están delecionadas, haciéndolo de 437 pb. Este resultado indica que con la delección de aminoácidos codificada en la información genética posterior a la base número 2693, y mediante la inducción de un cambio de marco de lectura, se produce una cadena polipeptídica anormal corta de 65 aminoácidos.

Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito en detalle anteriormente, la divulgación proporciona un gen de enfermedad para la artritis reumatoide que se produce en el cromosoma humano X. La invención permite el diagnóstico fácil y fiable de artritis reumatoide. Además, esta invención es útil para el desarrollo de nuevos tratamientos y agentes terapéuticos para la artritis reumatoide.

Lista de secuencias

<110> Shunichi SHIOZAWA

<120> GEN DE ARTRITIS REUMATOIDE Y MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR ARTRITIS REUMATOIDE

<140> PCT/JP00/01697

<141> 23-10-1999

<150> JP11-116933

<151> 20-03-1999

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

5 <210> 1
 <211> 274
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <221> CDS
 <222> (2)...(271)

<308> No. de acceso de GenBank X12556

<400> 1

```

t ctt cag cag aat gat gaa aag caa cag gga gct ttt ata agt act gag 49
  Leu Gln Gln Asn Asp Glu Lys Gln Gln Gly Ala Phe Ile Ser Thr Glu
  1           5           10          15
gaa act gaa ttg gaa cac acc agc act gtg gtg gag gtc tgt gag gca 97
Glu Thr Glu Leu Glu His Thr Ser Thr Val Val Glu Val Cys Glu Ala
  20          25          30
att gcg tca gtt cag gca gaa gca aat aca gtt tgg act gag gca tca 145
Ile Ala Ser Val Gln Ala Glu Ala Asn Thr Val Trp Thr Glu Ala Ser
  35          40          45
caa tct gta gaa atc tct gaa gaa cct gcg gaa tgg tca agc aac tat 193
Gln Ser Val Glu Ile Ser Glu Glu Pro Ala Glu Trp Ser Ser Asn Tyr
  50          55          60
ttc tac ccc act tat gat gaa aat gaa gaa gaa aat agg ccc ctc atg 241
Phe Tyr Pro Thr Tyr Asp Glu Asn Glu Glu Glu Asn Arg Pro Leu Met
  65          70          75          80
aga cct gtg tcg gag atg gct ctc cta tat tga 274
Arg Pro Val Ser Glu Met Ala Leu Leu Tyr
  85          90
  
```

15 <210> 2
 <211> 61
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<221> CDS
 <222> (2)...(58)

25 <400> 2

```

a gac ctg tgt cgg aga tgg ctc tcc tat att gat gaa gct act atg tca 49
  Asp Leu Cys Arg Arg Trp Leu Ser Tyr Ile Asp Glu Ala Thr Met Ser
  1           5           10          15
aat ggc aag tag 61
Asn Gly Lys
  19
  
```

30 <210> 3
 <211> 10
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

atgaagacct 10

35 <210> 4
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido sintetizado

<400> 4
ggctagattc aaaccaatg 19

5 <210> 5
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Oligonucleótido sintetizado

<400> 5
gctacttgcc atttgac 17

15

REIVINDICACIONES

1. Un ADN que consiste en:
 - 5 (a) los nucleótidos 1-18 de SEQ ID NO: 1, y
 - (b) la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2,en donde el extremo 3' de (a) está unido al extremo 5' de (b).
- 10 2. Un ADN que consiste en una parte del ADN de la reivindicación 1 en donde dicha parte comprende la secuencia de bases de SEQ ID NO: 3, o un complemento de la misma y que se puede usar como una sonda para el diagnóstico genético.
- 15 3. Una proteína que consiste en SEQ ID NO: 2.
4. Un péptido que consiste en una parte de la proteína de SEQ ID NO: 2 en donde dicho péptido comprende 5 residuos de aminoácidos o más de dicha secuencia y que se puede usar como un antígeno para preparar un anticuerpo.
- 20 5. Un anticuerpo contra el péptido de la reivindicación 4.
6. Un método *in vitro* para el diagnóstico de artritis reumatoide, que comprende la detección del ARNm complementario al ADN de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la proteína de la reivindicación 3, o el péptido de la reivindicación 4, en una muestra biológica.
- 25

Figura 1

```

2680      2690      2700      2710      2720      2730
Normal;tcttcagcagaatgatgaaaagcaacaggaggcttttataaagtactgaggaactgaattg
AR      ;tcttcagcagaatgatgaaagaccctgtcggagatggctctcctataatgatgaagctact
      L Q Q N D E K Q Q G A F I S T E E T E L
      L Q Q N D E D L C R R W L S Y I D E A T

2740      2750      2760      2770      2780      2790
      gaacacaccagcactgtggtggaggctctgtgaggcaattgcgtcagttcaggcagaagca
      atgtcaaatggcaagtag
      E H T S T V V E V C E A I A S V Q A E A
      M S N G K *

2800      2810      2820      2830      2840      2850      2860
      aatacagtttggactgaggcatcacaatctgtagaaaatctctgaagaacctgcggaatggt
      N T V W T E A S Q S V E I S E E P A E W

      2870      2880      2890      2900      2910
      caagcaactatttctacccacttatgatgaaaatgaaagaagaaaataggcccctcatg
      S S N Y F Y P T Y D E N E E E N R P L M

2920      2930      2940      2950
      agaccctgtcggagatggctctcctatatattga
      R P V S E M A L L Y *

```