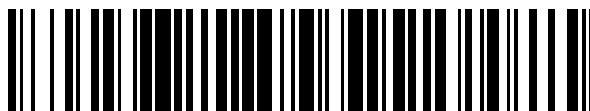


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 388 970**

51 Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04781229 .2**
96 Fecha de presentación: **13.08.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1663291**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Moléculas recombinantes de lubricina y usos de las mismas**

30 Prioridad:
14.08.2003 US 495741 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2012

73 Titular/es:
**WYETH LLC
FIVE GIRALDA FARMS
MADISON, NJ 07940, US**

72 Inventor/es:
**FLANNERY, Carl Ralph;
CORCORAN, Christopher John;
FREEMAN, Bethany Annis y
RACIE, Lisa Anne**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

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

ES 2 388 970 T3

DESCRIPCIÓN

Moléculas recombinantes de lubricina y usos de las mismas

La invención se refiere a nuevas moléculas recombinantes de lubricina y a sus usos como lubricantes, agentes anti-adhesivos y/o complementos intraarticulares para, por ejemplo, articulaciones sinoviales, menisco, tendón, peritoneo, pericardio y pleura.

Antecedentes de la invención

El funcionamiento óptimo de las articulaciones sinoviales depende de unos coeficientes de fricción extremadamente bajos entre los tejidos articulares. Normalmente, se mantiene una superficie contigua y bien lubricada sobre el cartílago articular. Sin embargo, en la artrosis, una reducida lubricación contribuye a la degradación y la fibrilación de la matriz del cartílago; éstas a su vez contribuyen a la disfunción y el dolor articular. Una lubricación reducida también conduce a una disfunción y a un dolor articular y a otras formas de artritis, incluyendo la artritis reumatoide.

Para otros tejidos (por ejemplo, tendones), una superficie lubricada también contribuye a un funcionamiento óptimo. Además de requerir una superficie lubricada, la función normal del tendón requiere la prevención de la adhesión celular a las superficies del tendón. En la lesión y la reparación de un tendón flexor, por ejemplo, la formación de adhesiones en el tendón es la complicación más habitual.

La proteína lubricina natural está relacionada con la proteína precursora del factor estimulante de los megacariocitos (*megakaryocyte stimulating factor*, MSF). PRG4 (proteoglicano 4) es el nombre del MSF que ha sido aceptado para la base de datos de Nomenclatura de Genes Humanos UCL/HGNC/HUGO. La proteína PRG4 (es decir, la proteína precursora del MSF) se describe en los documentos US6433142 y US20020137894. El polipéptido codificado por el exón 6 del gen PRG4 está muy glucosilado y parece ser necesario para que la proteína relacionada con el PRG4 sirva como lubricante, por ejemplo, entre las superficies del cartílago articular.

Algunos estudios indican que la glucoproteína PRG4 también es sintetizada por los sinoviocitos íntimos que recubren las vainas de los tendones; es muy probable que la glucoproteína también se origine en los tenocitos (Rees y col., 2002). La glucoproteína está presente de forma prominente en las regiones fibrocartilaginosas del tendón. De una forma complementaria a su función de líquido sinovial, la glucoproteína puede jugar un importante papel citoprotector en los tendones evitando la adhesión celular a las superficies de los tendones, así como proporcionando lubricación durante la función normal del tendón.

El exón 6 del gen PRG4 (también denominado "lubricina") codifica para aproximadamente 76-78 repeticiones de secuencias de tipo KEPAPTT y 6 repeticiones de secuencias de tipo TTTX. La variación en el número de secuencias repetidas comparables en proteínas recombinantes de lubricina según la presente invención permite el desarrollo de bioterapéuticos mejorados para aumentar la lubricación en articulaciones y para contrarrestar una adhesión indeseada entre tejidos.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a nuevas moléculas recombinantes de lubricina y a su uso como lubricantes, agentes antiadhesivos y/o complementos intraarticulares.

Con objeto de optimizar los parámetros de expresión y de investigar la necesidad funcional de aproximadamente todas las 76-78 secuencias de tipo KEPAPTT, se diseñaron constructos de expresión de lubricina que permitían la síntesis de proteínas recombinantes de lubricina con diversos grados de sustitución de oligosacáridos unidos por O. Esto se consigue incorporando cifras variables de las secuencias de tipo KEPAPTT en el "núcleo" de un constructo de ADNc formado por los exones 1 hasta 5, las regiones flanqueantes 5' y 3' del exón 6, y los exones 7 hasta 12. La inserción repetitiva de "casetes de ADNc sintético" que codifican para 40 secuencias múltiples de tipo KEPAPTT facilita la generación de constructos recombinantes de lubricina de diferentes tamaños. El foco inicial de estos estudios fue sobre el constructo PRG4-Lub:1 (que contiene el ADN del "casete sintético 1 de ADNc" (ID. SEC. Nº: 1), que codifica para cuatro secuencias KEPAPTT).

Las proteínas recombinantes de lubricina de la presente invención comparten una estructura primaria con varias isoformas de la lubricina humana natural (véanse los documentos WO 010 7068, US6743774, US20040072741 y WO0064930). De entre las 45 isoformas caracterizadas, cada isoforma difiere en la composición de los exones del gen que codifica para la estructura primaria de la isoforma. Por ejemplo, los exones 1 hasta 12 del gen PRG4 codifica para la isoforma V0, que representa la isoforma completa, mientras que los exones 1 hasta 4 y 6 hasta 12 codifican para la isoforma V1, que carece únicamente de un segmento codificado por el exón 5. Los exones 1 hasta 3 y 6 hasta 12 codifican para la isoforma V2, que carece de los segmentos codificados por los exones 4 y 5. Finalmente, los exones 1, 3 y 6 hasta 12 codifican para la isoforma V3, que carece de los segmentos codificados por los exones 2, 4 y 5. Probablemente existan otras isoformas, y se han descrito algunas proteínas mutantes relacionadas (véase el documento US20020086824).

En particular, la presente invención proporciona una proteína recombinante de lubricina que comprende secuencias repetitivas de tipo KEPAPTT. En las formas de realización preferidas, la invención proporciona una proteína aislada que comprende las ID. SEC. N°: 7, 11, 15, 19 ó 23. En formas de realización relacionadas adicionales, la invención proporciona polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican para la proteína recombinante de lubricina. En formas de realización preferidas, la invención proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína. En formas de realización relacionadas adicionales, la invención proporciona un polinucleótido aislado con una identidad de al menos el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% con las ID. SEC. N°: 6, 10, 14, 18 ó 22 sobre la longitud completa de la secuencia.

Tabla 1. Identificación de Secuencias con Identificadores de Secuencia

ID. SEC. N°:	Identificación
1	Secuencia de nucleótidos del casete sintético 1 de ADNc: 155 bases
2	Traducción de la ID. SEC. N°: 1: 51 aminoácidos
3	Secuencia de nucleótidos del casete sintético 2 de ADNc: 125 bases
4	Traducción de la ID. SEC. N°: 3: 41 aminoácidos
5	vector pTmed2 que contiene el constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:1: 8049 bases
6	Constructo de ADNc recombinante PRG4-Lub:1: 2946 bases
7	Secuencia de aminoácidos de la proteína completa PRG4-LUB:1: 981 aminoácidos
8	Inserto de ADN Lub:1 DNA del casete sintético 1 de ADNc: 157 bases
9	51 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:1 (4 secuencias KEPAPTT entre S373 y E425 en la ID. SEC. N°: 7)
10	Constructo de ADNc recombinante PRG4-Lub:2: 3024 bases
11	Secuencia de aminoácidos de la proteína completa PRG4-LUB:2: 1007 aminoácidos
12	Inserto de ADN Lub:2 del casete 1 de ADNc y una secuencia del casete sintético 2 de ADNc: 235 bases
13	77 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:2 (6 secuencias KEPAPTT entre S373 y E451 en la ID. SEC. N°: 11)
14	Constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:3: 3117 bases
15	Secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4-LUB:3 completa: 1038 aminoácidos
16	Inserto de ADN Lub:3 del casete sintético 1 de ADNc y dos secuencias del casete sintético 2 de ADNc: 328 bases
17	108 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:3 (9 secuencias KEPAPTT entre S373 y E482 en la ID. SEC. N°: 15)
18	Constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:4: 3210 bases
19	Secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4-LUB:4 completa: 1069 aminoácidos
20	Inserto de ADN Lub:4 del casete sintético 1 de ADNc y tres secuencias del casete sintético 2 de ADNc: 421 bases
21	139 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:4 (12 secuencias KEPAPTT entre S373 y E513 en la ID. SEC. N°: 19)
22	Constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:5: 3303 bases
23	Secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4-LUB:5 completa: 1100 aminoácidos
24	Inserto de ADN Lub:5 del casete sintético 1 de ADNc y cuatro secuencias del casete sintético 2 de ADNc: 514 bases
25	170 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:5 (15 secuencias KEPAPTT entre S373 y E544 en la ID. SEC. N°: 23)
26	Secuencia de aminoácidos "APTTPKEPAPTTTKSAPTTPKEPAPTTT KEPAPTTTKEPAPTTTK" (45 aminoácidos) de la proteína preferida PRG4-LUB:N
27	Secuencia de aminoácidos "KEPAPTTTKEPAPTTTKSAPTTPKEPAPTTT"(31 aminoácidos) repetida N-1 veces en la proteína preferida PRG4-LUB:N
28	Secuencia de aminoácidos "EPAPTTTKSAPTTPKEPAPTTT" (22 aminoácidos) que se une a la ID. SEC. N°: 26 hasta (N-2) repeticiones de la ID. SEC. N°: 27 en la proteína preferida PRG4-LUB:N, donde N ≥ 3.
29	Secuencia de aminoácidos "KEPKAPTTT" (10 aminoácidos) de la proteína preferida PRG4-LUB:N donde N ≥ 2.

La invención también proporciona formas de realización relacionadas con una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína recombinante de lubricina en un portador farmacéuticamente

aceptable. En algunas formas de realización, la composición comprende adicionalmente hialuronano o hilano.

También se describe en este documento un procedimiento para tratar a un sujeto que comprende: obtener una composición de una proteína recombinante de lubricina; y administrar dicha composición a un tejido del sujeto. En formas de realización relacionadas de este procedimiento, el tejido se elige del grupo formado por cartílago, membrana sinovial, menisco, tendón, peritoneo, pericardio y pleura. En formas de realización relacionadas adicionales de este procedimiento, el procedimiento comprende adicionalmente una etapa elegida del grupo formado por: proporcionar un anestésico al sujeto; proporcionar un fármaco antiinflamatorio al sujeto; proporcionar un antibiótico al sujeto; aspirar fluido del sujeto; lavar tejido del sujeto; obtener imágenes del tejido del sujeto. En otras formas de realización relacionadas, al sujeto se elige del grupo consistente en un ratón, una rata, un gato, un perro, un caballo y un ser humano.

En otras formas de realización, la invención también proporciona un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica para una proteína recombinante de lubricina, donde el polinucleótido está unido operativamente a una secuencia de control de la expresión. En formas de realización relacionadas, la invención proporciona un procedimiento para producir una proteína recombinante de lubricina que comprende: hacer crecer células transformadas con el vector de expresión en medio de cultivo líquido; y recoger la proteína recombinante de lubricina del medio. La etapa de recolección de la proteína puede comprender adicionalmente: concentrar la proteína filtrando el medio a través de una membrana; recoger la proteína retenida en la membrana; y solubilizar la proteína recogida en una disolución salina tamponada que contiene clorhidrato de L-arginina con una concentración que varía entre 0,1 y 2,0 M.

En este documento también se describe un anticuerpo aislado específico para una proteína recombinante de lubricina.

Otras características y ventajas de la invención serán apreciables a partir de la siguiente descripción de las formas de realización preferidas de las mismas, y a partir de las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

La presente invención también engloba polinucleótidos que son homólogos de las formas de realización específicas descritas en este documento, por ejemplo, con una identidad de secuencia de al menos el 80%, el 85%, el 95%, el 97%, el 98% o el 99% con las secuencias de ADN especificadas. La invención describe adicionalmente polinucleótidos con una secuencia de ácidos nucleicos capaz de hibridar con toda la longitud de un dominio funcional del complemento de las secuencias de ADN especificadas en condiciones de elevada rigurosidad. La invención también incluye proteínas codificadas por estos polinucleótidos homólogos o hibridantes.

Con objeto de definir más claramente las formas de realización de la presente invención, se proporcionan las siguientes definiciones.

Definiciones. La frase "secuencia repetitiva de tipo KEPAPTT" significa una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos el 90%, el 93%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% o mayor con: (a) la secuencia "APTPKEPAPTTTTSAPTTTPKEPAPTTTKE-PAPTTTPKEPAPTTTK" (ID. SBEQ. Nº: 26; 45 aminoácidos) y con al menos una sustitución unida por O, (b) la secuencia "KEPAPTTTKEPAPTTTTSAPTTTPKEPAPTTTP" (ID. SEC. Nº: 27; 31 aminoácidos) y con al menos una sustitución unida por O; o (c) la secuencia "EPAPTTTTSAPTTTPKEPAPTTTP" (ID. SEC. Nº: 28; 22 aminoácidos) y con al menos una sustitución unida por O. Una secuencia repetitiva de tipo KEPAPTT puede tener preferiblemente dos, tres, cuatro o más sustituciones unidas por O.

Aunque existen varios procedimientos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, el término "identidad" es bien conocido por los artesanos expertos y tiene un significado definido con respecto a un procedimiento específico dado. La identidad de secuencia descrita en este documento se mide usando la herramienta BLAST 2 SEQUENCES disponible a través del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>; véase también Tatusova y Madden (1999)). Para las secuencias de aminoácidos, los parámetros usados son expect = 1000; word size = 2; filter = off; y otros parámetros establecidos en los valores por defecto. Estos mismos parámetros se usan para las secuencias de ácidos nucleicos excepto word size = 8. Los valores por defecto para las comparaciones entre secuencias de aminoácidos son: Matrix = BLOSUM62; open gap = 11; extension gap = 1 penalties; y gap x dropoff = 50. Los valores por defecto para las comparaciones entre secuencias de ácidos nucleicos son: reward for a match = 1; penalty for a mismatch = -2; strand option = both strands; open gap = 5; extension gap = 2 penalties; y gap x dropoff = 50.

Una sustitución unida por O de lubricina recombinante puede ser una sustitución con el oligosacárido lubricante β -(1-3)-Gal-GalNac, o con otras fracciones, incluyendo fracciones de carbohidratos artificiales naturales (tales como sulfato de queratán o sulfato de condroitina). En algunas formas de realización, la sustitución unida por O puede ser con fracciones que contribuyen a una capacidad de la lubricina recombinante de actuar como portador del fosfolípido activo de superficie (*surface active phospholipid*, SAPL) o de tensioactivos (Hills, 2002). El porcentaje de glucosilación o de sustitución se determina en peso (peso en seco).

Las condiciones de elevada rigurosidad, cuando se usan con referencia a una hibridación de ADN:ADN, comprenden unas condiciones equivalentes a la unión o hibridación a 42°C en una disolución consistente en 5X de SSPE (43,8 g/l de NaCl, 6,9 g/l de NaH₂PO₄ • H₂O y 1,85 g/l de EDTA, pH ajustado a 7,4 con NaOH), 0,5% de SDS, 5X de reactivo de Denhardt y 100 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado, seguido de un lavado en una disolución que comprende 0,1X de SSPE, 1,0% de SDS a 42°C cuando se emplea una sonda de aproximadamente 500 nucleótidos de longitud.

Se dice que los polipéptidos u otros compuestos descritos en este documento están "aislados" cuando están en unas preparaciones que tienen al menos un 50% en peso (peso en seco) del compuesto de interés. Se dice que los polipéptidos u otros compuestos descritos en este documento son "sustancialmente puros" cuando están en preparaciones que tienen al menos un 80% en peso (peso seco) del compuesto de interés. Los polipéptidos u otros compuestos descritos en este documento se dice que son "homogéneos" cuando están en preparaciones que tienen al menos un 95%, y preferiblemente un 99%, en peso (peso en seco) del compuesto de interés. La pureza se mide mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida reductora y una tinción con azul de coomassie realizada, seguida por la densidad óptica de restos de bandas (es decir, midiéndose la pureza de la proteína mediante densitometría óptica).

"Exento de pirógenos" significa exento de contaminantes que provocan fiebre, incluyendo endotoxinas. La medición de los contaminantes debe realizarse mediante pruebas estándar aplicables establecidas por la Food and Drug Administration de EE.UU..

Según se usa en este documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa la cantidad total de cada componente activo de la composición farmacéutica o procedimiento pertinente que es suficiente para mostrar un beneficio significativo al paciente, es decir, tratamiento, curación, prevención o mejora del estado clínico pertinente, o un aumento en la tasa de tratamiento, curación, prevención o mejora de dichos estados. Cuando se aplica a un principio activo individual, administrado individualmente, el término se refiere a ese ingrediente individual. Cuando se aplica a una combinación, el término se refiere a cantidades combinadas de los principios activos que dan como resultado un efecto terapéutico, ya sea administrados en combinación, sucesivamente o simultáneamente.

Las formas de realización de la presente invención pueden usarse como complementos intraarticulares. La complementación intraarticular con compuestos no derivados de lubricina se ha practicado como terapia articular. Por ejemplo, clínicamente se usa la "viscocomplementación" con hialuronano polimérico e hilanos de pesos moleculares mayores (tales como el fluido viscoelástico SYNVISCO® "Hylan G-F 20"- distribuido por WYETH® Pharmaceuticals) para tratar el dolor de rodilla asociado con la artrosis. Esta viscocomplementación ha mostrado un significativo valor terapéutico, particularmente para reducir el dolor en pacientes con carga de peso (Wobig y col., 1998).

El Hylan G-F 20 se genera mediante la reticulación de varias moléculas de hialuronano obtenidas a partir de crestas de gallos o de pollos. La viscocomplementación con Hylan G-F 20 puede ser significativamente más eficaz para aliviar el dolor que la viscocomplementación con hialuronano de menor peso molecular (Wobig y col., 1999). Además, el alivio del dolor mediante la viscocomplementación con Hylan G-F 20 puede ser particularmente preferible frente a la administración de AINES para aquellos pacientes que no toleran los AINES (por ejemplo, en pacientes con un elevado riesgo de complicaciones gastrointestinales; Espallargues y Pons, 2003). Aunque la viscocomplementación con Hylan G-F 20 es una terapia segura y bien tolerada que proporciona una disminución a corto plazo (es decir, hasta los 3-6 meses tras el tratamiento) de los síntomas dolorosos mientras mejora la función articular, la terapia puede no impedir significativamente la eventual necesidad de la sustitución de la rodilla en pacientes con artrosis (Espallargues y Pons, 2003).

Ejemplo 1: clonación de lubricina recombinante

Constructos. En algunas formas de realización, el constructo de ADN de base para la generación de moléculas recombinantes de lubricina está formado por el codón Met (ATG) hasta el sitio de restricción *BssHII* (G[^]CGCGC) de la ID. SEC. N°: 6 (es decir, los números de bases desde el 1 hasta el 1123) y el sitio de restricción *BspEI* (T[^]CCGGA) hasta el codón de detención (TAA) de la ID. SEC. N°: 6 (es decir, los números de bases desde el 1269 hasta el 2946). Estas secuencias, es decir, los números de bases desde el 1 hasta el 1123 y del 1269 hasta el 2946 de la ID. SEC. N°: 6, codifican para los aminoácidos M1 hasta el S373 (codificados por los exones 1 hasta 5 y aproximadamente 174 codones flanqueantes 5' del exón 6) y E848 hasta P1404 (codificados por aproximadamente 293 codones flanqueantes 3' del exón 6 y los exones 7 hasta 14) de la lubricina natural completa (es decir, PRG4). La porción del exón 6 ausente del constructo de ADN de base corresponde a la secuencia de ADN que codifica para los aminoácidos A374 hasta P847 del PRG4 natural (474 aminoácidos ausentes de aproximadamente los 940 aminoácidos codificados por el exón 6). Esta secuencia de aminoácidos ausente es rica en secuencias de tipo KEPAPTT.

La secuencia de ADN del casete sintético 1 de ADNc (ID. SEC. N°: 1) se añade *BssHII*/*BspEI* al constructo de base para hacer el constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:1 (ID. SEC. N°: 6). La ID. SEC. N°: 6 está formada por el inserto de ADN Lub:1 (ID. SEC. N°: 8; que codifica para los 51 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 9 con sus cuatro secuencias KEPAPTT) entre el ADN que codifica para los aminoácidos M1 hasta S373 y el ADN que codifica para

E848 hasta P1404 del PRG4 natural. En otras palabras, en lugar de A374 hasta P847 (474 aminoácidos) del PRG4 natural, la lubricina recombinante PRG4-LUB:1 incluye 51 aminoácidos que forman cuatro secuencias KEPAPTT perfectas y aproximadamente tres secuencias KEPAPTT imperfectas.

- 5 La secuencia de ADN del casete sintético 2 de ADNc (ID. SEC. Nº: 3) se añade *Bsu36I/BspEI* al constructo PRG4-Lub:1 para hacer el constructo de ADNc PRG4-Lub:2 (ID. SEC. Nº: 10). El constructo de ADNc PRG4-Lub:1 tiene un sitio de restricción *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 1225 hasta 1231 de la ID. SEC. Nº: 6). Cuando se añade el casete sintético 2 de ADNc al constructo de ADNc PRG4-Lub:1, este sitio *Bsu36I* se destruye, pero el casete sintético 2 contiene otro sitio de restricción interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 92 hasta 98 de la ID. SEC. Nº: 3). Consecuentemente, puede crearse un constructo
- 10 PRG4-Lub:N+1 añadiendo el casete sintético 2 de ADNc *Bsu36I/BspEI* al constructo previo PRG4-Lub:N en este sitio de restricción interno *Bsu36I* proporcionado por el casete sintético 2 de ADNc.

- 15 Los casetes de ADNc se sintetizan como oligonucleótidos monocatenarios y se hibridan entre sí para producir un fragmento de ADN bicatenario con extremos adherentes. Es por esto que los sitios terminales *BssHII*, *Bsu36I* y *BspEI* parecen incompletos. En el casete sintético 1 de ADNc (ID. SEC. Nº: 1), una secuencia limitada por los sitios de restricción flanqueantes remanentes *BssHII* (G[^]CGCGC) y *BspEI* (T[^]CCGGA) incluye un sitio de restricción interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG); los sitios de restricción están subrayados a continuación:

CGCGCCCACTCCAAAAGAGCCCGCACCTACCACGACAAAGTCAGCTCCTACTACGCCCC
AAGAGCCAGCGCCGACGACTACTAAAGAACCGGCACCCACCACGCCTAAGGAGCCAGCTCCT
ACTACAACGAAACCGGCACCAACCACTCCGG

La ID. SEC. Nº: 2, que es una traducción de la ID. SEC. Nº: 1, incluye cuatro secuencias KEPAPTT que son coincidencias perfectas (destacadas a continuación):

- 1 A P T T P K E P A P T T T K S A P T T P
CGCGCCCACTCCAAAAGAGCCCGCACCTACCACGACAAAGTCAGCTCCTACTACGCCCC
- 21 K E P A P T T T K E P A P T T P K E P A
AAAGAGCCAGCGCCGACGACTACTAAAGAACCGGCACCCACCACGCCTAAGGAGCCAGCT
- 41 P T T T K P A P T T P
CCTACTACAACGAAACCGGCACCAACCACTCCGG
- 20

El casete sintético 2 de ADNc (ID. SEC. Nº: 3) tiene similarmente un sitio de restricción remanente 5'-terminal *Bsu36I* (es decir, CC[^]TNAGG, evidenciado únicamente por la secuencia TAA), un sitio de restricción remanente 3'-terminal *BspEI* (T[^]CCGGA), y el sitio de restricción interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG); los sitios de restricción están subrayados a continuación:

- 25 TAAAGAACCAGCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGAAGAGCGCACCCA
CAACACCAAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCCAAACCGGCACCAACCACTCCG
G

La ID. SEC. Nº: 4, que es una traducción de la ID. SEC. Nº: 3, incluye tres secuencias KEPAPTT que son coincidencias perfectas (destacadas a continuación):

1 K E P A P T T T K E P A P T T T K S A P
TAAAGAACCAGCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGAAGAGCGCACCC

21 T T P K E P A P T T P K E P K P A P T T
ACAACACCAAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCCAAACCGGCACCAACCACT

41 P
CCGG

- 30 El constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:1 (ID. SEC. Nº: 6) en el vector pTmed2 (constructo más vector igual a la ID. SEC. Nº: 5) está flanqueado por los sitios de restricción *Sall* (G[^]TCGAC; números de base 1027 hasta 1032 de la ID. SEC. Nº: 5) y *NotI* (GC[^]GGCCGC; números de base 3984 hasta 3991 de la ID. SEC. Nº: 5). El sitio *Sall* incorpora una secuencia Kozak de inicio de la traducción modificada (CCCACC; números de base 1032 hasta 1037 de la ID. SEC. Nº: 5) antes del codón de inicio de la traducción ATG (números de base 1038 hasta 1040 de la ID. SEC. Nº: 5). Entre los sitios de restricción *BssHII* (G[^]CGCGC; números de base 2155 hasta 2160 de la ID. SEC. Nº:

5) y *BspEI* (T[^]CCGGA; números de base 2306 hasta 2311 de la ID. SEC. N°: 5) se encuentra el sitio de clonación interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 2262 hasta 2268 de la ID. SEC. N°: 5).

El constructo de ADNc PRG4-Lub:1 (ID. SEC. N°: 6) es traducido en la proteína PRG4-LUB:1 (ID. SEC. N°: 7). El inserto entre S373 y E425 (es decir, E848 del PRG4 natural) de la proteína completa PRG4-LUB:1 (ID. SEC. N°: 7) son los 51 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 9. Estos son traducidos desde el inserto de ADN Lub:1 (ID. SEC. N°: 8) e incluyen cuatro secuencias KEPAPTT perfectas. Entre el sitio de restricción *BssHII* (G[^]CGCGC; números de base 1118 hasta 1123 de la ID. SEC. N°: 6) y el sitio de restricción *BspEI* (T[^]CCGGA; números de base 1269 hasta 1274 de la ID. SEC. N°: 6) se encuentra el sitio de clonación interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 1225 hasta 1231 de la ID. SEC. N°: 6).

Como en el constructo recombinante PRG4-Lub:1 del vector pTmed2, el constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:2 (ID. SEC. N°: 10) del vector pTmed2 está flanqueado por los sitios de restricción *Sall* (G[^]TCGAC) y *NotI* (GC[^]GGCCGC); el sitio *Sall* incorpora una secuencia Kozak de inicio de la traducción modificada (CCCACC) antes del codón de inicio de la traducción ATG (números de base 1 hasta 3 de la ID. SEC. N°: 10). De forma similar, el constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:3 (ID. SEC. N°: 14), el constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:4 (ID. SEC. N°: 18) y el constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:5 (ID. SEC. N°: 22) del vector pTmed2 están flanqueados cada uno por los sitios de restricción *Sall* (G[^]TCGAC) y *NotI* (GC[^]GGCCGC); el sitio *Sall* incorpora una secuencia Kozak de inicio de la traducción modificada (CCCACC) antes del codón de inicio de la traducción ATG (números de base 1 hasta 3 de las ID. SEC. N°: 14, 18 y 22, respectivamente).

En el constructo de ADNc PRG4-Lub:2, el sitio de clonación interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 1318 hasta 1324 de la ID. SEC. N°: 10) se encuentra entre los sitios de restricción *BssHII* (G[^]CGCGC; números de base 1118 hasta 1123) y *BspEI* (T[^]CCGGA; números de base 1347 hasta 1352). El constructo PRG4-Lub:2 (ID. SEC. N°: 10) es traducido en la proteína PRG4-LUB:2 (ID. SEC. N°: 11). El inserto entre S373 y E451 (es decir, E848 del PRG4 natural) de la proteína PRG4-LUB:2 completa (ID. SEC. N°: 11) son los 77 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 13. Estos son traducidos desde el inserto de ADN Lub:2 (ID. SEC. N°: 12). En lugar de A374 hasta P847 (474 aminoácidos) del PRG4 natural, los 77 aminoácidos de la lubricina recombinante PRG4-LUB:2 forman seis secuencias KEPAPTT perfectas y aproximadamente cuatro secuencias KEPAPTT imperfectas.

En el constructo de ADNc PRG4-Lub:3, el sitio de clonación interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 1411 hasta 1417 de la ID. SEC. N°: 14) se encuentra entre los sitios de restricción *BssHII* (G[^]CGCGC; números de base 1118 hasta 1123) y *BspEI* (T[^]CCGGA; números de base 1440 hasta 1445). El constructo PRG4-Lub:3 (ID. SEC. N°: 14) es traducido en la proteína PRG4-LUB:3 (ID. SEC. N°: 15). El inserto entre S373 y E482 (es decir, E848 del PRG4 natural) de la proteína PRG4-LUB:3 completa (ID. SEC. N°: 15) son los 108 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 17. Estos son traducidos desde el inserto de ADN Lub:3 (ID. SEC. N°: 16). En lugar de A374 hasta P847 (474 aminoácidos) del PRG4 natural, los 108 aminoácidos de la lubricina recombinante PRG4-LUB:3 forman nueve secuencias KEPAPTT perfectas y aproximadamente cinco secuencias KEPAPTT imperfectas.

En el constructo de ADNc PRG4-Lub:4, el sitio de clonación interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 1504 hasta 1510 de la ID. SEC. N°: 18) se encuentra entre los sitios de restricción *BssHII* (G[^]CGCGC; números de base 1118 hasta 1123) y *BspEI* (T[^]CCGGA; números de base 1533 hasta 1538). El constructo PRG4-Lub:4 (ID. SEC. N°: 18) es traducido en la proteína PRG4-LUB:4 (ID. SEC. N°: 19). El inserto entre S373 y E513 (es decir, E848 del PRG4 natural) de la proteína PRG4-LUB:4 completa (ID. SEC. N°: 19) son los 139 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 21. Estos son traducidos desde el inserto de ADN Lub:4 (ID. SEC. N°: 20). En lugar de A374 hasta P847 (474 aminoácidos) del PRG4 natural, los 139 aminoácidos de la lubricina recombinante PRG4-LUB:4 forman doce secuencias KEPAPTT perfectas y aproximadamente seis secuencias KEPAPTT imperfectas.

En el constructo de ADNc PRG4-Lub:5, el sitio de clonación interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 1597 hasta 1603 de la ID. SEC. N°: 22) se encuentra entre los sitios de restricción *BssHII* (G[^]CGCGC; números de base 1118 hasta 1123) y *BspEI* (T[^]CCGGA; números de base 1626 hasta 1631). El constructo PRG4-Lub:5 (ID. SEC. N°: 22) es traducido en la proteína PRG4-LUB:5 (ID. SEC. N°: 23). El inserto entre S373 y E544 (es decir, E848 hasta) de la proteína PRG4-LUB:5 completa (ID. SEC. N°: 23) son los 170 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 25. Estos son traducidos desde el inserto de ADN Lub:5 (ID. SEC. N°: 24). En lugar de A374 hasta P847 (474 aminoácidos) del PRG4 natural, los 170 aminoácidos de la lubricina recombinante PRG4-LUB:5 forman quince secuencias KEPAPTT perfectas y aproximadamente siete secuencias KEPAPTT imperfectas.

Importantemente, el proceso de insertar el casete sintético 2 de ADNc puede repetirse indefinidamente. Cada repetición da como resultado la adición de tres secuencias KEPAPTT perfectas. Al igual que las lubricinas recombinantes PRG4-LUB:2 hasta PRG4-LUB:5 se construyen de esta forma mediante el uso de secuencias de inserto, se construyen las lubricinas recombinantes PRG4-LUB:6 hasta PRG4-LUB:N. La Tabla 2 proporciona un resumen de las secuencias del inserto nBssHII/BspEI.

Tabla 2. Secuencias del inserto *BssHII/BspE1*

INSERTO DE LUB	ID. SEC. N°	Secuencias (los sitios de restricción están subrayados en los insertos de ADN; las secuencias KEPAPTT están destacadas que los insertos de proteína)
Lub:1	8	<u>GCGCGCCCACTCCAAAAGAGCCCGCACCTACCACGACAAAGTCAGCTCCT</u> <u>ACTACGCCCCAAAGAGCCAGCGCCGACGACTACTAAAGAACCGGCACCCACCAC</u> <u>GCCTAAGGAGCCAGCTCCTACTACAACGAAACCGGCACCAACCACTCCGGA</u>
LUB:1	9	APTTP <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TKPAPTTP
Lub:2	12	<u>GCGCGCCCACTCCAAAAGAGCCCGCACCTACCACGACAAAGTCAGCTCCT</u> <u>ACTACGCCCCAAAGAGCCAGCGCCGACGACTACTAAAGAACCGGCACCCACCAC</u> <u>GCCTAAAGAACCAGCCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGA</u> <u>AGAGCGCACCCACAACACCAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCC</u> <u>AAACCGGCACCAACCACTCCGGA</u>
LUB:2	13	APTTP <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TK SAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> PKPKAPTTP
Lub:3	16	<u>GCGCGCCCACTCCAAAAGAGCCCGCACCTACCACGACAAAGTCAGCTCCT</u> <u>ACTACGCCCCAAAGAGCCAGCGCCGACGACTACTAAAGAACCGGCACCCACCAC</u> <u>GCCTAAAGAACCAGCCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGA</u> <u>AGAGCGCACCCACAACACCAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCA</u> <u>GCCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGAAGAGCGCACCCAC</u> <u>AACACCAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCCAAACCGGCACCA</u> <u>CCACTCCGGA</u>
LUB:3	17	APTTP <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TK SAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> PKPKAPT TP
Lub:4	20	<u>GCGCGCCCACTCCAAAAGAGCCCGCACCTACCACGACAAAGTCAGCTCCT</u> <u>ACTACGCCCCAAAGAGCCAGCGCCGACGACTACTAAAGAACCGGCACCCACCAC</u> <u>GCCTAAAGAACCAGCCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGA</u> <u>AGAGCGCACCCACAACACCAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCA</u> <u>GCCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGAAGAGCGCACCCAC</u> <u>AACACCAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCCAGCCCCCTACTACGA</u> <u>CAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGAAGAGCGCACCCACAACACCAAGGAG</u> <u>CCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCCAAACCGGCACCAACCACTCCGGA</u>
LUB:4	21	APTTP <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TK SAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TK <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> PKPKAPTTP
Lub:5	24	<u>GCGCGCCCACTCCAAAAGAGCCCGCACCTACCACGACAAAGTCAGCTCCT</u> <u>ACTACGCCCCAAAGAGCCAGCGCCGACGACTACTAAAGAACCGGCACCCACCAC</u> <u>GCCTAAAGAACCAGCCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGA</u> <u>AGAGCGCACCCACAACACCAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCA</u> <u>GCCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGAAGAGCGCACCCAC</u> <u>AACACCAAGGAGCCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCCAGCCCCCTACTACGA</u> <u>CAAAGGAGCCTGCACCCACAACCACGAAGAGCGCACCCACAACACCAAGGAG</u> <u>CCGCCCCCTACGACTCCTAAGGAACCCAGCCCCCTACTACGACAAAGGAGCCTGC</u> <u>ACCCACAACCACGAAGAGCGCACCCACAACACCAAGGAGCCGCCCCCTACGA</u> <u>CTCCTAAGGAACCCAAACCGGCACCAACCACTCCGGA</u>
LUB:5	25	APTTP <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TK SAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TK <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> TKSAPTTP <u>KEPAPTT</u> <u>KEPAPTT</u> PKPKAPTTP

Aunque hemos ejemplificado el constructo de ADN de base con un PRG4 completo que contiene los 12 exones (menos una porción central del exón 6), también pueden emplearse variantes de empalme del PRG4, dependiendo de las diversas actividades y de la longitud deseada. Adicionalmente, pueden emplearse diferentes enzimas de restricción en una estrategia análoga, siempre que su ubicación esté convenientemente localizada dentro de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína PRG4. En otras formas de realización, el constructo de base de ADN carece de la secuencia del exón 6 natural, pero incluye una o más de las secuencias del exón 1 hasta el exón 5 o de las secuencias del exón 7 hasta el exón 12 del gen natural de PRG4. En otras formas de realización, el constructo de base de ADN es idéntico a las secuencias del MSF recombinante descritas en los documentos US6433142 o US20020137894, excepto porque están ausentes parte o todas las secuencias del exón 6.

La invención proporciona constructos de ADNc que codifican para lubricinas recombinantes que son clonadas en los sitios de restricción *Sall* (G[^]TCGAC; números de base 1027 hasta 1032 de la ID. SEC. N°: 5) y *NotI* (GC[^]GGCCGC; números de base 3984 hasta 3991 de la ID. SEC. N°: 5) del vector de expresión eucariota pTmed2 como una forma de realización preferida (por ejemplo, el constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:1 en el vector de expresión pTmed2 está localizado en la ID. SEC. N°: 5 en los números de base 1038 hasta 3983). El sitio *Sall* incorpora la primera base de una secuencia Kozak de inicio de la traducción modificada (CCACC; número de base 1032 de la ID. SEC. N°: 5) antes del codón de inicio de metionina (ATG; números de base 1038 hasta 1040 de la ID. SEC. N°: 5). Otras formas de realización de la invención incluyen otras combinaciones de sitios de restricción y otros vectores de expresión.

En una forma de realización preferida, el proceso repetitivo hace uso del casete sintético 1 de ADNc (ID. SEC. N°: 1) del vector de expresión pTmed2, que está flanqueado por los sitios de restricción para *BssHII* (G[^]CGCGC) y *BspEI* (T[^]CCGGA), y el casete sintético 1 de ADNc, que incluye un sitio de restricción interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 107 hasta 113 de la ID. SEC. N°: 1). Para la generación repetitiva de constructos de lubricina recombinantes que contienen secuencias de tipo KEPAPTT en esta forma de realización preferida, se insertó el casete sintético 2 de ADNc (ID. SEC. N°: 3) entre los sitios *Bsu36I* y *BspEI* del constructo recombinante. El casete sintético 2 de ADNc (ID. SEC. N°: 3) está flanqueado por un sitio *Bsu36I* modificado remanente (TAAAG) y un sitio *BspEI* (ACTCCGG) remanente. También incluye un sitio de clonación interno *Bsu36I* (CC[^]TNAGG, es decir, CC[^]TAAGG; números de base 92 hasta 98 de la ID. SEC. N°: 3). Después de clonar el casete sintético 2 de ADNc en los sitios *Bsu36I* y *BspEI* de un constructo de lubricina recombinante, el sitio de clonación *Bsu36I* del constructo original se destruye, dejando un único sitio de clonación *Bsu36I* en el nuevo constructo.

En esta forma de realización preferida, la secuencia de aminoácidos "APTTP**KEPAPTT**TKSAPTT**KEPAPTTTKEPAPTTTKEPAPTTTKEPAPTTT**" (ID. SEC. N°: 26; 45 aminoácidos) permanece como parte de cada proteína PRG4-LUB:N (donde N = un número entero de 1 o más). Además, la secuencia de aminoácidos "**KEPAPTTTKEPAPTTT**TKSAPTT**KEPAPTTT**" (ID. SEC. N°: 27; 31 aminoácidos) está codificada por el inserto de ADN que pasa a ser parte de cada constructo de ADNc de PRG4-Lub:N+1 mediante la adición de un casete sintético 2 de ADNc *Bsu36I/BspEI* a un constructo de ADNc PRG4-Lub:N. Para la proteína PRG4-LUB:N, donde N es un número entero mayor o igual a 3, la secuencia de aminoácidos "**EPAPTTTKSAPTT**KEPAPTTT****" (ID. SEC. N°: 28; 22 aminoácidos) une la ID. SEC. N°: 26 a (N menos 2) repeticiones de la ID. SEC. N°: 27 en las formas de realización preferidas. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos "KEPKAPTTT" (ID. SEC. N°: 29; 10 aminoácidos) muestra inmediatamente el último inserto de repetición de la ID. SEC. N°: 27 en las formas de realización preferidas de la proteína PRG4-LUB:N, donde N es un número entero mayor o igual a 2.

Debido a que forman al menos dos secuencias KEPAPTT, la ID. SEC. N°: 26, la ID. SEC. N°: 27 y la ID. SEC. N°: 28 se designan cada una en este documento como una "secuencia repetitiva de tipo KEPAPTT" (el N terminal de la ID. SEC. 28 se une a un residuo K, de forma que la ID. SEC. N°: 28 forma dos secuencias KEPAPTT en las proteínas PRG4-LUB:N).

Consecuentemente, para la proteína recombinante de lubricina PRG4-LUB:N (donde N es igual a un número entero de 1 o más), la proteína PRG4-LUB:N comprende la ID. SEC. N°: 26 en una forma de realización preferida. Adicionalmente, para la proteína recombinante de lubricina PRG4-LUB:N (donde N es igual a un número entero de 2 o más), la proteína PRG4-LUB:N también comprende la ID. SEC. N°: 27 en una forma de realización preferida. La ID. SEC. N°: 27 se repite (N menos 1) veces en cada proteína PRG4-LUB:N en estas formas de realización preferidas. En la PRG4-LUB:2, la ID. SEC. N°: 26 y la ID. SEC. N°: 27 se solapan (es decir, comparten una secuencia KEPAPTT).

En otras formas de realización preferidas donde N es un número entero mayor o igual a 3, la proteína recombinante de lubricina comprende los 22 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 28 que se unen a los 45 aminoácidos orientados N terminalmente de la ID. SEC. N°: 26 hasta (N menos 2) repetición(es) de los 31 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 27, donde los 10 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 29 están C terminal con respecto a la última repetición de 31 aminoácidos de la ID. SEC. N°: 27.

Tabla 3. Frecuencias de secuencia en las proteínas PRG4-LUB preferidas

Proteína PRG4-LUB	inserto N-terminal de la ID. SEC. Nº: 26	ID. SEC. Nº: 28 > - <	ID. SEC. Nº: 27 > - <	inserto C-terminal de la ID. SEC. Nº: 29	repeticiones KEPAPTT
-LUB:1	1	0	0	0	4
-LUB:2	1	0	1	1	6
-LUB:3	1	1	1	1	9
-LUB:4	1	1	2	1	12
-LUB:5	1	1	3	1	15
-LUB:N	1	1	N-2	1	3 x N

Las proteínas PRG4-LUB:N tienen en general (3 veces N) repeticiones de la secuencia KEPAPTT en las formas de realización preferidas, donde N es igual al número de secuencias repetitivas de tipo KEPAPTT. La lubricina recombinante PRG4-LUB:5 (con $3 \times N = 3 \times 5 = 15$ copias de la secuencia KEPAPTT en las formas de realización preferidas) es la mayor lubricina recombinante PRG4-LUB:N cuya secuencia se detalla en este documento.

Ejemplo 2: expresión y purificación de la proteína 'lub'

Se expresó el constructo de ADNc PRG4-Lub:1 (ID. SEC. Nº: 6; que contiene la secuencia del casete sintético 1 de ADNc) en una línea celular CHO DUKX preadaptativa transfectada de forma estable, purificada a partir de medio condicionado, y solubilizada en PBS que contiene clorhidrato de L-arginina 500 mM como sigue.

Se expresó el constructo de ADNc PRG4-Lub:1 en una línea celular CHO DUKX transfectada de forma estable y se recogió el medio condicionado. Se concentra un volumen de dos litros de este medio condicionado bajo gas nitrógeno comprimido (40 psi) usando una unidad de filtración AMICON® M2000™ dotada con una membrana de disco de 10 kDa de límite de peso nominal molecular (*nominal molecular weight limit*, NMWL), de 30 kDa de NMWL o de 100 kDa de NMWL PALL FILTRON® OMEGA™. El medio se concentró hasta aproximadamente un volumen de 100 ml, que se aspiró desde la membrana de disco. La membrana de disco se extrajo entonces de la unidad de filtración AMICON® M2000™. El retenido "mucinoso", que se había acumulado en la superficie de la membrana de disco, se recogió usando un raspador celular y se transfirió a tubos de microcentrífuga. Las muestras de los tubos de microcentrífuga se centrifugaron aproximadamente a $12.000 \times g$ durante 10 minutos, y se retiró el sobrenadante acuoso. Las pellas remanentes "enriquecidas en lubricina" se disolvieron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene clorhidrato de L-arginina 500 mM. La concentración de clorhidrato de L-arginina puede variar entre 100 mM y 2,0 M.

Usando el procedimiento anterior, se recogen las glucoproteínas PRG4-LUB:2 hasta PRG4-LUB:5 (y las proteínas PRG4-LUB:N, donde N = un número entero no negativo de 6 o más, así como otras glucoproteínas que contienen secuencias de tipo KEPAPTT), directamente desde las membranas de disco, es decir, sin purificar el concentrado remanente por encima de las membranas de disco. Esto es, estas glucoproteínas recombinantes de lubricina se aíslan directamente a partir de las membranas de disco de 10 kDa de NMWL, de 30 kDa de NMWL o de 100 kDa de NMWL de las unidades de filtración PALL FILTRON® OMEGA™. En algunos casos, estas glucoproteínas también pueden purificarse a partir del concentrado remanente por encima de las membranas de disco mediante técnicas cromatográficas o técnicas electroforéticas, o ambas. Las proteínas y glucoproteínas recombinantes de lubricina también pueden purificarse usando cromatografía y otras técnicas conocidas en la materia (como, por ejemplo, las descritas en el documento US6433142 para proteínas MSF; véase también: Deutscher, 1990; y Scopes, 1994).

Ejemplo 3: inmunohistoquímica

Se investigó adicionalmente la fuente celular de lubricina en articulaciones normales y artrósicas usando técnicas inmunohistoquímicas. Además, se examinó la presencia de lubricina en otras superficies tisulares, pleura, pericardio, peritoneo y meninges, según los siguientes procedimientos.

Se obtuvieron cartílago y membrana sinovial artrósicos mediante consentimiento informado de pacientes que experimentaron cirugía de sustitución de rodilla. Otros tejidos examinados fueron membrana sinovial, cartílago, pleura, pericardio, peritoneo, meninges, cerebro, tendón y ligamentos normales humanos y de primate no humano (*non-human primate*, NHP), y menisco, cartílago, membrana sinovial, ligamento y tendones normales y artrósicos caninos. Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4% inmediatamente después de su recogida o después de 24 horas de incubación en medio con y sin complemento de monensina (5 μ M). Para los estudios inmunohistoquímicos, los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas y se obtuvieron secciones en parafina de 6-8 micrómetros. Se congeló un subconjunto de tejidos en compuesto de congelación de tomografía de coherencia óptica (OCT) y se cortaron a intervalos de 5 a 10 micrómetros, seguido de fijación en acetona.

Los análisis inmunohistoquímicos e inmunofluorescentes utilizaron un anticuerpo policlonal purificado de conejo anti-lubricina humana (Ab 06A10) generado mediante inmunización con una forma truncada de lubricina recombinante y la purificación en una columna de proteína A. Se usó el anticuerpo CD 16 (NEOMARKERS®,

Fremont CA) para identificar macrófagos (receptor III de Fcy). Se usó el anticuerpo CD106/VCAM-1 (NEOMARKERS®) para marcar fibroblastos en secciones criostáticas. Para las secciones de control se usó consecutivamente una concentración equivalente de RIgG (VECTOR LABS™, CA), MIgG₁ (DAKO®) y MIgG_{2a} (DAKO®). Se usó el Sistema de Tecnología de Dextrano (ENVISION+™; DAKO®) para visualizar la unión del anticuerpo y las secciones se contratiñeron con alum-hematoxilina de Mayer. La inmunofluorescencia se realizó usando los anteriores anticuerpos primarios y se sondearon con anticuerpos secundarios de cabra (Alexa Dyes - MOLECULAR PROBES™, Oregon) con pigmento Alexa de cabra anti-ratón a 546 nm y pigmento Alexa de cabra anti-ratón a 488 nm. La unión fluorescente del anticuerpo se detectó con un microscopio fluorescente NIKON®.

La lubricina se detectó a lo largo de las superficies del cartílago y la membrana sinovial articular humanos normales y artrósicos. Una gruesa capa de lubricina recubría completamente la superficie artrósica fibrilada. La inmunofluorescencia con CD106 mostró una fuerte tinción de la membrana celular de los fibroblastos íntimos de la membrana sinovial; la proteína lubricina también se visualizó como una tinción en las células sinoviales. Una doble inmunotinción de CD106 + lubricina mostró claramente una colocalización en los fibroblastos íntimos de la membrana sinovial. La tinción de CD16 de los macrófagos sinoviales demuestra la presencia de estas células a lo largo de las capas de la membrana sinovial, pero no había colocalización con lubricina.

La tinción de tejidos articulares de NHP y caninos (normales y artrósicos) con el anticuerpo de lubricina mostró lubricina recubriendo la capa superficial de la membrana sinovial, el cartílago, el menisco y los tendones. El cartílago de NHP también mostró una fuerte inmunorreactividad no sólo en las células de la zona superficial sino también en las células de la zona de transición, sin la adición de monensina para aumentar las reservas intracelulares de glucoproteína. El revestimiento celular del peritoneo, el pericardio y la pleura también mostraron la expresión de lubricina, aunque no se observó inmunorreactividad en las meninges ni en el cerebro.

En resumen, la membrana sinovial, el tendón, el menisco y el cartílago tanto normales como artrósicos estaban recubiertos por una sustancial capa de lubricina. La glucoproteína está claramente presente en tejidos de articulaciones artrósicas. La doble tinción inmunofluorescente de membrana sinovial artrósica humana demostró que los sinoviocitos de los fibroblastos íntimos eran los responsables de la síntesis de lubricina.

La localización de la proteína lubricina fuera del tejido articular no se ha descrito previamente. Se mostró claramente una capa superficial de lubricina en la pleura pulmonar, el pericardio y el peritoneo. Se considera que la lubricina tiene una función lubricante en la articulación sinovial, pero puede tener múltiples funciones incluyendo, pero no limitándose a, la lubricación y funciones antiadhesivas en otros tejidos. La complementación de estos otros tejidos con lubricina es una bioterapia englobada en esta invención.

Ejemplo 4: lubricina recombinante como lubricante mecánico

La lubricina recombinante podría usarse generalmente como un lubricante, por ejemplo, con precintos y rodamientos y similares. Por ejemplo, el documento US3973781 titulado "Self-lubricating seal", el documento US4491331 titulado "Grooved mechanical face seal", el documento US4560174 titulado "Multi lip seal" y el documento US4973068 titulado "Differential surface roughness dynamic seals and bearings," describen cada uno precintos de diseños variables. La lubricina recombinante podría usarse como lubricante con estos precintos.

En particular, la lubricina recombinante puede usarse como lubricante de dispositivos médicos, prótesis e implantes, particularmente cuando se requiere un lubricante biocompatible. Además, las aplicaciones no tienen por qué ser médicas, pero podrían incluir aplicaciones en contextos medioambientalmente sensibles en los que puede ser deseable un lubricante biocompatible.

Ejemplo 5: composiciones de lubricina recombinante

Una lubricina recombinante de la presente invención puede usarse en una composición farmacéutica cuando se combina con un portador farmacéuticamente aceptable. Dicha composición también puede contener (además de la proteína y un portador) diluyentes, agentes de relleno, sales, tampones, estabilizantes, solubilizantes y otros materiales bien conocidos en la materia. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica del (los) principio(s) activo(s). Las características del portador dependerán de la vía de administración. La composición farmacéutica de la invención también puede contener citocinas, linfocinas u otros factores hematopoyéticos tales como M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, trombopoyetina, factor de células madre y eritropoyetina. La composición farmacéutica puede contener adicionalmente otros agentes que, bien mejoran la actividad de la proteína, o bien complementan su actividad o uso en el tratamiento. Dichos factores adicionales y/o agentes pueden incluirse en la composición farmacéutica para producir un efecto sinérgico con la proteína de la invención, o para minimizar efectos secundarios. Por el contrario, la proteína de la presente invención puede incluirse en formulaciones de la citocina, linfocina, otro factor hematopoyético, trombolítico o antitrombótico, o del agente antiinflamatorio en particular, para minimizar efectos secundarios.

El uso de la proteína lubricina recombinante para el complemento intraarticular en combinación con el previamente descrito hialuronano polimérico (HA) e hilanos de pesos moleculares mayores es particularmente preferido. Otras combinaciones preferidas para su uso en el complemento intraarticular incluyen el uso de la proteína lubricina

recombinante con anestésicos (por ejemplo, lidocaína), esteroides (por ejemplo, hexacetónido de triamcinolona) o radioisótopos (por ejemplo, itrio). Otras combinaciones preferidas para el uso de una complementación intraarticular pueden incluir preparaciones celulares autólogas (por ejemplo, de condrocitos, sinoviocitos cultivados, o células madre, derivadas tanto autóloga como heterológamente).

- 5 Una lubricina recombinante de la presente invención puede ser activa en multímeros (por ejemplo, heterodímeros u homodímeros) o en complejos consigo misma o con otras proteínas. Como resultado, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una proteína de la invención en dicha forma multimérica o complejada.

- 10 Una composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un complejo de la(s) proteína(s) recombinante(s) de lubricina de la presente invención junto con antígenos proteicos o peptídicos. El antígeno proteico y/o peptídico proporcionará una señal estimulante a los linfocitos B y T. Los linfocitos B responderán al antígeno a través de su receptor de inmunoglobulina superficial. Los linfocitos T responderán al antígeno a través del receptor celular T (TCR) tras la presentación del antígeno por parte de las proteínas del MHC. El MHC y las proteínas relacionadas estructuralmente, incluyendo aquellas codificadas por los genes del MHC de clase I y de clase II en células hospedadoras, servirán para presentar el (los) antígeno(s) peptídico(s) a los linfocitos T. Los componentes antigénicos también podrían suministrarse como complejos purificados de MHC-peptido solos o con moléculas coestimulantes que pueden señalar directamente a los linfocitos T. Alternativamente, pueden combinarse anticuerpos capaces de unirse a las inmunoglobulinas superficiales y a otras moléculas de los linfocitos B, así como anticuerpos capaces de unirse al TCR y a otras moléculas de los linfocitos T, con la composición farmacéutica de la invención.

- 20 Una composición farmacéutica de la invención puede estar en forma de un liposoma en el que la proteína de la presente invención se combina, además de con otros portadores farmacéuticamente aceptables, con agentes anfipáticos tales como lípidos que existen en forma de agregados tales como micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos o capas laminares en disolución acuosa. Los lípidos adecuados para la formulación liposómica incluyen, sin limitación, monoglicéridos, diglicéridos, sulfátidos, lisolecitina, fosfolípidos, saponina, ácidos biliares y similares. La preparación de dichas formulaciones liposómicas está en el nivel del experto en la materia, según se desvela, por ejemplo, en los documentos US4235871, US4501728, US4837028 y US4737323.

- 25 En la práctica del procedimiento de tratamiento o el uso de la presente invención, se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la presente invención a un sujeto (por ejemplo, un mamífero) con una dolencia que se debe tratar. La proteína de la presente invención puede administrarse según el procedimiento de la invención bien sola o bien en combinación con otras terapias tales como tratamientos que emplean citocinas, linfocinas, otros factores hematopoyéticos o complementos basados en células. Cuando se coadministra con una o más citocinas, linfocinas, otros factores hematopoyéticos o complementos basados en células, la proteína de la presente invención puede administrarse bien simultáneamente con la(s) citocina(s), linfocina(s), otro(s) factor(es) hematopoyético(s), factores trombolíticos o antitrombóticos o complementos basados en células, o secuencialmente. Sí se administra secuencialmente, el médico responsable decidirá la secuencia apropiada de administración de la proteína de la presente invención en combinación con la(s) citocina(s), linfocina(s), otro(s) factor(es) hematopoyético(s), factores trombolíticos o antitrombóticos o complementos basados en células.

- 30 La administración de la proteína de la presente invención usada en la composición farmacéutica o en la práctica del procedimiento de la presente invención puede llevarse a cabo de varias formas convencionales, tales como inyección cutánea, subcutánea, intraperitoneal, parenteral o intravenosa, o en algunos casos, mediante digestión oral, inhalación, aplicación tópica. Generalmente se prefiere la administración a un paciente mediante inyección en el tejido articular (Schumacher, 2003).

- 35 Cuando se administra por vía oral una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la presente invención, la proteína de la presente invención estará en forma de un comprimido, cápsula, polvo, disolución o elixir. Cuando se administra en forma de comprimido, la composición farmacéutica de la invención puede contener adicionalmente un portador sólido tal como gelatina o un coadyuvante. El comprimido, la cápsula y el polvo contienen desde aproximadamente el 5 hasta el 95% de la proteína de la presente invención, y preferiblemente desde aproximadamente el 25 hasta el 90% de la proteína de la presente invención. Cuando se administra en forma líquida, puede añadirse un portador líquido tal como agua, vaselina, aceites de origen animal o vegetal tal como aceite de cacahuete, aceite mineral, aceite de soja o aceite de sésamo, o aceites sintéticos. La forma líquida de la composición farmacéutica puede contener adicionalmente disolución salina fisiológica, dextrosa u otra disolución de sacáridos, o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Cuando se administra en forma líquida, la composición farmacéutica contiene desde aproximadamente el 0,5 hasta el 90% en peso de proteína de la presente invención, y preferiblemente desde aproximadamente el 1 hasta el 50% de proteína de la presente invención.

- 40 Cuando se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína de la presente invención mediante inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, la proteína de la presente invención está en forma de una disolución acuosa exenta de pirógenos parenteralmente aceptable. La preparación de dichas disoluciones de proteína parenteralmente aceptables, con la debida consideración al pH, la isotonicidad, la estabilidad y similares, está en la pericia de la materia. Una composición farmacéutica preferida para inyección intravenosa, cutánea o subcutánea

debería contener, además de la proteína de la presente invención, un vehículo isotónico tal como cloruro sódico para inyección, Ringer para inyección, dextrosa para inyección, dextrosa y cloruro sódico para inyección, Ringer-lactato para inyección u otro vehículo según se sabe en la materia. La composición farmacéutica de la presente invención también puede contener estabilizantes, conservantes, tampones, antioxidantes u otros aditivos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la inyección en asociación con, o en combinación con, lidocaína u otros anestésicos, esteroides o adrenocorticoides, HA y/o hilanos, o radioisótopos, están todas englobadas por la presente invención.

La cantidad de proteína de la presente invención en la composición farmacéutica de la presente invención dependerá de la naturaleza y la gravedad de la dolencia que se va a tratar, y de la naturaleza de los tratamientos anteriores a los que se ha sometido el paciente. Finalmente, el médico responsable decidirá la cantidad de proteína de la presente invención con la que tratar a cada paciente individual. Inicialmente, el médico responsable administrará dosis bajas de la proteína de la presente invención y observará la respuesta del paciente. Pueden administrarse dosis mayores de la proteína de la presente invención hasta que se obtiene el efecto terapéutico óptimo para el paciente, y en ese punto la dosis ya no se incrementa más. Se contempla que las diversas composiciones farmacéuticas usadas en la práctica del procedimiento de la presente invención deberían contener desde aproximadamente 0,01 mg hasta aproximadamente 100 mg (preferiblemente aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 10 mg, más preferiblemente aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 1 mg) de proteína de la presente invención por kg de peso corporal, dependiendo del procedimiento de administración y del tratamiento terapéutico exacto implementado.

Si se administra por vía intravenosa, la duración de la terapia intravenosa usando una composición farmacéutica que comprende la lubricina recombinante de la presente invención variará, dependiendo de la gravedad de la enfermedad que se va a tratar y del estado y de la potencial respuesta idiosincrática de cada paciente individual. Se contempla que la duración de cada aplicación de la proteína de la presente invención puede estar en el intervalo de 12 a 24 horas de administración intravenosa continua. Finalmente, el médico responsable decidirá la duración apropiada de la terapia intravenosa usando la composición farmacéutica de la presente invención.

Para las composiciones de la presente invención que son útiles para la terapia del hueso, cartílago tendón o ligamento, el procedimiento terapéutico incluirá administrar la composición por vía tópica, sistémica o local como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para su uso en esta invención está, por supuesto, exenta de pirógenos en una forma fisiológicamente aceptable. Además, la composición puede ser deseablemente encapsulada o inyectada en forma viscosa para administrarla en el sitio del hueso, cartílago o tejido dañado. La administración tópica puede ser adecuada en algunos contextos de curación de heridas y reparación de tejidos. Los agentes terapéuticamente útiles que también pueden incluirse opcionalmente en la composición según se describió anteriormente, pueden, alternativa o adicionalmente, administrarse simultánea o secuencialmente con la composición que comprende la proteína recombinante de lubricina de la invención en los procedimientos de la invención. Preferiblemente, la composición incluye una matriz capaz de suministrar la composición que contiene la proteína en el sitio del hueso y/o el cartílago dañados, posiblemente capaz de proporcionar una estructura para el desarrollo del hueso y del cartílago, y óptimamente capaz de ser resorbida en el cuerpo. Dichas matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

Si se usa una matriz, la elección del material de la matriz se basa en la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, las propiedades mecánicas, el aspecto cosmético y las propiedades de interfase. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Las potenciales matrices para las composiciones pueden ser sulfato cálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatito, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y polianhídridos biodegradables y químicamente definidos. Otros materiales potenciales son biodegradables y biológicamente bien definidos, tales como colágeno óseo o dérmico. Otras matrices adicionales están formadas por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras potenciales matrices no son biodegradables y están químicamente definidas, tales como hidroxiapatito sinterizado, biovidrio, aluminatos u otros materiales cerámicos. Las matrices pueden estar formadas por combinaciones de cualquiera de los tipos de materiales mencionados anteriormente, tales como ácido poliláctico e hidroxiapatito, o colágeno y fosfato tricálcico. Los biocerámicos pueden alterarse en su composición, tal como en calcio-aluminato-fosfato, y procesarse para alterar el tamaño de poro, el tamaño de partícula, la forma de partícula y la biodegradabilidad.

En composiciones adicionales, las proteínas de la invención pueden combinarse con otros agentes beneficiosos para el tratamiento del defecto, herida o tejido del hueso y/o del cartílago en cuestión. Estos agentes incluyen varios factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), los factores de crecimiento transformantes (TGF- α y TGF- β) y el factor de crecimiento insulinoide (IGF).

Las composiciones terapéuticas también son actualmente valiosas para aplicaciones veterinarias. Particularmente, animales domésticos tales como gatos y perros, animales de laboratorio tales como ratones y ratas, así como caballos, además de seres humanos, son particularmente sujetos o pacientes deseados para dicho tratamiento con proteínas recombinantes de lubricina de la presente invención.

El régimen de dosificación de una composición farmacéutica que contiene la proteína que se va a usar en la

- regeneración tisular será determinado por el médico responsable teniendo en consideración varios factores que modifican la acción de las proteínas, por ejemplo, la cantidad de peso tisular deseada que se va a formar, el sitio de la lesión, el estado del tejido lesionado, el tamaño de la herida, el tipo de tejido lesionado (por ejemplo, cartílago o tendón), la edad, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el momento de la administración y otros factores clínicos. La dosis puede variar según el tipo de matriz usada en la reconstitución y con la inclusión de otras proteínas en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tales como IGF I (factor de crecimiento insulinoide I), a la composición final, también puede afectar a la dosis. El progreso puede ser controlado mediante una evaluación periódica del crecimiento y/o la reparación tisular/ósea, por ejemplo, mediante rayos X, determinaciones histomorfométricas y marcaje con tetraciclina.
- 5 Los polinucleótidos de la presente invención también pueden usarse para la terapia génica. Dichos polinucleótidos pueden introducirse bien *in vivo* o bien *ex vivo* en células para su expresión en un sujeto (por ejemplo, un mamífero). Los polinucleótidos de la invención también pueden administrarse mediante otros procedimientos conocidos para la introducción de un ácido nucleico en una célula u organismo (incluyendo, sin limitación, en forma de vectores víricos o de ADN desnudo).
- 10 Las células también pueden cultivarse *ex vivo* en presencia de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención con objeto de proliferar o de producir un efecto deseado o una actividad en dichas células. Las células tratadas pueden introducirse entonces *in vivo* con propósitos terapéuticos.

Ejemplo 6: anticuerpos anti-lubricina

- La proteína recombinante de lubricina de la invención también puede usarse para inmunizar animales para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que reaccionan específicamente con la proteína, o en algunas formas de realización, sus homólogos naturales. Dichos anticuerpos pueden obtenerse usando bien la proteína recombinante de lubricina completa o bien fragmentos de la misma como un inmunógeno. Los péptidos inmunógenos pueden contener adicionalmente un residuo de cisteína en el carboxilo terminal, y están conjugados con un hapteno tal como hemocianina de lapa californiana (KLH). Los procedimientos para sintetizar dichos péptidos son conocidos en la materia (por ejemplo, como en Merrifield, 1963; y Krstenansky y col., 1987). Los anticuerpos monoclonales que se unen a la proteína recombinante de lubricina de la invención pueden ser útiles agentes diagnósticos para la inmunodetección de proteínas relacionadas. Los anticuerpos monoclonales neutralizantes que se unen a estas proteínas relacionadas también pueden ser terapéuticos útiles para ambos estados asociados con la lubricina o, en algunos casos, en el tratamiento de algunas formas de cáncer en las que puede estar implicada una expresión anormal de la lubricina (por ejemplo, en sinoviomias).
- 20 25 30

- Además de los anticuerpos que están dirigidos al núcleo polipeptídico de una proteína recombinante de lubricina, es deseable un anticuerpo dirigido a la porción de azúcar o a un complejo de glucoproteína de la proteína recombinante de lubricina. Con objeto de generar anticuerpos que se unen a la lubricina recombinante glucosilada (pero no a la forma desglucosilada), el inmunógeno es preferiblemente un glucopéptido, cuya secuencia de aminoácidos abarca una gran porción glucosilada de la lubricina recombinante, por ejemplo, una secuencia repetitiva de tipo KEPAPTT. También se usan como inmunógenos glucopéptidos más cortos, por ejemplo, de 8-15 aminoácidos de longitud, dentro de la misma región altamente glucosilada. Los procedimientos para generar anticuerpos contra biomoléculas altamente glucosiladas son conocidos en la materia (por ejemplo, según describen Schneerson y col., 1980).
- 35 40

Ejemplo 7: administración de lubricina recombinante

- Para la administración de la lubricina recombinante se usan procedimientos estándar. Para la administración intraarticular, la lubricina recombinante se suministra en la cavidad sinovial a una concentración en el intervalo de 20 - 500 µg/ml en un volumen de aproximadamente 0,1 - 2 ml por inyección. Por ejemplo, se inyecta 1 ml de una lubricina recombinante a una concentración de 200 - 300 µg/ml en la articulación de la rodilla usando una aguja fina (por ejemplo, de calibre 14 - 30, preferiblemente de 18 - 26). Las composiciones de la invención también son útiles para su administración por vía parenteral, tal como intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal y, en las formas de realización preferidas, en las superficies del peritoneo, el pericardio o la pleura.
- 40 45

- Una ubicación adecuada de la aguja es crítica para la eficacia de la proteína recombinante de lubricina que se administra mediante inyección en terapias articulares (Schumacher, 2003). La ubicación adecuada de la aguja puede facilitarse mediante el uso de tecnología de ultrasonidos. Las inyecciones con éxitos son más habituales tras haber realizado con éxito una aspiración de fluido. Se ha sugerido una metodología supralateral en la bolsa suprarrotuliana para proporcionar el acceso más fiable al espacio articular de la rodilla. Además de administrar la lubricina recombinante mediante inyección intraarticular, pueden administrarse los ácidos nucleicos que codifican para la lubricina recombinante (por ejemplo, en aplicaciones de terapia génica) en una cavidad sinovial mediante una inyección intraarticular.
- 50

- Para prevenir adhesiones quirúrgicas, las lubricinas recombinantes descritas en este documento se administran en forma de un gel, una espuma, una fibra o un textil. Una lubricina recombinante formulada de dicha forma se coloca sobre y entre las interfases tisulares lesionadas o expuestas con objeto de evitar la formación de adhesión entre las superficies yuxtapuestas. Para ser eficaz, el gel o la película deben permanecer en su sitio y evitar el contacto tisular
- 55

durante un tiempo lo suficientemente largo, de forma que cuando el gel finalmente se disperse y los tejidos entren en contacto, ya no tendrán tendencia a adherirse. La lubricina recombinante formulada para la inhibición o la prevención de la formación de adhesión (por ejemplo, en forma de una membrana, un textil, una espuma o un gel) se evalúa para la prevención de adhesiones postquirúrgicas en un modelo de abrasión cecal de rata (Goldberg y col., 1993).

Las composiciones se colocan alrededor de ciego de rata erosionado quirúrgicamente, y se comparan con controles no tratados (animales cuyos ciegos fueron erosionados pero que no recibieron ningún tratamiento). Una reducción en la cantidad de formación de adhesión en el modelo de rata en presencia de la formulación recombinante de lubricina comparada con la cantidad en ausencia de la formulación indica que la formulación es clínicamente eficaz para reducir la formación de adhesión tisular. Sin embargo, en los contextos en los que se desea una adhesión tisular (por ejemplo, cuando se desea la curación de fisuras del cartílago), es mejor evitar el uso de lubricina recombinante. Al proporcionar lubricación a las superficies del cartílago se deteriora la integración cartílago-cartílago (Schaefer y col., 2004).

Las lubricinas recombinantes también se usan para recubrir extremidades y articulaciones artificiales antes de su implantación en un mamífero. Por ejemplo, dichos dispositivos pueden sumergirse o bañarse en una disolución de lubricina recombinante, por ejemplo, siguiendo los procedimientos descritos en los documentos US5709020 o US5702456. Sin embargo, debería tenerse cuidado durante el uso *in vivo* de lubricina recombinante para proporcionar lubricación cerca de prótesis. Se ha informado de que hay asociada una notable regulación por incremento en la expresión del gen PRG4 (es decir, la expresión del gen MSF) con un aflojamiento de la prótesis; la lubricina podría alterar la fuerte interacción entre el hueso y la prótesis, y contribuir así a un aflojamiento de la prótesis (Morawietz y col., 2003).

Ejemplo 8: modelo de artrosis

Con objeto de evaluar la eficacia de la administración intraarticular de preparaciones de lubricina, se prepara un modelo murino de artrosis/erosión del cartílago. Para la inducción quirúrgica de la artrosis, los ratones se anestesiaron con 250 mg/kg de tribromoetanol intraperitoneal (SIGMA® Chemical), y se prepararon la rodillas para una cirugía aséptica. Se realiza una incisión longitudinal medial al ligamento rotuliano, se abre la cápsula articular y se identifica el ligamento meniscotibial (que ancla el menisco interno a la meseta tibial). En un subconjunto de animales no se realizan manipulaciones adicionales, y este grupo se considera con una operación simulada. En el grupo experimental, el ligamento meniscotibial interno se transecciona dando como resultado una desestabilización del menisco interno (DMM). En ambos animales, con operación simulada y con una DMM, se suturan próximamente la cápsula articular y la capa subcutánea por separado y la piel se cierra mediante la aplicación del adhesivo tisular NEXABAND® S/C (Abbott, North Chicago, IL). Se administra buprenorfina (BUPRENEX®; Reckitt & Coleman, Kingston-upon-Hull, UK) antes y después de la operación.

Las preparaciones de lubricina recombinante se administran mediante una inyección intraarticular usando una aguja de calibre 30. Se administran inyecciones de 5-10 microlitros por articulación de la rodilla una semana después de la cirugía. Opcionalmente se administran inyecciones adicionales sobre una base semanal. Los animales se sacrifican con dióxido de carbono 4 semanas después de la operación y 8 semanas después de la operación.

Con objeto de evaluar la progresión y la gravedad de la artrosis, se colocan articulaciones de rodilla intactas en paraformaldehído al 4% durante 24 horas, y después en EDTA/polivinilpirrolidona descalcificado durante cinco días. Las articulaciones se sumergen en parafina y se obtienen secciones frontales de 6 mm a través de la articulación completa. Los cortes se tiñen con verde de safranina O-fast y se clasifican en intervalos de 70 mm a través de la articulación usando una modificación de un sistema de clasificación semicuantitativo (Chambers y col., 2001) en el que "0" = cartílago normal; "0,5" = pérdida de safranina O sin cambios estructurales; "1" = superficie articular áspera y pequeñas fibrilaciones; "2" = fibrilación inferior hacia la capa inmediatamente por debajo de la capa superficial y alguna pérdida de la lámina superficial; "3" = leve (<20%); "5" = moderada (20-80%); y "6" = grave (>80%) pérdida de cartílago no calcificado. Las puntuaciones de "4" (erosión ósea) no son una característica de este modelo. Todos los cuadrantes de la articulación (meseta tibial interna, cóndilo femoral interno, meseta tibial lateral y cóndilo femoral lateral) se puntúan por separado. Se puntúa un mínimo de 12 niveles por parte de observadores a ciegas para cada articulación de rodilla. Las puntuaciones se expresan como la puntuación histológica máxima encontrada en cada articulación o la suma de las puntuaciones histológicas. La suma de las puntuaciones representa las puntuaciones aditivas para cada cuadrante de la articulación en cada sección histológica a lo largo de la articulación. Este procedimiento de análisis permite la valoración de la gravedad de las lesiones, así como del área superficial del cartílago afectado con lesiones de tipo artrósico (Glasson y col., 2004).

Referencias: (1) Chambers y col., 2001, *Arthritis Rheum.* 44: 1455-65; (2) Deutscher, 1990, *Methods in Enzymology*, Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press; (3) Espallargues y Pons, 2003, *Int'l J. Tech. Assess. Health Care* 19: 41-56; (4) Flannery y col., 1999, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 254: 535-41; (5) Glasson y col., 2004, *Arthritis Rheum.* 50: 2547-58; (6) Goldberg y col., 1993, en: *Gynecologic Surgery and Adhesion Prevention*, Wiley-Liss, págs. 191-204; (7) Hills, 2002, *J. Rheumatology* 29: 200-01; (8) Ikegawa y col., 2000, *Cytogenet. Cell Genet.* 90: 291-297; (9) Jay y col., 2001, *J. Orthopaedic Research* 19: 677-87; (10) Jay y col., 2002, *Glycoconjugate Journal* 18: 807-15; (11) Krstenansky y col., 1987, *FEBS Lett.* 211: 10-16; (12) Marcelino y col., 1999, *Nature Genetics* 23: 319-322; (13) Merberg y col., 1993, *Biology of Vitronectins and their Receptors*, Pressner y col. (eds.): Elsevier Science Publishers, págs. 45-53; (14) Merrifield, 1963, *J. Amer. Chem. Soc.* 85: 2149-54; (15) Morawietz y col.,

2003, Virchows Arch. 443: 57-66; (16) Rees y col., 2002, Matrix Biology 21: 593-602; (17) Schneerson y col., 1980, J. Exp. Med. 152: 361-76; (18) Scopes, 1994, Protein Purification: Principles and Practice (3rd edition), Springer Verlag; (19) Schaefer y col., 2004, Biorheology 41: 503 - 508; (20) Schumacher, 2003, Arthritis & Rheumatism 49: 413-20; (21) Tatusova y Madden, 1999, FEMS Microbiol Lett. 174: 247-50; (22) Wobig y col., 1998, Clin. Ther. 20: 410-23; y (23) Wobig y col., 1999, Clin. Ther. 21: 1549-62.

Listado de secuencias

110> Wyeth Flannery, Carl R
Corcoran, Christopher J
Freeman, Bethany A
Racie, Lisa A

<120> MOLÉCULAS RECOMBINANTES DE LUBRICINA Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 50657-01404WOPT

<160> 29

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 155
<212> ADN
<213>' Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos del casete sintético 1 de ADNc.

<400> 1

```
cgcgcccaca actcaaaaag agcccgccacc taccacgaca aagtcagctc ctactacgcc      60
caaagagcca gcgccgacga ctactaaaga accggcaccc accacgccta aggagccagc      120
tcctactaca acgaaaccgg caccaaccac tccgg                                     155
```

<210> 2
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Traducción de la ID. SEC. Nº: 1.

<400> 2

```
Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala
1              5              10              15

Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
                20              25              30

Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Pro Ala Pro
                35              40              45

Thr Thr Pro
50
```

<210> 3
<211> 125
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos del casete sintético 2 de ADNc.

<400> 3

```

taaagaacca gccctacta cgacaaagga gcctgcaccc acaaccacga agagcgcacc      60
cacaacacca aaggagccgg cccctacgac tcctaaggaa cccaaaccgg caccaaccac      120
tccgg                                             125

```

<210> 4

<211> 41

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Traducción de la ID. SEC. Nº: 3.

<400> 4

```

Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr
1          5          10          15
Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys
          20          25          30
Glu Pro Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro
          35          40

```

10

<210> 5

<211> 8049

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Vector pTmed2 que contiene el constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:1.

<400> 5

```

catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc gtaaggagaa aataccgcat caggcgtact      60
gagtcattag ggactttcca atgggttttg ccagtagcat aaggtaata ggggtgaatc      120
aacaggaaag tccattgga gccaagtaca ctgagtcaat agggactttc cattgggttt      180
tgcccagtac aaaagggtcaa tagggggtga gtcaatgggt ttttcccatt attggcacgt      240
acataagggtc aataggggtg agtcattggg tttttccagc caatttaatt aaaacgccat      300
gtactttccc accattgacg tcaatgggct attgaaacta atgcaacgtg acctttaaac      360
ggtactttcc catagctgat taatgggaaa gtaccgttct cgagccaata cacgtcaatg      420
ggaagtgaag gggcagccaa aacgtaacac cgccccggtt tttccctgga aattccatat      480
tggcacgcat tctattggct gagctgcgtt ctacgtgggt ataagaggcg cgaccagcgt      540

```

ES 2 388 970 T3

cggtagccg	gcagctctc	gtctgaccac	cgtagaacgc	agagctcctc	gctgcagccc	600
aagctctgtt	gggctcgcgg	ttgaggacaa	actcttcgcg	gtctttccag	tactcttgga	660
tcggaaaccc	gtcggcctcc	gaacggtact	ccgccaccga	gggacctgag	cgagtccgca	720
tcgaccggat	cggaaaacct	ctcgactgtt	ggggtgagta	ctccctctca	aaagcgggca	780
tgacttctgc	gctaagattg	tcagtttcca	aaaacgagga	ggatttgata	ttcacctggc	840
ccgcggtgat	gcctttgagg	gtggccgcgt	ccatctggtc	agaaaagaca	atctttttgt	900
tgtcaagctt	gaggtgtggc	aggcttgaga	tctggccata	cacttgagtg	acaatgacat	960
ccactttgcc	tttctctcca	caggtgtcca	ctcccaggtc	caactgcaga	cttcgaattc	1020
tactgagtcg	accacccatg	gcattggaaa	cacttcccat	ttacctgttg	ttgctgctgt	1080
ctgttttcgt	gattcagcaa	gtttcatctc	aagatttata	aagctgtgca	gggagatgtg	1140
gggaagggta	ttctagagat	gccacctgca	actgtgatta	taactgtcaa	cactacatgg	1200
agtgctgccc	tgatttcaag	agagtctgca	ctgcggagct	ttcctgtaaa	ggccgctgct	1260
ttgagtcctt	cgagagaggg	agggagtgtg	actgcgacgc	ccaatgtaag	aagtatgaca	1320
agtgctgtcc	cgattatgag	agtttctgtg	cagaagtgca	taatcccaca	tcaccacccat	1380
cttcaaagaa	agcacctcca	ccttcaggag	catctcaaac	catcaaatac	acaaccaaac	1440
gttcacccaa	accaccaaac	aagaagaaga	ctaagaaagt	tatagaatca	gaggaaataa	1500
cagaagaaca	ttctgtttct	gaaaatcaag	agtcctcctc	cagtagcagt	tcaagtagtt	1560
cgtcgtcgac	aatttggaag	atcaagtctt	ccaaaaattc	agctgctaata	agagaattac	1620
agaagaaaact	caaagtaaaa	gataacaaga	agaacagaac	taaaaagaaa	cctaccccca	1680
aaccaccagt	tgtagatgaa	gctggaagtg	gattggacaa	tggtgacttc	aaggtcacaa	1740
ctcctgacac	gtctaccacc	caacacaata	aagtcagcac	atctcccaag	atcacacag	1800
caaaaccaat	aatcccaga	cccagtcttc	cacctaatc	tgatacatct	aaagagacgt	1860
ctttgacagt	gaataaagag	acaacagttg	aaactaaaga	aactactaca	acaataaac	1920
agacttcaac	tgatggaaaa	gagaagacta	cttccgctaa	agagacacaa	agtatagaga	1980
aaacatctgc	taaagattta	gcacccacat	ctaaagtgtc	ggctaaacct	acacccaaag	2040
ctgaaactac	aaccaaaggc	cctgctctca	ccactcccaa	ggagcccacg	cccaccactc	2100
ccaaggagcc	tgcatctacc	acacccaaag	agcccacacc	taccaccatc	aagagcgcgc	2160
ccacaactcc	aaaagagccc	gcacctacca	cgacaaagtc	agctcctact	acgccc aaag	2220
agccagcgcc	gacgactact	aaagaaccgg	caccaccac	gcctaaggag	ccagctccta	2280
ctacaacgaa	accggcacca	accactccgg	aaacacctcc	tccaaccact	tcagaggtct	2340

ES 2 388 970 T3

ctactccaac taccaccaag gagcctacca ctatccacaa aagccctgat gaatcaactc	2400
ctgagctttc tgcagaaccc acacccaaaag ctcttgaaaa cagtcccaag gaacctgggtg	2460
tacctacaac taagacgccg gcggcgacta aacctgaaat gactacaaca gctaaagaca	2520
agacaacaga aagagactta cgtactacac ctgaaactac aactgctgca cctaagatga	2580
caaaagagac agcaactaca acagaaaaaa ctaccgaatc caaaataaca gctacaacca	2640
cacaagtaac atctaccaca actcaagata ccacaccatt caaaattact actcttaaaa	2700
caactactct tgcacccaaa gtaactacaa caaaaaagac aattactacc actgagatta	2760
tgaacaaacc tgaagaaaca gctaaaccaa aagacagagc tactaattct aaagcgacaa	2820
ctcctaaacc tcqaaagcca accaaagcac ccaaaaaacc cacttctacc aaaaagccaa	2880
aaacaatgcc tagagtgaga aaaccaaaga cgacaccaac tccccgcaag atgacatcaa	2940
caatgccaga attgaacctt acctcaagaa tagcagaagc catgctccaa accaccacca	3000
gacctaacca aactccaaac tccaaactag ttgaagtaaa tccaaagagt gaagatgcag	3060
gtggtgctga aggagaaaca cctcatatgc ttctcaggcc ccatgtgttc atgcctgaag	3120
ttactcccga catggattac ttaccgagag tacccaatca aggcatatc atcaatccca	3180
tgctttccga tgagaccaat atatgcaatg gtaagccagt agatggactg actactttgc	3240
gcaatgggac attagttgca ttccgaggtc attatttctg gatgctaagt ccattcagtc	3300
caccatctcc agctcgcaga attactgaag tttgggggat tccttcccc attgatactg	3360
tttttactag gtgcaactgt gaaggaaaaa cttttottctt taaggattct cagtactggc	3420
gttttaccaa tgatataaaa gatgcagggt accccaaacc aattttcaaa ggatttggag	3480
gactaactgg acaaatagtg gcagcgcttt caacagctaa atataagaac tggcctgaat	3540
ctgtgtatct tttcaagaga ggtggcagca ttcagcagta tatttataaa caggaacctg	3600
tacagaagtg ccctggaaga aggcctgctc taaattatcc agtgtatgga gaaatgacac	3660
aggttaggag acgtcgcttt gaacgtgcta taggaccttc tcaaacacac accatcagaa	3720
ttcaatattc acctgccaga ctggcttatc aagacaaagg tgtccttcac aatgaagtta	3780
aagtgagtat actgtggaga ggacttccaa atgtgggttac ctcagctata tcaactgcca	3840
acatcagaaa acctgacggc tatgattact atgccttttc taaagatcaa tactataaca	3900
ttgatgtgcc tagtagaaca gcaagagcaa ttactactcg ttctgggcag accttatcca	3960
aagtctggta caactgtcct taagcggccg ccgcaaattc taacgttact ggccgaagcc	4020
gcttgggaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt ttccaccata ttgccgtctt	4080

ES 2 388 970 T3

ttggcaatgt	gagggcccg	aaacctggcc	ctgtcttctt	gacgagcatt	cctagggggtc	4140
tttccctct	cgccaaagga	atgcaagggtc	tgttgaatgt	cgtgaaggaa	gcagttcctc	4200
tggaagcttc	ttgaagacaa	acaacgtctg	tagcgaccct	ttgcaggcag	cggaaccccc	4260
cacctggcga	caggtgcctc	tgcggccaaa	agccacgtgt	ataagataca	cctgcaaagg	4320
cggcacaacc	ccagtgccac	gttgtgagtt	ggatagttgt	ggaaagagtc	aaatggctct	4380
cctcaagcgt	attcaacaag	gggctgaagg	atgccagaa	ggtaccccat	tgtatgggat	4440
ctgatctggg	gcctcgggtc	acatgcttta	catgtgttta	gtcgagggtta	aaaaacgtct	4500
aggcccccg	aaccacgggg	acgtggtttt	cctttgaaaa	acacgattgc	tcgagccatc	4560
atggttcgac	cattgaactg	catcgtcgcc	gtgtcccaa	atatggggat	tggcaagaac	4620
ggagacctac	cctggcctcc	gctcaggaac	gagttcaagt	acttccaaag	aatgaccaca	4680
acctcttcag	tggaaggtaa	acagaatctg	gtgattatgg	gtaggaaaac	ctggttctcc	4740
attcctgaga	agaatcgacc	tttaaaggac	agaattaata	tagttctcag	tagagaactc	4800
aaagaaccac	cacgaggagc	tcattttctt	gccaaaagtt	tggatgatgc	cttaagactt	4860
attgaacaac	cggaattggc	aagtaaagta	gacatggttt	ggatagtcgg	aggcagttct	4920
gtttaccagg	aagccatgaa	tcaaccaggc	cacctcagac	tctttgtgac	aaggatcatg	4980
caggaatttg	aaagtgacac	gtttttccca	gaaattgatt	tggggaaata	taaacttctc	5040
ccagaatacc	caggcgtcct	ctctgaggtc	caggaggaaa	aaggcatcaa	gtataagttt	5100
gaagtctacg	agaagaaaga	ctaacaggaa	gatgctttca	agttctctgc	tcccctccta	5160
aagctatgca	ttttttataa	gaccatggga	cttttgctgg	cttttagatca	taatcagcca	5220
taccacattt	gtagagggtt	tacttgcttt	aaaaaacctc	ccacacctcc	ccctgaacct	5280
gaaacataaa	atgaatgcaa	ttgttggtgt	taacttggtt	attgcagctt	ataatgggtta	5340
caaataaagc	aatagcatca	caaatttcac	aaataaagca	tttttttcac	tgcattctag	5400
ttgtggtttg	tccaaactca	tcaatgtatc	ttatcatgtc	tggatccccg	gccaacggtc	5460
tggtgaccgg	gctgogagag	ctcgggtgtac	ctgagacgcg	agtaagccct	tgagtcaaag	5520
acgtagtcgt	tgcaagtccg	caccagggtac	tgatcatoga	tgctagaccg	tgcaaaagga	5580
gagcctgtaa	gogggcactc	ttccgtgggtc	tggtggataa	attcgcaagg	gtatcatggc	5640
ggacgaccgg	ggttcgaacc	ccggatccgg	ccgtccgcgg	tgatccatcc	ggttaccgcc	5700
cgcgtgtcga	accaggtgt	gcgacgtcag	acaacggggg	agcgtctcct	ttggcttcct	5760
tccaggcgcg	goggtgtgtg	cgctagcttt	tttggcgagc	tcgaattaat	tctgcattaa	5820
tgaatcggcc	aacgcgcggg	gagaggcggt	ttgcgtattg	ggcgtctctc	cgcttcctcg	5880

ES 2 388 970 T3

ctcactgact cgctgcgctc ggctggttcgg ctgcgggcgag cggatatcagc tcaactcaaag 5940
gcggttaatac ggttatccac agaatacagg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa 6000
ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc 6060
cgccccctg acgagcatca caaaaatcga cgctcaagtc agagggtggcg aaacccgaca 6120
ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc tcgtgcgctc tectgttccg 6180
accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct 6240
caatgctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt 6300
gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tcgtcttgag 6360
tccaaccogg taagacacga cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc 6420
agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac 6480
actagaagga cagtatttgg tatctgcgct ctgctgaagc cagttacctt cgaaaaaaga 6540
gttggttagct cttgatccgg caaacaacc accgctggta gcggtggtt ttttgttgc 6600
aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg 6660
gggtctgacg ctcagtgga cgaaaactca cgtaagga ttttggtcat gagattatca 6720
aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt 6780
atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca 6840
gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gctgactcc ccgtcgtgta gataactacg 6900
atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca 6960
ccggtccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgg 7020
cctgcaactt tatccgcctc catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt 7080
agttcgccag ttaatagttt gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca 7140
cgctcgctgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca 7200
tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcgggt agctccttcg gtctccgat cgttgtcaga 7260
agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact 7320
gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga 7380
gaatagtgtg tgccggcgacc gagttgctct tgcccgcgct caatacggga taataccg 7440
ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc 7500
tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt tcgatgtaac ccaactcgtgc acccaactga 7560
tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat 7620

ES 2 388 970 T3

gccgcaaaaa agggaataag ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact cttccttttt 7680
 caatattatt gaagcattta tcaggggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt 7740
 atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac 7800
 gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa ataggcgtat cagcaggccc 7860
 tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggg gaaaacctct gacacatgca gctcccggag 7920
 acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgta 7980
 gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg 8040
 agagtgcac 8049

<210> 6

<211> 2946

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:1.

<400> 6

atggcatgga aaacacttcc catttacctg ttgttgcctg tgtctgtttt cgtgattcag 60
 caagtttcat ctcaagattt atcaagctgt gcaggagat gtggggaagg gtattctaga 120
 gatgccacct gcaactgtga ttataactgt caacactaca tggagtgcct ccctgatttc 180
 aagagagtct gcaactgcga gctttcctgt aaaggccgct gctttgagtc cttogagaga 240
 gggagggagt gtgactgcga cgcccaatgt aagaagtatg acaagtgcctg tcccgattat 300
 gagagtttct gtgcagaagt gcataatccc acatcaccac catcttcaaa gaaagcacct 360
 ccaccttcag gagcatctca aaccatcaaa tcaacaacca aacgttcacc caaaccacca 420
 aacaagaaga agactaagaa agttatagaa tcagaggaaa taacagaaga acattctggt 480
 tctgaaaatc aagagtcctc ctccagtagc agttcaagta gttcgtcgtc gacaatttgg 540
 aaaatcaagt cttccaaaaa ttcagctgct aatagagaat tacagaagaa actcaaagta 600
 aaagataaca agaagaacag aactaaaaag aaacctaccc ccaaaccacc agttgtagat 660
 gaagctggaa gtggattgga caatggtgac ttcaagggtca caactcctga cagctctacc 720
 acccaacaca ataaagtcag cacatctccc aagatcacia cagcaaaacc aataaatccc 780
 agaccagtc ttccacctaa ttctgataca tctaaagaga cgtctttgac agtgaataaa 840
 gagacaacag ttgaaactaa agaaactact acaacaaata aacagacttc aactgatgga 900
 aaagagaaga ctacttccgc taaagagaca caaagtatag agaaaacatc tgctaaagat 960
 ttagcaccca catctaaagt gctggctaaa cctacacca aagctgaaac tacaacaaaa 1020

ES 2 388 970 T3

ggccctgctc tcaccactcc caaggagccc acgcccacca ctcccaagga gcctgcatct 1080
 accacaccca aagagcccac acctaccacc atcaagagcg cgcccacaac tccaaaagag 1140
 cccgcaccta ccacgacaaa gtcagctcct actacgcccc aagagccagc gccgacgact 1200
 actaaagaac cggcaccacac cacgcctaag gagccagctc ctactacaac gaaaccggca 1260
 ccaaccactc cggaacacacc tcttccaacc acttcagagg tctctactcc aactaccacc 1320
 aaggagccta ccactatcca caaaagccct gatgaatcaa ctctgagct ttctgcagaa 1380
 cccacaccaa aagctcttga aaacagtccc aaggaacctg gtgtacctac aactaagacg 1440
 ccggcggcga ctaaacctga aatgactaca acagctaaag acaagacaac agaaagagac 1500
 ttacgtacta cacctgaaac tacaactgct gcacctaga tgacaaaaga gacagcaact 1560
 acaacagaaa aaactaccga atccaaaata acagctacaa ccacacaagt aacatctacc 1620
 acaactcaag ataccacacc attcāaaatt actactctta aaacaactac tcttgcaccc 1680
 aaagtaacta caacaaaaaa gacaattact accactgaga ttatgaacaa acctgaagaa 1740
 acagctaaac caaaagacag agctactaat tctaaagcga caactcctaa acctcaaaag 1800
 ccaaccaaag caccāaaaa acccacttct accāaaaagc cāaaaacaat gcctagagtg 1860
 agāaaaacca agacgacacc aactccccgc aagatgacat caacaatgcc agaattgaac 1920
 cctacctcaa gaatagcaga agccatgctc caaacacca ccagacctaa ccaactcca 1980
 aactccaaac tagttgaagt aaatccaaag agtgaagatg caggtggtgc tgaaggagaa 2040
 acacctcata tgcttctcag gcccctgtg ttcatgcctg aagtactcc cgacatggat 2100
 tacttacga gagtaccāaa tcaaggcatt atcatcaatc ccatgcttcc cgatgagacc 2160
 aatatatgca atggtaagcc agtagatgga ctgactactt tgcgcaatgg gacattagtt 2220
 gcattccgag gtcattatct ctggatgcta agtccattca gtccaccatc tccagctcgc 2280
 agaattactg aagtttgggg tattccttcc cccattgata ctgtttttac taggtgcaac 2340
 tgtgaaggaa aaactttctt cttaaaggat tctcagtact ggcgttttac caatgatata 2400
 aaagatgcag ggtacccāaa accaattttc aaaggatttg gaggactaac tggacāaata 2460
 gtggcagcgc tttcaacagc taaatataag aactggcctg aatctgtgta ttttttcaag 2520
 agaggtggca gcattcagca gtatatttat aaacaggaac ctgtacagaa gtgccctgga 2580
 agaaggcctg ctctāaatta tccagtgtat ggagāaatga cacagggttag gagacgtcgc 2640
 tttgaacgtg ctataggacc ttctcāaaca cacaccatca gaattcaata ttcacctgcc 2700
 agactggctt atcaagacaa aggtgtcctt cataatgaag ttaaagtgag tatactgtgg 2760

```

agaggacttc caaatgtggt tacctcagct atatcactgc ccaacatcag aaaacctgac 2820
ggctatgatt actatgcctt ttctaaagat caatactata acattgatgt gcctagtaga 2880
acagcaagag caattactac tcgttctggg cagaccttat ccaaagtctg gtacaactgt 2940
ccttaa 2946

```

<210> 7

<211> 981

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4-LUB:1 completa.

<400> 7

```

Met Ala Trp Lys Thr Leu Pro Ile Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Ser Val
1          5          10          15

Phe Val Ile Gln Gln Val Ser Ser Gln Asp Leu Ser Ser Cys Ala Gly
          20          25          30

Arg Cys Gly Glu Gly Tyr Ser Arg Asp Ala Thr Cys Asn Cys Asp Tyr
          35          40          45

Asn Cys Gln His Tyr Met Glu Cys Cys Pro Asp Phe Lys Arg Val Cys
          50          55          60

Thr Ala Glu Leu Ser Cys Lys Gly Arg Cys Phe Glu Ser Phe Glu Arg
65          70          75          80

Gly Arg Glu Cys Asp Cys Asp Ala Gln Cys Lys Lys Tyr Asp Lys Cys
          85          90          95

Cys Pro Asp Tyr Glu Ser Phe Cys Ala Glu Val His Asn Pro Thr Ser
          100          105          110

Pro Pro Ser Ser Lys Lys Ala Pro Pro Pro Ser Gly Ala Ser Gln Thr
          115          120          125

Ile Lys Ser Thr Thr Lys Arg Ser Pro Lys Pro Pro Asn Lys Lys Lys
130          135          140

Thr Lys Lys Val Ile Glu Ser Glu Glu Ile Thr Glu Glu His Ser Val
145          150          155          160

Ser Glu Asn Gln Glu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
          165          170          175

Ser Thr Ile Trp Lys Ile Lys Ser Ser Lys Asn Ser Ala Ala Asn Arg
          180          185          190

Glu Leu Gln Lys Lys Leu Lys Val Lys Asp Asn Lys Lys Asn Arg Thr
          195          200          205

Lys Lys Lys Pro Thr Pro Lys Pro Pro Val Val Asp Glu Ala Gly Ser

```


ES 2 388 970 T3

210		215		220
Gly 225	Leu	Asp	Asn	Gly 230
				Asp 235
				Thr 240
Thr 245	Gln	His	Asn	Lys 250
				Val 255
				Thr 260
				Pro 265
				Asn 270
				Ser 275
				Thr 280
				Val 285
				Glu 290
				Thr 295
				Asp 300
				Gly 305
				Lys 310
				Thr 315
				Ala 320
				Lys 325
				Ala 330
				Glu 335
				Thr 340
				Pro 345
				Lys 350
				Glu 355
				Pro 360
				Thr 365
				Pro 370
				Lys 375
				Glu 380
				Pro 385
				Ala 390
				Thr 395
				Thr 400
				Pro 405
				Lys 410
				Glu 415
				Pro 420
				Thr 425
				Pro 430
				Thr 435
				Ile 440
				His 445
				Lys 450
				Pro 455
				Glu 460
				Ala 465
				Thr 470
				Val 475
				Pro 480
				Thr 485
				Asp 490
				Lys 495
				Thr 500
				Ala 505
				Pro 510
				Thr 515
				Glu 520
				Lys 525
				Thr 530
				Ser 535

ES 2 388 970 T3

Lys Ile Thr Ala Thr Thr Thr Gln Val Thr Ser Thr Thr Thr Gln Asp
 530 535 540
 Thr Thr Pro Phe Lys Ile Thr Thr Leu Lys Thr Thr Thr Leu Ala Pro
 545 550 555 560
 Lys Val Thr Thr Thr Lys Lys Thr Ile Thr Thr Thr Glu Ile Met Asn
 565 570 575
 Lys Pro Glu Glu Thr Ala Lys Pro Lys Asp Arg Ala Thr Asn Ser Lys
 580 585 590
 Ala Thr Thr Pro Lys Pro Gln Lys Pro Thr Lys Ala Pro Lys Lys Pro
 595 600 605
 Thr Ser Thr Lys Lys Pro Lys Thr Met Pro Arg Val Arg Lys Pro Lys
 610 615 620
 Thr Thr Pro Thr Pro Arg Lys Met Thr Ser Thr Met Pro Glu Leu Asn
 625 630 635 640
 Pro Thr Ser Arg Ile Ala Glu Ala Met Leu Gln Thr Thr Thr Arg Pro
 645 650 655
 Asn Gln Thr Pro Asn Ser Lys Leu Val Glu Val Asn Pro Lys Ser Glu
 660 665 670
 Asp Ala Gly Gly Ala Glu Gly Glu Thr Pro His Met Leu Leu Arg Pro
 675 680 685
 His Val Phe Met Pro Glu Val Thr Pro Asp Met Asp Tyr Leu Pro Arg
 690 695 700
 Val Pro Asn Gln Gly Ile Ile Ile Asn Pro Met Leu Ser Asp Glu Thr
 705 710 715 720
 Asn Ile Cys Asn Gly Lys Pro Val Asp Gly Leu Thr Thr Leu Arg Asn
 725 730 735
 Gly Thr Leu Val Ala Phe Arg Gly His Tyr Phe Trp Met Leu Ser Pro
 740 745 750
 Phe Ser Pro Pro Ser Pro Ala Arg Arg Ile Thr Glu Val Trp Gly Ile
 755 760 765
 Pro Ser Pro Ile Asp Thr Val Phe Thr Arg Cys Asn Cys Glu Gly Lys
 770 775 780
 Thr Phe Phe Phe Lys Asp Ser Gln Tyr Trp Arg Phe Thr Asn Asp Ile
 785 790 795 800
 Lys Asp Ala Gly Tyr Pro Lys Pro Ile Phe Lys Gly Phe Gly Gly Leu
 805 810 815
 Thr Gly Gln Ile Val Ala Ala Leu Ser Thr Ala Lys Tyr Lys Asn Trp
 820 825 830
 Pro Glu Ser Val Tyr Phe Phe Lys Arg Gly Gly Ser Ile Gln Gln Tyr
 835 840 845

ES 2 388 970 T3

Ile Tyr Lys Gln Glu Pro Val Gln Lys Cys Pro Gly Arg Arg Pro Ala
850 855 860

Leu Asn Tyr Pro Val Tyr Gly Glu Met Thr Gln Val Arg Arg Arg Arg
865 870 875 880

Phe Glu Arg Ala Ile Gly Pro Ser Gln Thr His Thr Ile Arg Ile Gln
885 890 895

Tyr Ser Pro Ala Arg Leu Ala Tyr Gln Asp Lys Gly Val Leu His Asn
900 905 910

Glu Val Lys Val Ser Ile Leu Trp Arg Gly Leu Pro Asn Val Val Thr
915 920 925

Ser Ala Ile Ser Leu Pro Asn Ile Arg Lys Pro Asp Gly Tyr Asp Tyr
930 935 940

Tyr Ala Phe Ser Lys Asp Gln Tyr Tyr Asn Ile Asp Val Pro Ser Arg
945 950 955 960

Thr Ala Arg Ala Ile Thr Thr Arg Ser Gly Gln Thr Leu Ser Lys Val
965 970 975

Trp Tyr Asn Cys Pro
980

<210> 8
<211> 157
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Inserto de ADN Lub:1 del casete sintético 1 de ADNc.

<400> 8

gcgcgccac aactccaaaa gagccgcac ctaccacgac aaagtcagct cctactacgc 60

ccaaagagcc agcgccgacg actactaaag aaccggcacc caccacgcct aaggagccag 120

ctcctactac aacgaaaccg gcaccaacca ctccgga 157

10 <210> 9
<211> 51
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
15 <223> 51 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:1 (4 secuencias KEPAPTT entre S373 y E425 de la ID. SEC. Nº: 7).

<400> 9

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala
1 5 10 15

ES 2 388 970 T3

Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
 20 25 30
 Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Pro Ala Pro
 35 40 45
 Thr Thr Pro
 50

<210> 10
 <211> 3024
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:2.
 <400> 10

atggcatgga aaacacttcc catttacctg ttgttgctgc tgtctgtttt cgtgattcag	60
caagtttcat ctcaagattt atcaagctgt gcagggagat gtggggaagg gtattctaga	120
gatgccacct gcaactgtga ttataactgt caacactaca tggagtgtctg ccctgatttc	180
aagagagtct gcactgcgga gctttcctgt aaaggccgct gctttgagtc cttcgagaga	240
gggagggagt gtgactgcga cgcccaatgt aagaagtatg acaagtgtctg tcccgattat	300
gagagtttct gtgcagaagt gcataatccc acatcaccac catcttcaaa gaaagcacct	360
ccaccttcag gagcatctca aaccatcaaa tcaacaacca aacgttcacc caaaccacca	420
aacaagaaga agactaagaa agttatagaa tcagaggaaa taacagaaga acattctgtt	480
tctgaaaatc aagagtcctc ctccagtagc agttcaagta gttcgtcgtc gacaatttgg	540
aaaatcaagt cttccaaaaa ttcagctgct aatagagaat tacagaagaa actcaaagta	600
aaagataaca agaagaacag aactaaaaag aaacctaccc ccaaaccacc agttgtagat	660
gaagctggaa gtggattgga caatgggtgac ttcaagggtca caactcctga cacgtctacc	720
acccaacaca ataaagtcag cacatctccc aagatcacia cagcaaaacc aataaatccc	780
agaccagtc ttccacctaa ttctgatata tctaaagaga cgtctttgac agtgaataaa	840
gagacaacag ttgaaactaa agaaactact acaacaaata aacagacttc aactgatgga	900
aaagagaaga ctacttccgc taaagagaca caaagtatag agaaaacatc tgctaaagat	960
ttagcacca catctaaagt gctggctaaa cctacacca aagctgaaac tacaacaaaa	1020
ggccctgctc tcaccactcc caaggagccc acgcccacca ctccaagga gcctgcattc	1080
accacacca aagagcccac acctaccacc atcaagagcg cgcccacaac tccaaaagag	1140
cccgcaccta ccacgacaaa gtcagctcct actacgccc aagagccagc gccgacgact	1200

ES 2 388 970 T3

actaaagaac	cggcaccac	cacgcctaaa	gaaccagccc	ctactacgac	aaaggagcct	1260
gcacccacaa	ccacgaagag	cgcaccacaca	acaccaaagg	agccggcccc	tacgactcct	1320
aaggaaccca	aaccggcacc	aaccactccg	gaaacacctc	ctccaaccac	ttcagaggtc	1380
tctactccaa	ctaccaccaa	ggagcctacc	actatccaca	aaagccctga	tgaatcaact	1440
cctgagcttt	ctgcagaacc	cacaccaaaa	gctcttgaaa	acagtcccaa	ggaacctggt	1500
gtacctacaa	ctaagacgcc	ggcggcgact	aaacctgaaa	tgactacaac	agctaaagac	1560
aagacaacag	aaagagactt	acgtactaca	cctgaaacta	caactgctgc	acctaagatg	1620
acaaaagaga	cagcaactac	aacagaaaaa	actaccgaat	ccaaaataac	agctacaacc	1680
acacaagtaa	catctaccac	aactcaagat	accacaccat	tcaaaattac	tactcttaaa	1740
acaactactc	ttgcacccaa	agtaactaca	acaaaaaaga	caattactac	cactgagatt	1800
atgaacaaac	ctgaagaaac	agctaaacca	aaagacagag	ctactaattc	taaagcgaca	1860
actcctaaac	ctcaaaagcc	aaccaaagca	cccaaaaaac	ccacttctac	caaaaagcca	1920
aaaacaatgc	ctagagtgcg	aaaaccaaa	acgacaccaa	ctccccgcaa	gatgacatca	1980
acaatgccag	aattgaaccc	tacctcaaga	atagcagaag	ccatgctcca	aaccaccacc	2040
agacctaacc	aaactccaaa	ctccaaacta	gttgaagtaa	atccaaagag	tgaagatgca	2100
ggtggtgctg	aaggagaaac	acctcatatg	cttctcaggc	cccatgtgtt	catgcctgaa	2160
gttactcccg	acatggatta	cttaccgaga	gtacccaatc	aaggcattat	catcaatccc	2220
atgctttccg	atgagaccaa	tatatgcaat	ggtaagccag	tagatggact	gactactttg	2280
cgcaatggga	cattagttgc	attccgaggt	cattatctct	ggatgctaag	tccattcagt	2340
ccaccatctc	cagctcgag	aattactgaa	gtttggggta	ttccttcccc	cattgatact	2400
gtttttacta	ggtgcaactg	tgaaggaaaa	actttcttct	ttaaggattc	tcagtactgg	2460
cgttttacca	atgatataaa	agatgcaggg	taccccaaac	caattttcaa	aggatttgga	2520
ggactaactg	gacaaatagt	ggcagcgctt	tcaacagcta	aatataagaa	ctggcctgaa	2580
tctgtgtatt	ttttcaagag	aggtggcagc	attcagcagt	atatttataa	acaggaacct	2640
gtacagaagt	gccctggaag	aaggcctgct	ctaaattatc	cagtgtatgg	agaaatgaca	2700
caggttagga	gacgtcgctt	tgaacgtgct	ataggacctt	ctcaaacaca	caccatcaga	2760
attcaatatt	cacctgccag	actggcttat	caagacaaag	gtgtccttca	taatgaagtt	2820
aaagtgagta	tactgtggag	aggacttcca	aatgtggtta	cctcagctat	atcaactgcc	2880
aacatcagaa	aacctgacgg	ctatgattac	tatgcctttt	ctaaagatca	atactataac	2940
attgatgtgc	ctagtagaac	agcaagagca	attactactc	gttctgggca	gaccttatcc	3000

aaagtctggg acaactgtcc ttaa

3024

<210> 11

<211> 1007

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4-LUB:2 completa.

<400> 11

Met	Ala	Trp	Lys	Thr	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	1	5	10	15
Phe	Val	Ile	Gln	Gln	Val	Ser	Ser	Gln	Asp	Leu	Ser	Ser	Cys	Ala	Gly	20	25	30	
Arg	Cys	Gly	Glu	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asp	Ala	Thr	Cys	Asn	Cys	Asp	Tyr	35	40	45	
Asn	Cys	Gln	His	Tyr	Met	Glu	Cys	Cys	Pro	Asp	Phe	Lys	Arg	Val	Cys	50	55	60	
Thr	Ala	Glu	Leu	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Ser	Phe	Glu	Arg	65	70	75	80
Gly	Arg	Glu	Cys	Asp	Cys	Asp	Ala	Gln	Cys	Lys	Lys	Tyr	Asp	Lys	Cys	85	90	95	
Cys	Pro	Asp	Tyr	Glu	Ser	Phe	Cys	Ala	Glu	Val	His	Asn	Pro	Thr	Ser	100	105	110	
Pro	Pro	Ser	Ser	Lys	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Gln	Thr	115	120	125	
Ile	Lys	Ser	Thr	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Lys	Pro	Pro	Asn	Lys	Lys	Lys	130	135	140	
Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Glu	Ser	Glu	Glu	Ile	Thr	Glu	Glu	His	Ser	Val	145	150	155	160
Ser	Glu	Asn	Gln	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Ile	Trp	Lys	Ile	Lys	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ala	Ala	Asn	Arg	180	185	190	
Glu	Leu	Gln	Lys	Lys	Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Asn	Lys	Lys	Asn	Arg	Thr	195	200	205	
Lys	Lys	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Val	Val	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser	210	215	220	
Gly	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Thr	Ser	Thr	225	230	235	240

ES 2 388 970 T3

Thr	Gln	His	Asn	Lys	Val	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Ile	Thr	Thr	Ala	Lys	
				245					250					255		
Pro	Ile	Asn	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Ser	Asp	Thr	Ser	Lys	
			260					265					270			
Glu	Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Thr	Val	Glu	Thr	Lys	Glu	
		275					280					285				
Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Lys	Gln	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Lys	Glu	Lys	Thr	
	290					295					300					
Thr	Ser	Ala	Lys	Glu	Thr	Gln	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ser	Ala	Lys	Asp	
305					310					315					320	
Leu	Ala	Pro	Thr	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Ala	Glu	
				325					330					335		
Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Thr	Pro	
			340					345					350			
Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Thr	Pro	
		355					360					365				
Thr	Thr	Ile	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	
	370					375					380					
Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	
385					390					395					400	
Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	
				405					410					415		
Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	
			420					425					430			
Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	
	435						440					445				
Thr	Pro	Glu	Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	
	450					455					460					
Thr	Thr	Lys	Glu	Pro	Thr	Thr	Ile	His	Lys	Ser	Pro	Asp	Glu	Ser	Thr	
465					470				475					480		
Pro	Glu	Leu	Ser	Ala	Glu	Pro	Thr	Pro	Lys	Ala	Leu	Glu	Asn	Ser	Pro	
				485					490					495		
Lys	Glu	Pro	Gly	Val	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Pro	Ala	Ala	Thr	Lys	Pro	
			500					505					510			
Glu	Met	Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Asp	Lys	Thr	Thr	Glu	Arg	Asp	Leu	Arg	
	515						520					525				
Thr	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Pro	Lys	Met	Thr	Lys	Glu	Thr	
	530					535					540					
Ala	Thr	Thr	Thr	Glu	Lys	Thr	Thr	Glu	Ser	Lys	Ile	Thr	Ala	Thr	Thr	
545					550					555					560	

ES 2 388 970 T3

Thr	Gln	Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Gln	Asp	Thr	Thr	Pro	Phe	Lys	Ile
				565					570					575	
Thr	Thr	Leu	Lys	Thr	Thr	Thr	Leu	Ala	Pro	Lys	Val	Thr	Thr	Thr	Lys
			580					585						590	
Lys	Thr	Ile	Thr	Thr	Thr	Glu	Ile	Met	Asn	Lys	Pro	Glu	Glu	Thr	Ala
		595					600					605			
Lys	Pro	Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Asn	Ser	Lys	Ala	Thr	Thr	Pro	Lys	Pro
	610					615					620				
Gln	Lys	Pro	Thr	Lys	Ala	Pro	Lys	Lys	Pro	Thr	Ser	Thr	Lys	Lys	Pro
625					630					635					640
Lys	Thr	Met	Pro	Arg	Val	Arg	Lys	Pro	Lys	Thr	Thr	Pro	Thr	Pro	Arg
				645					650					655	
Lys	Met	Thr	Ser	Thr	Met	Pro	Glu	Leu	Asn	Pro	Thr	Ser	Arg	Ile	Ala
			660					665					670		
Glu	Ala	Met	Leu	Gln	Thr	Thr	Thr	Arg	Pro	Asn	Gln	Thr	Pro	Asn	Ser
		675					680					685			
Lys	Leu	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Lys	Ser	Glu	Asp	Ala	Gly	Gly	Ala	Glu
	690					695					700				
Gly	Glu	Thr	Pro	His	Met	Leu	Leu	Arg	Pro	His	Val	Phe	Met	Pro	Glu
705					710					715					720
Val	Thr	Pro	Asp	Met	Asp	Tyr	Leu	Pro	Arg	Val	Pro	Asn	Gln	Gly	Ile
				725					730					735	
Ile	Ile	Asn	Pro	Met	Leu	Ser	Asp	Glu	Thr	Asn	Ile	Cys	Asn	Gly	Lys
			740					745					750		
Pro	Val	Asp	Gly	Leu	Thr	Thr	Leu	Arg	Asn	Gly	Thr	Leu	Val	Ala	Phe
		755					760					765			
Arg	Gly	His	Tyr	Phe	Trp	Met	Leu	Ser	Pro	Phe	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro
	770					775					780				
Ala	Arg	Arg	Ile	Thr	Glu	Val	Trp	Gly	Ile	Pro	Ser	Pro	Ile	Asp	Thr
785					790					795					800
Val	Phe	Thr	Arg	Cys	Asn	Cys	Glu	Gly	Lys	Thr	Phe	Phe	Phe	Lys	Asp
				805					810					815	
Ser	Gln	Tyr	Trp	Arg	Phe	Thr	Asn	Asp	Ile	Lys	Asp	Ala	Gly	Tyr	Pro
			820					825					830		
Lys	Pro	Ile	Phe	Lys	Gly	Phe	Gly	Gly	Leu	Thr	Gly	Gln	Ile	Val	Ala
		835					840					845			
Ala	Leu	Ser	Thr	Ala	Lys	Tyr	Lys	Asn	Trp	Pro	Glu	Ser	Val	Tyr	Phe
	850					855					860				
Phe	Lys	Arg	Gly	Gly	Ser	Ile	Gln	Gln	Tyr	Ile	Tyr	Lys	Gln	Glu	Pro

865		870		875		880
Val Gln Lys Cys Pro Gly Arg Arg Pro Ala Leu Asn Tyr Pro Val Tyr						
	885			890		895
Gly Glu Met Thr Gln Val Arg Arg Arg Arg Phe Glu Arg Ala Ile Gly						
	900			905		910
Pro Ser Gln Thr His Thr Ile Arg Ile Gln Tyr Ser Pro Ala Arg Leu						
	915			920		925
Ala Tyr Gln Asp Lys Gly Val Leu His Asn Glu Val Lys Val Ser Ile						
	930			935		940
Leu Trp Arg Gly Leu Pro Asn Val Val Thr Ser Ala Ile Ser Leu Pro						
	945			950		955
Asn Ile Arg Lys Pro Asp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Ala Phe Ser Lys Asp						
	965			970		975
Gln Tyr Tyr Asn Ile Asp Val Pro Ser Arg Thr Ala Arg Ala Ile Thr						
	980			985		990
Thr Arg Ser Gly Gln Thr Leu Ser Lys Val Trp Tyr Asn Cys Pro						
	995			1000		1005

<210> 12

<211> 235

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Inserto de ADN Lub:2 del casete sintético 1 de ADNc y una secuencia del casete sintético 2 de ADNc.

<400> 12

gcgcgcccac aactcctaaa gagcccgac ctaccacgac aaagtcagct cctactacgc	60
ccaaagagcc agcgccgacg actactaaag aaccggcacc caccacgcct aaagaaccag	120
cccctactac gacaaaggag cctgcaccca caaccacgaa gagcgacccc acaacaccaa	180
aggagccggc ccctacgact cctaaggaac ccaaaccggc accaaccact ccgga	235

10 <210> 13

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> 77 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:2 (6 secuencias KEPAPTT entre S373 y E451 de la ID. SEC. Nº: 11).

<400> 13

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala
1 5 10 15

ES 2 388 970 T3

Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
 20 25 30
 Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
 35 40 45
 Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro
 50 55 60
 Thr Thr Pro Lys Glu Pro Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro
 65 70 75

<210> 14
 <211> 3117
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:3.
 <400> 14

atggcatgga aaacacttcc catttacctg ttgttgctgc tgtctgtttt cgtgattcag	60
caagtttcat ctcaagattt atcaagctgt gcaggagat gtggggaagg gtattctaga	120
gatgccacct gcaactgtga ttataactgt caacactaca tggagtgtcg cctgatttc	180
aagagagtct gcaactgcga gctttcctgt aaaggccgct gctttgagtc cttcgagaga	240
gggagggagt gtgactgcga cgcccaatgt aagaagtatg acaagtgtcg tcccgattat	300
gagagtttct gtgcagaagt gcataatccc acatcaccac catcttcaaa gaaagcacct	360
ccaccttcag gagcatctca aaccatcaaa tcaacaacca aacgttcacc caaaccacca	420
aacaagaaga agactaagaa agttatagaa tcagaggaaa taacagaaga acattctgtt	480
tctgaaaatc aagagtcctc ctccagtagc agttcaagta gttcgtcgtc gacaatttgg	540
aaaatcaagt cttccaaaaa ttcagctgct aatagagaat tacagaagaa actcaaagta	600
aaagataaca agaagaacag aactaaaaag aaacctaccc ccaaaccacc agttgtagat	660
gaagctggaa gtggattgga caatggtgac ttcaaggta caactcctga cacgtctacc	720
acccaacaca ataaagtcag cacatctccc aagatcaca cagcaaaacc aataaatccc	780
agaccagtc ttccacctaa ttctgatata tctaaagaga cgtctttgac agtgaataaa	840
gagacaacag ttgaaactaa agaaactact acaacaaata aacagacttc aactgatgga	900
aaagagaaga ctacttccgc taaagagaca caaagtatag agaaaacatc tgctaaagat	960
ttagcaccga catctaaagt gctggctaaa cctacacca aagctgaaac tacaacaaa	1020
ggcctgctc tcaccactcc caaggagccc acgcccacca ctccaagga gcctgcatct	1080

ES 2 388 970 T3

accacacca	aagagccac	acctaccacc	atcaagagcg	cgcccacaac	tccaaaagag	1140
cccgcaccta	ccacgacaaa	gtcagctcct	actacgcca	aagagccagc	gccgacgact	1200
actaaagaac	cggcacccac	cagcctaata	gaaccagccc	ctactacgac	aaaggagcct	1260
gcaccacaaa	ccacgaagag	cgcacccaca	acaccaaagg	agccggcccc	tacgactcct	1320
aaagaaccag	cccctactac	gacaaaggag	cctgcaccca	caaccacgaa	gagcgcaccc	1380
acaacaccaa	aggagccggc	ccctacgact	cctaaggaac	ccaaaccggc	accaaccact	1440
ccggaaacac	ctcctccaac	cacttcagag	gtctctactc	caactaccac	caaggagcct	1500
accactatcc	acaaaagccc	tgatgaatca	actcctgagc	tttctgcaga	accacacca	1560
aaagctcttg	aaaacagtcc	caaggaacct	gggtgtaccta	caactaagac	gccggcggcg	1620
actaaacctg	aaatgactac	aacagctaaa	gacaagacaa	cagaaagaga	cttacgtact	1680
acacctgaaa	ctacaactgc	tgacctaag	atgacaaaag	agacagcaac	tacaacagaa	1740
aaaactaccg	aatccaaaat	aacagctaca	accacacaag	taacatctac	cacaactcaa	1800
gataccacac	cattcaaaat	tactactctt	aaaacaacta	ctcttgacc	caaagtaact	1860
acaacaaaaa	agacaattac	taccactgag	attatgaaca	aacctgaaga	aacagctaaa	1920
ccaaaagaca	gagctactaa	ttctaaagcg	acaactccta	aacctcaaaa	gccaaacaaa	1980
gcacccaaaa	aaccacttc	tacaaaaaag	ccaaaaacaa	tgcttagagt	gagaaaacca	2040
aagacgacac	caactccccg	caagatgaca	tcaacaatgc	cagaattgaa	ccctacctca	2100
agaatagcag	aagccatgct	ccaaaccacc	accagacct	accaaactcc	aaactccaaa	2160
ctagttgaag	taaatccaaa	gagtgaagat	gcaggtgggtg	ctgaaggaga	aacacctcat	2220
atgcttctca	ggcccatgt	gttcatgcct	gaagttactc	ccgacatgga	ttacttaccg	2280
agagtaccca	atcaaggcat	tatcatcaat	cccatgcttt	ccgatgagac	caatatatgc	2340
aatggtaagc	cagtagatgg	actgactact	ttgcgcaatg	ggacattagt	tgcatctcca	2400
ggtcattatt	tctggatgct	aagtccattc	agtccaccat	ctccagctcg	cagaattact	2460
gaagtttggg	gtattccttc	ccccattgat	actgttttta	ctaggtgcaa	ctgtgaagga	2520
aaaactttct	tctttaagga	ttctcagtac	tggcgtttta	ccaatgatat	aaaagatgca	2580
gggtacccca	aaccaatttt	caaaggattt	ggaggactaa	ctggacaaat	agtggcagcg	2640
ctttcaacag	ctaaatataa	gaactggcct	gaatctgtgt	atTTTTTcaa	gagaggtggc	2700
agcattcagc	agtatatTTa	taaacaggaa	cctgtacaga	agtgccctgg	aagaaggcct	2760
gctctaaatt	atccagtgt	tggagaaatg	acacagggt	ggagacgtcg	ctttgaacgt	2820
gctataggac	cttctcaaac	acacaccatc	agaattcaat	attcacctgc	cagactggct	2880

ES 2 388 970 T3

tatcaagaca aaggtgtcct tcataatgaa gttaaagtga gtatactgtg gagaggactt 2940
 ccaaagtggg ttacotcagc tatatcactg cccaacatca gaaaacctga eggctatgat 3000
 tactatgcct tttctaaaga tcaatactat aacattgatg tgcctagtag aacagcaaga 3060
 gcaattacta ctcgttctgg gcagacctta tccaaagtct ggtacaactg tccttaa 3117

<210> 15

<211> 1038

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4-LUB:3 completa

<400> 15

Met	Ala	Trp	Lys	Thr	Leu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	1	5	10	15
Phe	Val	Ile	Gln	Gln	Val	Ser	Ser	Gln	Asp	Leu	Ser	Ser	Cys	Ala	Gly	20	25	30	
Arg	Cys	Gly	Glu	Gly	Tyr	Ser	Arg	Asp	Ala	Thr	Cys	Asn	Cys	Asp	Tyr	35	40	45	
Asn	Cys	Gln	His	Tyr	Met	Glu	Cys	Cys	Pro	Asp	Phe	Lys	Arg	Val	Cys	50	55	60	
Thr	Ala	Glu	Leu	Ser	Cys	Lys	Gly	Arg	Cys	Phe	Glu	Ser	Phe	Glu	Arg	65	70	75	80
Gly	Arg	Glu	Cys	Asp	Cys	Asp	Ala	Gln	Cys	Lys	Lys	Tyr	Asp	Lys	Cys	85	90	95	
Cys	Pro	Asp	Tyr	Glu	Ser	Phe	Cys	Ala	Glu	Val	His	Asn	Pro	Thr	Ser	100	105	110	
Pro	Pro	Ser	Ser	Lys	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Gln	Thr	115	120	125	
Ile	Lys	Ser	Thr	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Lys	Pro	Pro	Asn	Lys	Lys	Lys	130	135	140	
Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Glu	Ser	Glu	Glu	Ile	Thr	Glu	Glu	His	Ser	Val	145	150	155	160
Ser	Glu	Asn	Gln	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	165	170	175	
Ser	Thr	Ile	Trp	Lys	Ile	Lys	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ala	Ala	Asn	Arg	180	185	190	
Glu	Leu	Gln	Lys	Lys	Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Asn	Lys	Lys	Asn	Arg	Thr	195	200	205	

ES 2 388 970 T3

Lys	Lys	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Val	Val	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser		
	210					215					220						
Gly	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Thr	Ser	Thr		
225					230					235					240		
Thr	Gln	His	Asn	Lys	Val	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Ile	Thr	Thr	Ala	Lys		
				245					250					255			
Pro	Ile	Asn	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Ser	Asp	Thr	Ser	Lys		
			260					265					270				
Glu	Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Thr	Val	Glu	Thr	Lys	Glu		
	275						280					285					
Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Lys	Gln	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Lys	Glu	Lys	Thr		
	290					295					300						
Thr	Ser	Ala	Lys	Glu	Thr	Gln	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ser	Ala	Lys	Asp		
305					310					315					320		
Leu	Ala	Pro	Thr	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Ala	Glu		
				325					330					335			
Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Thr	Pro		
			340					345					350				
Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Thr	Pro		
		355					360					365					
Thr	Thr	Ile	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr		
	370					375					380						
Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr		
385					390					395					400		
Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr		
				405					410					415			
Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro		
			420					425				430					
Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr		
	435						440					445					
Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys		
	450					455					460						
Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr		
465					470					475					480		
Pro	Glu	Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr		
				485					490					495			
Thr	Lys	Glu	Pro	Thr	Thr	Ile	His	Lys	Ser	Pro	Asp	Glu	Ser	Thr	Pro		
			500					505				510					
Glu	Leu	Ser	Ala	Glu	Pro	Thr	Pro	Lys	Ala	Leu	Glu	Asn	Ser	Pro	Lys		
	515						520					525					

ES 2 388 970 T3

Glu Pro Gly Val Pro Thr Thr Lys Thr Pro Ala Ala Thr Lys Pro Glu
 530 535 540
 Met Thr Thr Thr Ala Lys Asp Lys Thr Thr Glu Arg Asp Leu Arg Thr
 545 550 555 560
 Thr Pro Glu Thr Thr Thr Ala Ala Pro Lys Met Thr Lys Glu Thr Ala
 565 570 575
 Thr Thr Thr Glu Lys Thr Thr Glu Ser Lys Ile Thr Ala Thr Thr Thr
 580 585 590
 Gln Val Thr Ser Thr Thr Thr Gln Asp Thr Thr Pro Phe Lys Ile Thr
 595 600 605
 Thr Leu Lys Thr Thr Thr Leu Ala Pro Lys Val Thr Thr Thr Lys Lys
 610 615 620
 Thr Ile Thr Thr Thr Glu Ile Met Asn Lys Pro Glu Glu Thr Ala Lys
 625 630 635 640
 Pro Lys Asp Arg Ala Thr Asn Ser Lys Ala Thr Thr Pro Lys Pro Gln
 645 650 655
 Lys Pro Thr Lys Ala Pro Lys Lys Pro Thr Ser Thr Lys Lys Pro Lys
 660 665 670
 Thr Met Pro Arg Val Arg Lys Pro Lys Thr Thr Pro Thr Pro Arg Lys
 675 680 685
 Met Thr Ser Thr Met Pro Glu Leu Asn Pro Thr Ser Arg Ile Ala Glu
 690 695 700
 Ala Met Leu Gln Thr Thr Thr Arg Pro Asn Gln Thr Pro Asn Ser Lys
 705 710 715 720
 Leu Val Glu Val Asn Pro Lys Ser Glu Asp Ala Gly Gly Ala Glu Gly
 725 730 735
 Glu Thr Pro His Met Leu Leu Arg Pro His Val Phe Met Pro Glu Val
 740 745 750
 Thr Pro Asp Met Asp Tyr Leu Pro Arg Val Pro Asn Gln Gly Ile Ile
 755 760 765
 Ile Asn Pro Met Leu Ser Asp Glu Thr Asn Ile Cys Asn Gly Lys Pro
 770 775 780
 Val Asp Gly Leu Thr Thr Leu Arg Asn Gly Thr Leu Val Ala Phe Arg
 785 790 795 800
 Gly His Tyr Phe Trp Met Leu Ser Pro Phe Ser Pro Pro Ser Pro Ala
 805 810 815
 Arg Arg Ile Thr Glu Val Trp Gly Ile Pro Ser Pro Ile Asp Thr Val
 820 825 830
 Phe Thr Arg Cys Asn Cys Glu Gly Lys Thr Phe Phe Phe Lys Asp Ser

ES 2 388 970 T3

835	840	845
Gln Tyr Trp Arg Phe Thr Asn Asp Ile Lys Asp Ala Gly Tyr Pro Lys 850 855 860		
Pro Ile Phe Lys Gly Phe Gly Gly Leu Thr Gly Gln Ile Val Ala Ala 865 870 875 880		
Leu Ser Thr Ala Lys Tyr Lys Asn Trp Pro Glu Ser Val Tyr Phe Phe 885 890 895		
Lys Arg Gly Gly Ser Ile Gln Gln Tyr Ile Tyr Lys Gln Glu Pro Val 900 905 910		
Gln Lys Cys Pro Gly Arg Arg Pro Ala Leu Asn Tyr Pro Val Tyr Gly 915 920 925		
Glu Met Thr Gln Val Arg Arg Arg Arg Phe Glu Arg Ala Ile Gly Pro 930 935 940		
Ser Gln Thr His Thr Ile Arg Ile Gln Tyr Ser Pro Ala Arg Leu Ala 945 950 955 960		
Tyr Gln Asp Lys Gly Val Leu His Asn Glu Val Lys Val Ser Ile Leu 965 970 975		
Trp Arg Gly Leu Pro Asn Val Val Thr Ser Ala Ile Ser Leu Pro Asn 980 985 990		
Ile Arg Lys Pro Asp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Ala Phe Ser Lys Asp Gln 995 1000 1005		
Tyr Tyr Asn Ile Asp Val Pro Ser Arg Thr Ala Arg Ala Ile Thr 1010 1015 1020		
Thr Arg Ser Gly Gln Thr Leu Ser Lys Val Trp Tyr Asn Cys Pro 1025 1030 1035		

<210> 16

<211> 328

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Inserto de ADN Lub:3 del casete 1 sintético de ADNc y dos secuencias del casete sintético 2 de ADNc.

<400> 16

gcgcgcccac aactccaaaa gagcccgcac ctaccacgac aaagtcagct cctactacgc	60
ccaaagagcc agcgcgcgacg actactaaag aaccggcacc caccacgcct aaagaaccag	120
cccctactac gacaaaggag cctgcaccca caaccacgaa gagcgcaccc acaacaccaa	180
aggagccggc ccctacgact cctaaagaac cagcccctac tacgacaaag gagcctgcac	240
ccacaaccac gaagagcgca ccacaacac caaaggagcc ggcccctacg actcctaagg	300
aaccctaaacc ggcaccaacc actccgga	328

<210> 17
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

- 5 <220>
 <223> 108 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:3 (9 secuencias KEPAPTT entre S373 y E482 de la ID. SEC. Nº: 15)
 <400> 17

Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	
1				5					10					15		
Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	
			20					25					30			
Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	
			35				40					45				
Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	
			50			55					60					
Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	
			65			70				75					80	
Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	
				85					90					95		
Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro					
			100					105								

- 10 <210> 18
 <211> 3210
 <212> ADN
 <213> Artificial

- <220>
 15 <223> Constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:4.

<400> 18

atggcatgga aaacacttcc catttacctg ttgttgctgc tgtctgtttt cgtgattcag	60
caagtttcat ctcaagattt atcaagctgt gcaggagat gtggggaagg gtattctaga	120
gatgccacct gcaactgtga ttataactgt caacactaca tggagtgtctg ccctgatttc	180
aagagagtct gcaactgcga gctttcctgt aaaggccgct gctttgagtc cttcgagaga	240
gggagggagt gtgactgcga cgccaatgt aagaagtatg acaagtgtctg tcccgattat	300
gagagtttct gtgcagaagt gcataatccc acatcaccac catcttcaaa gaaagcacct	360
ccaccttcag gagcatctca aaccatcaaa tcaacaacca aacgttcacc caaaccacca	420

ES 2 388 970 T3

aacaagaaga agactaagaa agttatagaa tcagaggaaa taacagaaga acattctgtt	480
tctgaaaatc aagagtcctc ctccagtagc agttcaagta gttcgtcgtc gacaatttgg	540
aaaatcaagt cttccaaaaa ttcagctgct aatagagaat tacagaagaa actcaaagta	600
aaagataaca agaagaacag aactaaaaag aaacctaccc ccaaccacc agttgtagat	660
gaagctggaa gtggattgga caatggtgac ttcaagggtca caactcctga caggtctacc	720
acccaacaca ataaagtcag cacatctccc aagatcacaa cagcaaaacc aataaatccc	780
agaccagtc ttccacctaa ttctgatata tctaaagaga cgtctttgac agtgaataaa	840
gagacaacag ttgaaactaa agaaactact acaacaaata aacagacttc aactgatgga	900
aaagagaaga ctacttccgc taaagagaca caaagtatag agaaaacatc tgctaaagat	960
ttagcaccca catctaaagt gctggctaaa cctacacca aagctgaaac tacaaccaa	1020
ggccctgctc tcaccactcc caaggagccc acgcccacca ctccaagga gcctgcatct	1080
accacacca aagagcccac acctaccacc atcaagagcg cgcccacaac tccaaaagag	1140
cccgcaccta ccacgacaaa gtcagctcct actacgcca aagagccagc gccgacgact	1200
actaaagaac cggcacccac cagcctaaa gaaccagccc ctactacgac aaaggagcct	1260
gcaccacaaa ccacgaagag cgcaccaca acaccaaagg agccggcccc tacgactcct	1320
aaagaaccag cccctactac gacaaaggag cctgcacca caaccacgaa gagcgacccc	1380
acaacaccaa aggagccggc ccctacgact cctaaagaac cagcccctac tacgacaaag	1440
gagcctgcac ccacaaccac gaagagcgca cccacaacac caaaggagcc ggccctacg	1500
actcctaagg aacccaaacc ggcaccaacc actccggaaa cacctcctcc aaccatttca	1560
gaggtctcta ctccaactac caccaaggag cctaccacta tccacaaaag ccctgatgaa	1620
tcaactcctg agctttctgc agaaccacaa ccaaaagctc ttgaaaacag tccaaggaa	1680
cctggtgtac ctacaactaa gacgcccggc gcgactaaac ctgaaatgac tacaacagct	1740
aaagacaaga caacagaaag agacttacgt actacacctg aaactacaac tgctgcacct	1800
aagatgacaa aagagacagc aactacaaca gaaaaacta ccgaatcaa aataacagct	1860
acaaccacac aagtaacatc taccacaact caagatacca caccattcaa aattactact	1920
cttaaaacaa ctactcttgc acccaaagta actacaacaa aaaagacaat tactaccact	1980
gagattatga acaaacctga agaaacagct aaacccaaaag acagagctac taattctaaa	2040
gcgacaactc ctaaacctca aaagccaacc aaagcaccca aaaaaccac ttctaccaa	2100
aagccaaaaa caatgcctag agtgagaaaa ccaagacga caccaactcc ccgcaagatg	2160
acatcaacaa tgccagaatt gaacctacc tcaagaatag cagaagccat gtcctaaacc	2220

accaccagac ctaaccaaac tccaaactcc aaactagttg aagtaaattcc aaagagtga 2280
gatgcaggtg gtgctgaagg agaaacacct catatgcttc tcaggcccca tgtgttcacg 2340
cctgaagtta ctcccgacat ggattactta ccgagagtac ccaatcaagg cattatcatc 2400
aatcccatgc tttccgatga gaccaatata tgcaatggta agccagtaga tggactgact 2460
actttgcgca atgggacatt agttgcattc cgaggtcatt atttctggat gctaagtcca 2520
ttcagtcacac catctccagc tcgcagaatt actgaagttt ggggtattcc ttccccatt 2580
gatactgttt ttactaggtg caactgtgaa ggaaaaactt tcttctttaa ggattctcag 2640
tactggcggtt ttaccaatga tataaaagat gcaggggtacc ccaaaccaat tttcaaagga 2700
tttggaggac taactggaca aatagtggca gcgctttcaa cagctaaata taagaactgg 2760
cctgaatctg tgtatTTTTT caagagaggt ggcagcattc agcagtatat ttataaacag 2820
gaacctgtac agaagtgcc tggaagaagg cctgctctaa attatccagt gtatggagaa 2880
atgacacagg ttaggagacg tcgctttgaa cgtgctatag gaccttctca aacacacacc 2940
atcagaattc aatattcacc tgccagactg gcttatcaag acaaagggtgt ccttcataat 3000
gaagttaaag tgagtatact gtggagagga cttccaaatg tggttacctc agctatatca 3060
ctgcccaaca tcagaaaacc tgacggctat gattactatg ccttttctaa agatcaatac 3120
tataacattg atgtgcctag tagaacagca agagcaatta ctactcgttc tgggcagacc 3180
ttatccaaag tctggtacaa ctgtccttaa 3210

<210> 19

<211> 1069

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4-LUB:4 completa.

<400> 19

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

ES 2 388 970 T3

65					70						75				80
Gly	Arg	Glu	Cys	Asp	Cys	Asp	Ala	Gln	Cys	Lys	Lys	Tyr	Asp	Lys	Cys
				85					90					95	
Cys	Pro	Asp	Tyr	Glu	Ser	Phe	Cys	Ala	Glu	Val	His	Asn	Pro	Thr	Ser
			100					105					110		
Pro	Pro	Ser	Ser	Lys	Lys	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Gln	Thr
		115					120					125			
Ile	Lys	Ser	Thr	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Lys	Pro	Pro	Asn	Lys	Lys	Lys
130						135					140				
Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Glu	Ser	Glu	Glu	Ile	Thr	Glu	Glu	His	Ser	Val
145					150					155					160
Ser	Glu	Asn	Gln	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser
				165					170					175	
Ser	Thr	Ile	Trp	Lys	Ile	Lys	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ala	Ala	Asn	Arg
			180					185					190		
Glu	Leu	Gln	Lys	Lys	Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Asn	Lys	Lys	Asn	Arg	Thr
		195					200					205			
Lys	Lys	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Val	Val	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser
	210					215					220				
Gly	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Thr	Ser	Thr
225					230					235					240
Thr	Gln	His	Asn	Lys	Val	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Ile	Thr	Thr	Ala	Lys
				245					250					255	
Pro	Ile	Asn	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Ser	Asp	Thr	Ser	Lys
			260					265					270		
Glu	Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Thr	Val	Glu	Thr	Lys	Glu
		275					280					285			
Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Lys	Gln	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Lys	Glu	Lys	Thr
	290					295					300				
Thr	Ser	Ala	Lys	Glu	Thr	Gln	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ser	Ala	Lys	Asp
305					310					315					320
Leu	Ala	Pro	Thr	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Ala	Glu
				325					330					335	
Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Thr	Pro
			340					345					350		
Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Thr	Pro
		355					360					365			
Thr	Thr	Ile	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr
	370					375					380				

ES 2 388 970 T3

Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	
385					390					395						400
Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	
				405					410					415		
Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	
			420					425					430			
Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	
		435					440					445				
Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	
	450						455				460					
Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	
465					470					475					480	
Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	
				485				490						495		
Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	
			500					505					510			
Glu	Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Glu	Val	Ser	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr	
		515					520					525				
Lys	Glu	Pro	Thr	Thr	Ile	His	Lys	Ser	Pro	Asp	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	
	530					535					540					
Leu	Ser	Ala	Glu	Pro	Thr	Pro	Lys	Ala	Leu	Glu	Asn	Ser	Pro	Lys	Glu	
545					550					555					560	
Pro	Gly	Val	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Pro	Ala	Ala	Thr	Lys	Pro	Glu	Met	
				565					570					575		
Thr	Thr	Thr	Ala	Lys	Asp	Lys	Thr	Thr	Glu	Arg	Asp	Leu	Arg	Thr	Thr	
			580					585					590			
Pro	Glu	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Pro	Lys	Met	Thr	Lys	Glu	Thr	Ala	Thr	
		595					600					605				
Thr	Thr	Glu	Lys	Thr	Thr	Glu	Ser	Lys	Ile	Thr	Ala	Thr	Thr	Thr	Gln	
		610				615					620					
Val	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Gln	Asp	Thr	Thr	Pro	Phe	Lys	Ile	Thr	Thr	
625					630					635					640	
Leu	Lys	Thr	Thr	Thr	Leu	Ala	Pro	Lys	Val	Thr	Thr	Thr	Lys	Lys	Thr	
				645					650					655		
Ile	Thr	Thr	Thr	Glu	Ile	Met	Asn	Lys	Pro	Glu	Glu	Thr	Ala	Lys	Pro	
			660					665					670			
Lys	Asp	Arg	Ala	Thr	Asn	Ser	Lys	Ala	Thr	Thr	Pro	Lys	Pro	Gln	Lys	
		675					680					685				
Pro	Thr	Lys	Ala	Pro	Lys	Lys	Pro	Thr	Ser	Thr	Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	
		690				695					700					

ES 2 388 970 T3

Met Pro Arg Val Arg Lys Pro Lys Thr Thr Pro Thr Pro Arg Lys Met
705 710 715 720

Thr Ser Thr Met Pro Glu Leu Asn Pro Thr Ser Arg Ile Ala Glu Ala
725 730 735

Met Leu Gln Thr Thr Thr Arg Pro Asn Gln Thr Pro Asn Ser Lys Leu
740 745 750

Val Glu Val Asn Pro Lys Ser Glu Asp Ala Gly Gly Ala Glu Gly Glu
755 760 765

Thr Pro His Met Leu Leu Arg Pro His Val Phe Met Pro Glu Val Thr
770 775 780

Pro Asp Met Asp Tyr Leu Pro Arg Val Pro Asn Gln Gly Ile Ile Ile
785 790 795 800

Asn Pro Met Leu Ser Asp Glu Thr Asn Ile Cys Asn Gly Lys Pro Val
805 810 815

Asp Gly Leu Thr Thr Leu Arg Asn Gly Thr Leu Val Ala Phe Arg Gly
820 825 830

His Tyr Phe Trp Met Leu Ser Pro Phe Ser Pro Pro Ser Pro Ala Arg
835 840 845

Arg Ile Thr Glu Val Trp Gly Ile Pro Ser Pro Ile Asp Thr Val Phe
850 855 860

Thr Arg Cys Asn Cys Glu Gly Lys Thr Phe Phe Phe Lys Asp Ser Gln
865 870 875 880

Tyr Trp Arg Phe Thr Asn Asp Ile Lys Asp Ala Gly Tyr Pro Lys Pro
885 890 895

Ile Phe Lys Gly Phe Gly Gly Leu Thr Gly Gln Ile Val Ala Ala Leu
900 905 910

Ser Thr Ala Lys Tyr Lys Asn Trp Pro Glu Ser Val Tyr Phe Phe Lys
915 920 925

Arg Gly Gly Ser Ile Gln Gln Tyr Ile Tyr Lys Gln Glu Pro Val Gln
930 935 940

Lys Cys Pro Gly Arg Arg Pro Ala Leu Asn Tyr Pro Val Tyr Gly Glu
945 950 955 960

Met Thr Gln Val Arg Arg Arg Arg Phe Glu Arg Ala Ile Gly Pro Ser
965 970 975

Gln Thr His Thr Ile Arg Ile Gln Tyr Ser Pro Ala Arg Leu Ala Tyr
980 985 990

Gln Asp Lys Gly Val Leu His Asn Glu Val Lys Val Ser Ile Leu Trp
995 1000 1005

Arg Gly Leu Pro Asn Val Val Thr Ser Ala Ile Ser Leu Pro Asn

ES 2 388 970 T3

1010	1015	1020
Ile Arg Lys Pro Asp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Ala Phe Ser Lys Asp		
1025	1030	1035
Gln Tyr Tyr Asn Ile Asp Val Pro Ser Arg Thr Ala Arg Ala Ile		
1040	1045	1050
Thr Thr Arg Ser Gly Gln Thr Leu Ser Lys Val Trp Tyr Asn Cys		
1055	1060	1065

Pro

<210> 20

<211> 421

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Inserto de ADN Lub:4 del casete sintético 1 de ADNc y tres secuencias del casete sintético 2 de ADNc.

<400> 20

gcgcgcccac aactccaaaa gagcccgac ctaccacgac aaagtcagct cctactacgc	60
ccaaagagcc agcgccgacg actactaaag aaccggcacc caccacgcct aaagaaccag	120
cccctactac gacaaaggag cctgcacca caaccacgaa gagcgaccc acaacaccaa	180
aggagccggc ccctacgact cctaaagaac cagcccctac tacgacaaag gagcctgcac	240
ccacaaccac gaagagcgca ccacaacac caaaggagcc ggcccctacg actcctaaag	300
aaccagcccc tactacgaca aaggagcctg caccacaaac cacgaagagc gcaccacaa	360
caccaaagga gccggcccct acgactccta aggaacccaa accggcacca accactccgg	420
a	421

10 <210> 21

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> 139 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:4 (12 secuencias KEPAPTT entre S373 y E513 de la ID. SEC. Nº: 19)

<400> 21

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala
1 5 10 15
Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
20 25 30

ES 2 388 970 T3

Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
35 40 45

Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro
50 55 60

Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro
65 70 75 80

Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr
85 90 95

Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr
100 105 110

Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
115 120 125

Pro Lys Glu Pro Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro
130 135

<210> 22
<211> 3303
<212> ADN
5 <213> Artificial

<220>
<223> Constructo recombinante de ADNc PRG4-Lub:5
<400> 22

atggcatgga aaacacttcc catttacctg ttgttgctgc tgtctgtttt cgtgattcag 60

caagtttcat ctcaagattt atcaagctgt gcaggagat gtggggaagg gtattctaga 120

gatgccacct gcaactgtga ttataactgt caaactaca tggagtgtcg ccctgatttc 180

aagagagtct gcaactgcga gctttcctgt aaaggccgct gctttgagtc cttcgagaga 240

gggagggagt gtgactgcga cgcccaatgt aagaagtatg acaagtgtcg tcccgattat 300

gagagtttct gtgcagaagt gcataatccc acatcaccac catcttcaaa gaaagcacct 360

ccaccttcag gagcatctca aaccatcaaa tcaacaacca aacgttcacc caaaccacca 420

aacaagaaga agactaagaa agttatagaa tcagaggaaa taacagaaga acattctgtt 480

tctgaaaatc aagagtcctc ctccagtagc agttcaagta gttcgtcgtc gacaatttgg 540

aaaatcaagt cttccaaaaa ttcagctgct aatagagaat tacagaagaa actcaaagta 600

aaagataaca agaagaacag aactaaaaag aaacctaccc ccaaaccacc agttgtagat 660

gaagctggaa gtggattgga caatggtgac ttcaaggta caactcctga cacgtctacc 720

acccaacaca ataaagtcag cacatctccc aagatcacia cagcaaaacc aataaatccc 780

agaccagtc ttccacctaa ttctgataca tctaaagaga cgtctttgac agtgaataaa 840

ES 2 388 970 T3

gagacaacag ttgaaactaa agaaactact acaacaaata aacagacttc aactgatgga 900
 aaagagaaga ctacttccgc taaagagaca caaagtatag agaaaacatc tgctaaagat 960
 ttagcaccca catctaaagt gctggctaaa cctacaccca aagctgaaac tacaacccaa 1020
 ggccctgctc tcaccactcc caaggagccc acgcccacca ctcccaagga gctgcatct 1080
 accacaccca aagagcccac acctaccacc atcaagagcg cgcaccacaac tccaaaagag 1140
 cccgcaccta ccacgacaaa gtcagctcct actacgccc aagagccagc gccgacgact 1200
 actaaagaac cggcaccac cacgcctaaa gaaccagccc ctactacgac aaaggagcct 1260
 gcaccacaaa ccacgaagag cgcaccacaca acaccaaagg agccggcccc tacgactcct 1320
 aaagaaccag cccctactac gacaaaggag cctgcaccca caaccacgaa gagcgacccc 1380
 acaacaccaa aggagccggc ccctacgact cctaaagaac cagcccctac tacgacaaag 1440
 gagcctgcac ccacaaccac gaagagcgca ccacaacac caaaggagcc ggcccctacg 1500
 actcctaaag aaccagcccc tactacgaca aaggagcctg caccacacaac cacgaagagc 1560
 gcaccacaaa caccaaagga gccggcccct acgactccta aggaacccaa accggcacca 1620
 accactccgg aaacacctcc tccaaccact tcagaggtct ctactccaac taccaccaag 1680
 gagcctacca ctatccacaa aagccctgat gaatcaactc ctgagctttc tgcagaaccc 1740
 acaccaaag ctcttgaaaa cagtcccaag gaacctggtg tactacaac taagacgccg 1800
 gcggcgacta aacctgaaat gactacaaca gctaaagaca agacaacaga aagagactta 1860
 cgtactacac ctgaaactac aactgctgca cctaagatga caaaagagac agcaactaca 1920
 acagaaaaaa ctaccgaatc caaaataaca gctacaacca cacaagtaac atctaccaca 1980
 actcaagata ccacaccatt caaaattact actcttaaaa caactactct tgcacccaaa 2040
 gtaactacaa caaaaaagac aattactacc actgagatta tgaacaaacc tgaagaaaca 2100
 gctaaaccaa aagacagagc tactaattct aaagcgacaa ctcctaaacc tcaaaagcca 2160
 accaaagcac ccaaaaaacc cacttctacc aaaaagccaa aaacaatgcc tagagtgaga 2220
 aaaccaaaga cgacaccaac tccccgcaag atgacatcaa caatgccaga attgaaccct 2280
 acctcaagaa tagcagaagc catgctccaa accaccacca gacctaacca aactccaaac 2340
 tccaaactag ttgaagtaaa tccaaagagt gaagatgcag gtggtgctga aggagaaaca 2400
 cctcatatgc ttctcaggcc ccatgtgttc atgcctgaag ttactcccga catggattac 2460
 ttaccgagag tacccaatca aggcattatc atcaatccca tgctttccga tgagaccaat 2520
 atatgcaatg gtaagccagt agatggactg actactttgc gcaatgggac attagttgca 2580
 ttccgaggtc attatttctg gatgctaagt ccattcagtc caccatctcc agctcgcaga 2640


```

attactgaag tttggggtat tccttcccc attgatactg tttttactag gtgcaactgt 2700
gaaggaaaaa ctttcttctt taaggattct cagtactggc gttttaccaa tgatataaaa 2760
gatgcagggt accccaaacc aattttcaaa ggatttggag gactaactgg acaaatagtg 2820
gcagcgcttt caacagctaa atataagaac tggcctgaat ctgtgtattt tttcaagaga 2880
ggtggcagca ttcagcagta tatttataaa caggaacctg tacagaagtg ccctggaaga 2940
aggcctgctc taaattatcc agtgtatgga gaaatgacac aggttaggag acgtcgcttt 3000
gaacgtgcta taggaccttc tcaaacacac accatcagaa ttcaatattc acctgccaga 3060
ctggcttatt aagacaaagg tgtccttcat aatgaagtta aagtgagtat actgtggaga 3120
ggacttccaa atgtgggttac ctacagctata tcaactgccca acatcagaaa acctgacggc 3180
tatgattact atgccttttc taaagatcaa tactataaca ttgatgtgcc tagtagaaca 3240
gcaagagcaa ttactactcg ttctgggcag accttatcca aagtctggta caactgtcct 3300
taa 3303

```

<210> 23
 <211> 1100
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína PRG4-LUB:5 completa.

<400> 23

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

ES 2 388 970 T3

Ile	Lys	Ser	Thr	Thr	Lys	Arg	Ser	Pro	Lys	Pro	Pro	Asn	Lys	Lys	Lys		
130						135					140						
Thr	Lys	Lys	Val	Ile	Glu	Ser	Glu	Glu	Ile	Thr	Glu	Glu	His	Ser	Val		
145					150					155					160		
Ser	Glu	Asn	Gln	Glu	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	
				165						170					175		
Ser	Thr	Ile	Trp	Lys	Ile	Lys	Ser	Ser	Lys	Asn	Ser	Ala	Ala	Asn	Arg		
			180					185					190				
Glu	Leu	Gln	Lys	Lys	Leu	Lys	Val	Lys	Asp	Asn	Lys	Lys	Asn	Arg	Thr		
		195					200					205					
Lys	Lys	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Pro	Pro	Val	Val	Asp	Glu	Ala	Gly	Ser		
		210				215					220						
Gly	Leu	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Lys	Val	Thr	Thr	Pro	Asp	Thr	Ser	Thr		
225					230					235					240		
Thr	Gln	His	Asn	Lys	Val	Ser	Thr	Ser	Pro	Lys	Ile	Thr	Thr	Ala	Lys		
				245					250					255			
Pro	Ile	Asn	Pro	Arg	Pro	Ser	Leu	Pro	Pro	Asn	Ser	Asp	Thr	Ser	Lys		
			260					265					270				
Glu	Thr	Ser	Leu	Thr	Val	Asn	Lys	Glu	Thr	Thr	Val	Glu	Thr	Lys	Glu		
		275					280					285					
Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Lys	Gln	Thr	Ser	Thr	Asp	Gly	Lys	Glu	Lys	Thr		
		290				295					300						
Thr	Ser	Ala	Lys	Glu	Thr	Gln	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ser	Ala	Lys	Asp		
305					310					315					320		
Leu	Ala	Pro	Thr	Ser	Lys	Val	Leu	Ala	Lys	Pro	Thr	Pro	Lys	Ala	Glu		
				325					330					335			
Thr	Thr	Thr	Lys	Gly	Pro	Ala	Leu	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Thr	Pro		
			340				345						350				
Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Thr	Pro		
		355					360					365					
Thr	Thr	Ile	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr		
		370				375					380						
Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr		
385					390					395					400		
Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr		
			405						410					415			
Thr	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro		
			420					425					430				
Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr		

ES 2 388 970 T3

435		440		445
Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys	450	455		460
Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys	465	470	475	480
Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu		485	490	495
Pro Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu		500	505	510
Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro		515	520	525
Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro Glu		530	535	540
Thr Pro Pro Pro Thr Thr Ser Glu Val Ser Thr Pro Thr Thr Thr Lys		545	550	555
Glu Pro Thr Thr Ile His Lys Ser Pro Asp Glu Ser Thr Pro Glu Leu		565	570	575
Ser Ala Glu Pro Thr Pro Lys Ala Leu Glu Asn Ser Pro Lys Glu Pro		580	585	590
Gly Val Pro Thr Thr Lys Thr Pro Ala Ala Thr Lys Pro Glu Met Thr		595	600	605
Thr Thr Ala Lys Asp Lys Thr Thr Glu Arg Asp Leu Arg Thr Thr Pro		610	615	620
Glu Thr Thr Thr Ala Ala Pro Lys Met Thr Lys Glu Thr Ala Thr Thr		625	630	635
Thr Glu Lys Thr Thr Glu Ser Lys Ile Thr Ala Thr Thr Thr Gln Val		645	650	655
Thr Ser Thr Thr Thr Gln Asp Thr Thr Pro Phe Lys Ile Thr Thr Leu		660	665	670
Lys Thr Thr Thr Leu Ala Pro Lys Val Thr Thr Thr Lys Lys Thr Ile		675	680	685
Thr Thr Thr Glu Ile Met Asn Lys Pro Glu Glu Thr Ala Lys Pro Lys		690	695	700
Asp Arg Ala Thr Asn Ser Lys Ala Thr Thr Pro Lys Pro Gln Lys Pro		705	710	715
Thr Lys Ala Pro Lys Lys Pro Thr Ser Thr Lys Lys Pro Lys Thr Met		725	730	735
Pro Arg Val Arg Lys Pro Lys Thr Thr Pro Thr Pro Arg Lys Met Thr		740	745	750

ES 2 388 970 T3

Ser Thr Met Pro Glu Leu Asn Pro Thr Ser Arg Ile Ala Glu Ala Met
 755 760 765
 Leu Gln Thr Thr Thr Arg Pro Asn Gln Thr Pro Asn Ser Lys Leu Val
 770 775 780
 Glu Val Asn Pro Lys Ser Glu Asp Ala Gly Gly Ala Glu Gly Glu Thr
 785 790 795 800
 Pro His Met Leu Leu Arg Pro His Val Phe Met Pro Glu Val Thr Pro
 805 810 815
 Asp Met Asp Tyr Leu Pro Arg Val Pro Asn Gln Gly Ile Ile Ile Asn
 820 825 830
 Pro Met Leu Ser Asp Glu Thr Asn Ile Cys Asn Gly Lys Pro Val Asp
 835 840 845
 Gly Leu Thr Thr Leu Arg Asn Gly Thr Leu Val Ala Phe Arg Gly His
 850 855 860
 Tyr Phe Trp Met Leu Ser Pro Phe Ser Pro Pro Ser Pro Ala Arg Arg
 865 870 875 880
 Ile Thr Glu Val Trp Gly Ile Pro Ser Pro Ile Asp Thr Val Phe Thr
 885 890 895
 Arg Cys Asn Cys Glu Gly Lys Thr Phe Phe Phe Lys Asp Ser Gln Tyr
 900 905 910
 Trp Arg Phe Thr Asn Asp Ile Lys Asp Ala Gly Tyr Pro Lys Pro Ile
 915 920 925
 Phe Lys Gly Phe Gly Gly Leu Thr Gly Gln Ile Val Ala Ala Leu Ser
 930 935 940
 Thr Ala Lys Tyr Lys Asn Trp Pro Glu Ser Val Tyr Phe Phe Lys Arg
 945 950 955 960
 Gly Gly Ser Ile Gln Gln Tyr Ile Tyr Lys Gln Glu Pro Val Gln Lys
 965 970 975
 Cys Pro Gly Arg Arg Pro Ala Leu Asn Tyr Pro Val Tyr Gly Glu Met
 980 985 990
 Thr Gln Val Arg Arg Arg Arg Phe Glu Arg Ala Ile Gly Pro Ser Gln
 995 1000 1005
 Thr His Thr Ile Arg Ile Gln Tyr Ser Pro Ala Arg Leu Ala Tyr
 1010 1015 1020
 Gln Asp Lys Gly Val Leu His Asn Glu Val Lys Val Ser Ile Leu
 1025 1030 1035
 Trp Arg Gly Leu Pro Asn Val Val Thr Ser Ala Ile Ser Leu Pro
 1040 1045 1050
 Asn Ile Arg Lys Pro Asp Gly Tyr Asp Tyr Tyr Ala Phe Ser Lys
 1055 1060 1065

ES 2 388 970 T3

Asp Gln Tyr Tyr Asn Ile Asp Val Pro Ser Arg Thr Ala Arg Ala
 1070 1075 1080
 Ile Thr Thr Arg Ser Gly Gln Thr Leu Ser Lys Val Trp Tyr Asn
 1085 1090 1095
 Cys Pro
 1100

<210> 24
 <211> 514
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> Inserto de ADN Lub:5 del del casete sintético 1 de ADNc y cuatro secuencias del casete sintético 2 de ADNc
 <400> 24

gcgcgcccac aactccaaaa gagcccgac ctaccacgac aaagtcagct cctactacgc 60
 ccaaagagcc agcgccgacg actactaaag aaccggcacc caccacgcct aaagaaccag 120
 cccctactac gacaaaggag cctgcaccca caaccacgaa gagcgacccc acaacaccaa 180
 aggagccggc ccctacgact cctaaagaac cagcccctac tacgacaaag gagcctgcac 240
 ccacaaccac gaagagcgca cccacaacac caaaggagcc ggcccctacg actcctaaag 300
 aaccagcccc tactacgaca aaggagcctg caccacaaac cacgaagagc gcacccacaa 360
 caccaaagga gccggcccct acgactccta aagaaccagc ccctactacg acaaaggagc 420
 ctgcacccac aaccacgaag agcgacacca caacaccaaa ggagccggcc cctacgactc 480
 ctaaggaacc caaaccggca ccaaccactc cgga 514

10 <210> 25
 <211> 170
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 15 <223> 170 aminoácidos codificados por el inserto de ADN Lub:5 (15 secuenciasKEPAPTT entre S373 y E544 de la ID. SEC. Nº: 23)

<400> 25

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala
 1 5 10 15
 Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
 20 25 30
 Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
 35 40 45

ES 2 388 970 T3

Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro
50 55 60

Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro
65 70 75 80

Thr Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr
85 90 95

Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr
100 105 110

Thr Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
115 120 125

Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr
130 135 140

Thr Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro
145 150 155 160

Lys Glu Pro Lys Pro Ala Pro Thr Thr Pro
165 170

<210> 26

<211> 45

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos "APTTTPKEPAPTTTTSAPTTTPKEPAPTTT KEPAPTTTPKEPAPTTTK" (45 aminoácidos) de la proteína preferida PRG4-LUB:N

<400> 26

Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Ser Ala
1 5 10 15

Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala
20 25 30

Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys
35 40 45

10

<210> 27

<211> 31

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos "KEPAPTTTKEPAPTTTTSAPTTTPKEPAPTTTP" (31 aminoácidos) repetidos N-1 veces en la proteína preferida PRG4-LUB:N

<400> 27

Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Thr
1 5 10 15

Lys Ser Ala Pro Thr Thr Pro Lys Glu Pro Ala Pro Thr Thr Pro
20 25 30

20

<210> 28
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

- 5 <220>
 <223> Secuencia de aminoácidos "EPAPTTTKSAPTTTPKEPAPTTTP" (22 aminoácidos) que se une a la ID. SEC. Nº: 26 hasta (N-2) repeticiones de la ID. SEC. Nº: 27 en la proteína preferida PRG4-LUB:N donde N = 3 o más.
 <400> 28

Glu	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro	Lys	Glu
1				5					10					15	
Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro										
						20									

- 10 <210> 29
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

- <220>
 15 <223> Secuencia de aminoácidos "KEPKPAPTTTP" (10 aminoácidos) de la proteína preferida PRG4-LUB:N donde N = 2 o más.
 <400> 29

Lys	Glu	Pro	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	Thr	Pro
1				5					10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada que comprende las ID. SEC. Nº: 7, 11, 15, 19 ó 23.
2. Una proteína aislada que comprende la ID. SEC. Nº:7.
3. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para la proteína de la reivindicación 1 ó 2
4. El polinucleótido de la reivindicación 3 en el que el polinucleótido comprende las ID. SEC. Nº: 6, 10, 14, 18 ó 22.
5. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína recombinante de lubricina y con una identidad de al menos el 95% con las ID. SEC. Nº: 6, 10, 14, 18 ó 22 a lo largo de la longitud completa de la secuencia.
6. El polinucleótido de la reivindicación 5 que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una proteína recombinante de lubricina y con una identidad de al menos el 99% con las ID. SEC. Nº: 6, 10, 14, 18 ó 22 a lo largo de la longitud completa de la secuencia.
7. Una proteína recombinante de lubricina codificada por el polinucleótido de la reivindicación 5 ó 6.
8. La proteína de las reivindicaciones 1, 2 ó 7 en la que la proteína está unida por O con β -(1-3)-Gal-GalNac.
9. Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de la reivindicación 1, 2 ó 7 en un portador farmacéuticamente aceptable.
10. La composición de la reivindicación 9 que comprende adicionalmente hialuronano o hilano.
11. Una proteína de la reivindicación 1, 2 ó 7 para su uso en el tratamiento de un sujeto.
12. Una proteína de la reivindicación 1, 2 ó 7 para su uso en el tratamiento de un sujeto mediante su administración a un tejido del sujeto.
13. Una proteína de la reivindicación 1, 2 ó 7 para el uso de la reivindicación 11 en el que el tejido se elige del grupo que consiste en cartílago, membrana sinovial, menisco, tendón, peritoneo, pericardio y pleura.
14. Una proteína de la reivindicación 1, 2 ó 7 para el uso de la reivindicación 11 en el que el tejido es cartílago.
15. Una proteína de la reivindicación 1, 2 ó 7 para el uso de la reivindicación 11 en el que dicho uso comprende adicionalmente proporcionar un anestésico al sujeto; proporcionar un fármaco antiinflamatorio al sujeto; proporcionar un antibiótico al sujeto; aspirar fluido del sujeto; lavar tejido del sujeto; y obtener imágenes del tejido del sujeto.
16. Una proteína de la reivindicación 1, 2 ó 7 para el uso de la reivindicación 11 en el que el sujeto se elige del grupo que consiste en un ratón, una rata, un gato, un perro, un caballo y un ser humano.
17. Una proteína de la reivindicación 1, 2 ó 7 para el uso de la reivindicación 11 en el que el sujeto es un ser humano.
18. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 unido operativamente a una secuencia de control de la expresión.
19. Un procedimiento para producir una proteína recombinante según la reivindicación 1, 2 ó 7 que comprende:
hacer crecer células transformadas con el vector de expresión de la reivindicación 18 en medio de cultivo líquido; y
recoger la proteína recombinante del medio.
20. El procedimiento de la reivindicación 19, en el que la recolección de la proteína comprende:
concentrar la proteína filtrando el medio a través de una membrana;
recoger la proteína retenida en la membrana; y
solubilizar la proteína recogida en una disolución salina tamponada que contiene clorhidrato de L-arginina con una concentración que varía entre 0,1 y 2,0 M.
21. El procedimiento de la reivindicación 20 en el que la concentración de clorhidrato de L-arginina es 0,5 M.