

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 399 584**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**C12P 21/02** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/543** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2009 E 09731755 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.01.2013 EP 2270145**

---

(54) Título: **Nueva proteína capaz de unirse al ácido hialurónico y procedimiento para medir el ácido hialurónico usando la misma**

(30) Prioridad:

**15.04.2008 JP 2008106190**

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

**02.04.2013**

(73) Titular/es:

**WAKO PURE CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.**  
**(100.0%)**  
**1-2, Doshomachi 3-chome Chuo-ku Osaka-shi**  
**Osaka 540-8605, JP**

(72) Inventor/es:

**TERASHIMA, KAZUHIRO y**  
**FUJIO, KAZUNARI**

(74) Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 399 584 T3**

---

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

**DESCRIPCIÓN**

Nueva proteína capaz de unirse al ácido hialurónico y procedimiento para medir el ácido hialurónico usando la misma

**Ámbito técnico**

- 5 La presente invención se refiere a una nueva proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico (proteína de unión al ácido hialurónico, en lo sucesivo, abreviada algunas veces como HABP) que es barata y superior en estabilidad de calidad, a un procedimiento para medir el ácido hialurónico con un elevado grado de precisión en la medida, y a un kit de reactivos que usa la misma.

**Técnica antecedente**

- 10 El ácido hialurónico es un tipo de mucopolisacárido, y está contenido principalmente en el líquido sinovial y en el humor vítreo ocular de los animales, y en tejidos conectivos tales como el cordón umbilical y la dermis superior, y similares, de los animales. Se sabe que la concentración del mismo en sangre aumenta en los casos de enfermedad reumatoide, cáncer o enfermedad hepática, y por lo tanto se cree que el ácido hialurónico es útil para el diagnóstico de estas enfermedades, y hasta la fecha se han desarrollado varios procedimientos de medición.

- 15 Como procedimientos para medir el ácido hialurónico, se conoce un procedimiento en el que la medición se realiza mediante un ensayo de enzimoinmunoabsorción (ELISA) usando una HABP (Bibliografía Patente: 1, Literatura de Patente: 2, y similares) o un procedimiento de medición inmunológico que usa partículas de látex.

- 20 De entre ellos, se ha empleado ampliamente el procedimiento de medición inmunológico que usa partículas de látex debido a su simple procedimiento y aplicabilidad para dispositivos de mediciones múltiples. Como procedimiento de medición que usa partículas de látex como reactivo para medir el ácido hialurónico, se conoce un procedimiento que comprende procesos de soportar la HABP sobre partículas portadoras, hacer reaccionar la HABP con el ácido hialurónico de la muestra para formar un complejo de reacción, y determinar el ácido hialurónico mediante la detección del complejo de reacción (Literatura de Patente: 3), y similares.

- 25 Por otro lado, como HABP se conocen proteoglucanos tales como el agrecano, y similares, proteínas conectoras y hialuronectina, y similares. De entre ellos, el agrecano es un proteoglucano de elevado peso molecular que supone aproximadamente el 90% del proteoglucano presente en el cartílago, contiene sulfato de condroitina, y está presente en el tejido cartilaginoso en una forma unida al ácido hialurónico. Además, el agrecano también se usa para la medición del ácido hialurónico.

- 30 Sin embargo, dado que el agrecano que se ha usado hasta ahora para la medición del ácido hialurónico es un producto purificado a partir de cartílago bovino, el agrecano tiene problemas tales como su fluctuación en la calidad interlote debido al producto natural y el elevado precio del mismo.

Por lo tanto, se ha deseado el desarrollo de una HABP que no tenga fluctuación en la calidad y que sea barata, y un procedimiento para obtener la HABP.

**Lista de referencias**

- 35 Literatura de patente

Literatura de Patente 1: JP-B-6-041952  
 Literatura de Patente 2: JP-B-2732718  
 Literatura de Patente 3: JP-B-3424504

**Resumen de la invención**

- 40 Problema técnico

En vista de la situación anterior, un objeto de la presente invención es proporcionar una nueva HABP, un procedimiento para obtener una HABP sin ninguna fluctuación en su calidad así como a un precio barato, un procedimiento para medir el ácido hialurónico con un elevado grado de precisión en la medida, y un kit de reactivos que usa la misma.

- 45 Solución al problema

La presente invención se creó con el fin de resolver los problemas descritos anteriormente, y se ha averiguado que puede obtenerse un ADNc que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de aminoácidos con una elevada homología con la secuencia de aminoácidos conocida del agrecano bovino, agrecano que es un tipo de HABP, a partir de una genoteca de ADNc preparada a partir del ARNm de cartílago bovino.

- 50 Además, los presentes inventores han averiguado que la HABP de la presente invención puede obtenerse transfectando la célula hospedadora con un vector de expresión recombinante que comprende el ADNc, y cultivando

la célula hospedadora para que exprese el ADNc.

Además, los presentes inventores han averiguado que llevando a cabo la medición del ácido hialurónico usando la HABP de la presente invención, puede realizarse una medición de elevada precisión del ácido hialurónico sin fluctuaciones en calidad e inhibiendo un fenómeno de prozona, en comparación con el procedimiento de medición del ácido hialurónico que usa el agrecano natural convencional.

A saber, la presente invención comprende las siguientes composiciones:

- (1) Un polinucleótido que codifica para una proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2, en la que la secuencia de aminoácidos tiene un residuo de isoleucina en la posición 130 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos, y un residuo de aminoácidos seleccionados de entre un residuo de tirosina, un residuo de serina, un residuo de treonina, un residuo de cisteína, un residuo de asparragina y un residuo de glutamina en la posición 131 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos.
- (2) Una proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2; un residuo de aminoácido en la posición 130 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos es isoleucina; un residuo de aminoácido en la posición 131 es un residuo de aminoácido seleccionado de entre un residuo de tirosina, un residuo de serina, un residuo de treonina, un residuo de cisteína, un residuo de asparragina y un residuo de glutamina.
- (3) Un procedimiento para producir la proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico descrita en el anterior (2), que comprende; cultivar una célula hospedadora transfectada por un Baculovirus integrado con un vector de expresión recombinante con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1, o un transformante obtenido transformando las células hospedadoras con el vector de expresión recombinante, y separar y purificar una proteína a partir del medio de cultivo.
- (4) Un procedimiento para medir el ácido hialurónico, que comprende; poner en contacto el ácido hialurónico de una muestra con la proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico descrita anteriormente (2) para formar un complejo del ácido hialurónico y la proteína, hacer reaccionar el complejo con un portador que soporta un anticuerpo específico para la proteína, medir un cambio óptico mediante un aglutinado obtenido a partir de la reacción, y calcular la cantidad de ácido hialurónico a partir del valor medido.
- (5) Un kit de reactivos para la medición del ácido hialurónico, que comprende la proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico descrita en el anterior (2) como un constituyente.

#### Efectos ventajosos de la invención

La presente invención proporciona una nueva y barata HABP sin ninguna fluctuación entre los productos. Dado que la HABP de la presente invención es un producto recombinante, la HABP puede obtenerse a bajo coste y en grandes cantidades, y tiene una calidad superior y sin fluctuaciones en la calidad, en comparación con el agrecano natural.

Además, dado que la HABP de la presente invención tiene las características descritas anteriormente, usándola puede realizarse una medición barata y de elevada precisión del ácido hialurónico.

#### Breve descripción de los dibujos

[Fig. 1]  
La Fig. 1 muestra los resultados de la electroforesis de la disolución de ARN total recuperada a partir del cartílago bovino del septo nasal en gel de agarosa al 1%, que se obtuvo en el Ejemplo 1 (1). Además, las flechas de la Fig. 1 muestran las fracciones de ARNr 18s y ARNr 28s, respectivamente.

[Fig. 2]  
La Fig. 2 muestra los resultados de la electroforesis del producto de la PCR en gel de agarosa que contiene bromuro de etidio, que se obtiene en el Ejemplo 1 (3). En la Fig. 2, el carril 1 muestra el resultado cuando se usó el marcador de peso molecular como muestra, y el carril 2 muestra el resultado cuando se usó un fragmento de producto de la PCR como muestra, respectivamente. Además, la flecha muestra una fracción del fragmento del producto de la PCR.

[Fig. 3]  
La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 1 (7). En la Fig. 3, (a) se muestra el resultado de la tinción de plata del gel después de la SDS-PAGE, y (b) muestra el resultado de la inmunotransferencia Western usando anticuerpo anti-agrecano marcado con peroxidasa. Además, en la Fig. 3 (a) y (b), cada carril muestra los resultados cuando se usó la siguiente muestra: carril 1: el marcador de peso molecular de la proteína, carril 2: el sobrenadante del cultivo antes de la purificación por afinidad, el carril 3: el sobrenadante del cultivo después de la purificación por afinidad, y el carril 4: la proteína obtenida mediante la purificación por afinidad. Además, la flecha de la Fig. 3 (b) muestra una fracción de la HABP de la presente invención.

[Fig. 4]

La Fig. 4 muestra las curvas estándar que muestran las relaciones entre las concentraciones de ácido hialurónico en las muestras y las absorbancias de la muestra a 805 nm, que se obtuvieron en el Ejemplo 2 y en el Ejemplo Comparativo 1.

[Fig. 5]

5 La Fig. 5 muestra los resultados de la representación gráfica de la absorbancia a 805 nm de las muestras para las concentraciones de ácido hialurónico, que se obtuvieron en el Ejemplo 3 y en el Ejemplo Comparativo 2.

[Fig. 6]

10 La Fig. 6 muestra el resultado de la representación gráfica de la absorbancia a 805 nm de las muestras que contienen 1.000 ng/ml de ácido hialurónico para cada concentración de HABP en el primer reactivo en los casos en los que se usaron varias concentraciones de la HABP de la presente invención o de la HABP de secuencia de aminoácidos conocida, que se obtuvieron en el Ejemplo 4 y en el Ejemplo Comparativo 3.

#### Descripción de las formas de realización

El agrecano derivado del cartílago bovino (agrecano de *Bos taurus*) es una proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico, es decir una HAPB, con 2.327 aminoácidos en total. Además, el cartografiado de la secuencia génica de la misma ya se ha completado, y la secuencia y la secuencia de aminoácidos completa se han desvelado en el Banco de Datos de ADN de Japón (DDBJ). La secuencia de aminoácidos completa conocida derivada del agrecano bovino desvelada en la base de datos mencionada anteriormente se muestra en la ID. SEC. N°: 7. El sitio de unión al ácido hialurónico del agrecano bovino está ubicado en una parte de los residuos de aminoácidos de las posiciones 153 a 352 a partir del N-terminal de la secuencia.

20 El polinucleótido de la presente invención es similar a "un polinucleótido que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal hasta un residuo de aminoácido en la posición 692 de la secuencia de aminoácidos completa del agrecano bovino conocido mostrado en la ID. SEC. N°: 7" y que incluye un sitio de unión al ácido hialurónico. A saber, el polinucleótido de la presente invención es el polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos en la que el residuo de leucina en la 25 posición 131 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos del agrecano conocida está sustituido por un residuo derivado de otro aminoácido (es decir, la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2).

A saber, el polinucleótido de la presente invención es "un polinucleótido que codifica para una proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2, en la que la secuencia de aminoácidos tiene un residuo de isoleucina en la posición 130 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos, y un residuo derivado de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en tirosina, serina, treonina, cisteína, asparragina y glutamina en la posición 131 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos."

30 De entre ellos se prefiere un polinucleótido que codifica para un polinucleótido que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2, en la que la secuencia de aminoácidos tiene un residuo de isoleucina en la posición 130 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos, y un residuo de tirosina en la posición 131 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos (es decir una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 4).

35 Además, el polinucleótido de la presente invención es similar a "un polinucleótido que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal hasta un residuo de aminoácido en la posición 692 de la secuencia de aminoácidos completa conocida del agrecano bovino, que incluye un sitio de unión al ácido hialurónico. A saber, en el caso de una secuencia de nucleótidos conocida del agrecano bovino, una secuencia de nucleótidos en las posiciones 388 hasta 393 a partir del 5' terminal, que codifica para los residuos de aminoácidos (Ile - Leu) en las posiciones 130 hasta 131 a partir del N-terminal en la secuencia de aminoácidos conocida del agrecano bovino, es "ATTCTA". En el caso del polinucleótido de la presente invención, la secuencia sustituyó 40 "ATTCTA" por otra secuencia de nucleótidos (es decir, la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1).

45 A saber, el polinucleótido de la presente invención es "el polinucleótido que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2, en la que el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1; una base en la posición 390 a partir del 5' terminal del polinucleótido es la base seleccionada de entre T, C y A; y las bases en las posiciones 391 hasta 393 a partir del 5' terminal son secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre TAT, TAC, TCT, TCC, TCA, TCG, ACT, ACC, ACA, ACG, TGT, TGC, AAT, AAC, CAA y CAG (en esta relación, A representa adenina, C representa citosina, G representa guanina y T representa timina, respectivamente, y en lo sucesivo igual que anteriormente)".

50 Además, como resulta evidente a partir de la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1, la secuencia de nucleótidos en las posiciones 388 hasta 389 del polinucleótido de la presente invención es "AT."

55 De entre los polinucleótidos de la presente invención descritos anteriormente, es preferible un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1, en la que las bases en las posiciones 391 hasta 393 a partir del 5' terminal del polinucleótido son TAT.

Además, es más preferible un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos en la que las bases en las posiciones 391 hasta 393 a partir del 5' terminal son TAT, y la base en la posición 390 a partir del 5' terminal es C (es decir, la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 3).

Como comparación, en la ID. SEC. N°: 8 se muestra una secuencia de nucleótidos conocida que codifica para la secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal hasta el residuo de aminoácido en la posición 692 en la secuencia de aminoácidos completa conocida con 2.327 aminoácidos del agrecano bovino, que incluye un sitio de unión al ácido hialurónico. Además, en la ID. SEC. N°: 9 se muestra una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos (una secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal hasta el residuo de aminoácido en la posición 692 que incluye un sitio de unión al ácido hialurónico en la secuencia de aminoácidos completa conocida del agrecano bovino).

La HABP de la presente invención es similar a "una proteína con una secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal hasta un residuo de aminoácido en la posición 692 en la secuencia de aminoácidos completa conocida del anteriormente descrito agrecano bovino, que incluye un sitio de unión al ácido hialurónico. A saber, en el caso de la secuencia de aminoácidos conocida del agrecano bovino, un residuo de aminoácido en la posición 131 a partir del N-terminal es leucina. En el caso de la HABP de la presente invención, el residuo de aminoácido está sustituido por otro residuo de aminoácido (es decir, la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2).

A saber, la HABP de la presente invención es "una HABP que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2; un residuo de aminoácido en la posición 130 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos es isoleucina; un residuo de aminoácido en la posición 131 es un residuo derivado de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en tirosina, serina, treonina, cisteína, asparragina y glutamina."

Preferiblemente, la HABP de la presente invención incluye una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2, en la que un residuo de aminoácido en la posición 131 a partir del N-terminal es un residuo de tirosina (es decir, la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 4).

En lo sucesivo, la presente invención se explicará con detalle.

## 25 I. Preparación del polinucleótido de la presente invención

El polinucleótido de la presente invención puede obtenerse mediante el conocido procedimiento de síntesis de ADN. Por ejemplo, el polinucleótido puede obtenerse, por ejemplo, usando un sintetizador de ADN, sintetizando un polinucleótido mediante el habitual método del fosfoamidito, y purificando mediante procedimientos convencionales usando una cromatografía en columna de intercambio aniónico, como se realiza habitualmente en la síntesis de ADN.

Además, el polinucleótido de la presente invención puede obtenerse como un ADNc, que se obtiene, por ejemplo, extrayendo el ARNm de tejidos animales o similares, y sintetizando a partir del ARNm usando el procedimiento conocido.

El ARNm para la síntesis de la HABP de la presente invención puede obtenerse a partir de tejido de cartílago animal, o similares, tal como cartílago del septo nasal, cartílago bronquial y similares.

En lo sucesivo se mostrará un procedimiento para preparar el polinucleótido de la presente invención, por ejemplo, a partir de tejido de cartílago animal, tal como cartílago del septo nasal bovino, y similares.

### (1) Recuperación del ARN total

En primer lugar, después de disgrigar un tejido tal como el cartílago del septo nasal bovino, o similares, mediante el procedimiento convencional, el ARN total se extrae mediante el procedimiento convencional.

El procedimiento convencional incluye, por ejemplo, un procedimiento para preparar ARN total mediante tratamiento con tiocianato de guanidina, y realizando después una centrifugación en gradiente de densidad con cloruro de cesio, según el método de Chirgwin y col., (Biochemistry, 18, 5294 - 5299, 1979); el método de tiocianato de guanidina - fenol caliente; el método de tiocianato de guanidina - clorhidrato de guanidina; el método de tiocianato de guanidina - fenol - cloroformo; y similares.

Además, dado que en el mercado hay disponible una variedad de kits para la obtención del ARN total, pueden usarse esos kits. Dichos kits incluyen, por ejemplo, RNeasy Lipid Tissue Midi Kit, RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (producto de QIAGEN GmbH.), y similares.

### (2) Purificación del ARNm

La purificación del ARNm a partir del ARN total puede realizarse según los procedimientos convencionales. Los procedimientos convencionales incluyen, por ejemplo, un procedimiento de cromatografía en columna de celulosa de oligo(dT) que sólo purifica el ARNm del ARN total usando un portador que hibride con una cola de poli A del ARNm, el método de cloruro de litio/urea, el método del isocianato de guanidina, y similares.

También, para la purificación del ARNm, dado que hay disponibles en el mercado una variedad de kits con este fin, pueden usarse esos kits. Por ejemplo, puede incluirse Oligotex™ -dT30 <Super> (producido por Takara Bio Inc.).

(3) Preparación del ADNc y clonación

5 Mediante el procedimiento convencional usando transcriptasa inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando el ARNm obtenido como molde, el ADNc se sintetiza y se amplifica. Pueden usarse los kits disponibles en el mercado para la síntesis y la clonación.

10 Por ejemplo, cuando se lleva a cabo una PCR, se diseña un par de cebadores basándose en la secuencia de nucleótidos del polinucleótido objetivo de la presente invención, de forma que se replique la parte. Entonces, llevando a cabo la PCR usando el par de cebadores mediante el procedimiento convencional, puede obtenerse el ADNc que comprende la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de la presente invención que codifica para la HABP deseada de la presente invención (es decir, el polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1 de la presente invención).

(4) Determinación de la secuencia de nucleótidos del ADNc

15 La determinación de la secuencia de nucleótidos amplificada del ADNc puede realizarse mediante procedimientos convencionales que incluyen el procedimiento de secuenciación por ciclos, y similares.

II. Preparación de la HABP de la presente invención

(1) Producción del vector de expresión recombinante de la presente invención, célula hospedadora transfectada y transformante implicado en la presente invención.

20 El procedimiento para producir la HABP de la presente invención es "un procedimiento para producir la proteína que comprende; cultivar una célula hospedadora transfectada por un Baculovirus integrado con un vector de expresión recombinante con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1, o un transformante obtenido transformando la célula hospedadora con el vector de expresión recombinante, y separando y purificando una proteína a partir del medio de cultivo".

25 A saber, la HABP de la presente invención puede obtenerse mediante el proceso conocido usando la técnica de recombinación genética, es decir, el polinucleótido de la presente invención se integra en un vector de expresión tal como un plásmido o un fago apropiado, la célula hospedadora es transfectada o transformada usando el vector de expresión, y la célula hospedadora obtenida se cultiva para eluir la proteína dentro o fuera de la célula.

30 El procedimiento usado generalmente es un procedimiento que usa un sistema de expresión que usa una célula procariota tal como *Escherichia coli*, o un sistema de expresión que usa una célula eucariota tal como una célula de un mamífero común, de levadura, una célula de insecto, y similares.

35 De entre ellos, el sistema de expresión que usa una célula de insecto infectada por un Baculovirus se ha usado ampliamente en los años recientes, debido a que el sistema de expresión es fácil de usar y capaz de obtener la proteína deseada en una gran cantidad. A saber, el Baculovirus tiene un carácter para producir un gran número de cuerpos de inclusión denominados polihedros dentro del núcleo de la célula infectada. Los polihedros comprenden una proteína denominada polihedrina, y la cantidad de expresión de la misma alcanza prácticamente la mitad de las proteínas celulares totales. Por lo tanto, se realiza ampliamente una técnica para conducir una síntesis de la proteína recombinante dentro de células de insecto utilizando el muy potente promotor del polihedro.

También puede usarse en la presente invención el sistema de expresión que usa Baculovirus - célula de insecto.

1) Procedimiento para transfectar una célula hospedadora usando el sistema Baculovirus - célula de insecto

40 En lo sucesivo se explicará un procedimiento para obtener la HABP de la presente invención utilizando el sistema de expresión de Baculovirus - célula de insecto mediante referencia a un ejemplo, pero el procedimiento no se limita particularmente a este ejemplo, y la HABP de la presente invención puede prepararse usando Baculovirus, células de insecto o similares usados habitualmente en la técnica mediante el procedimiento convencional usado habitualmente en la técnica.

45 El Baculovirus usado para el sistema de expresión que usa Baculovirus - célula de insecto incluye el virus, tal como el virus de la polihedrosis nuclear *Autographica californica*, el virus infecta insectos del género *Mamestra*.

La célula de insecto usada como célula hospedadora incluye Sf 9, Sf 20, o similares, derivadas de *Spodoptera frugiperda*, High 5 derivadas de *Trichoplusia ni*, BTI-TN-5B1-4 (producidas por Invitrogen Corp.), y similares.

50 Cuando el polinucleótido de la presente invención está integrado en un Baculovirus, preferiblemente el polinucleótido no está integrado directamente en el Baculovirus, sino que en el procedimiento convencional, el polinucleótido se integra primero en un vector de transferencia y subsiguientemente se cotransfектa a la célula de insecto como un hospedador junto con el ADN genómico del Baculovirus.

El vector de transferencia (que se va a usar como vector de expresión) incluye vectores para diferentes células de insecto tales como pVL1392, pVL1393 y pBlueBacIII (éstos son producidos por Invitrogen Corp.), pBacPAK9, AcNPV originados a partir de *Autographa californica* NPV, y similares.

5 Dado que el vector de transferencia tiene un promotor de polihedrina frente al sitio de clonación, el polinucleótido de la presente invención se inserta secuencia abajo del gen promotor de la polihedrina mediante el procedimiento convencional. Mediante este procedimiento puede obtenerse el vector de expresión recombinante implicado en la presente invención en el que se ha integrado el polinucleótido de la presente invención.

10 El vector de transferencia integrado en el polinucleótido de la presente invención (vector de expresión recombinante) es cotransfектado junto con el ADN genómico del Baculovirus en la célula de insecto como hospedador mediante el procedimiento convencional, tal como el método del fosfato cálcico (documento JP-A-2-227075), el método de la lipofección (Proc. Natl. Acad. Sci., EE.UU., 84, 7413, 1987), y similares. Mediante la cotransfección se induce la recombinación homóloga en el sitio de la polihedrina, y después puede producirse con alta eficacia un Baculovirus recombinante en el que se ha introducido el polinucleótido de la presente invención.

15 Tres o cuatro días después de la cotransfección se recoge el sobrenadante del cultivo y el Baculovirus recombinante se selecciona y se purifica a partir de una mezcla de Baculovirus recombinante y no recombinante expresados en el medio de cultivo, mediante un procedimiento convencional tal como el método de la dilución limitante, el método en placa, y similares. Mediante los procedimientos descritos anteriormente, puede obtenerse "el Baculovirus recombinante" implicado en la presente invención integrado con "el vector de expresión recombinante" implicado en la presente invención.

20 El Baculovirus recombinante obtenido infecta (es transfectado en) la célula de insecto como hospedador. La transfección se realiza habitualmente a una MOI (Multiplicidad de Infección) de entre 5 y 10. Mediante los procedimientos descritos anteriormente, se obtiene la célula hospedadora implicada en la presente invención transfectada con el Baculovirus recombinante implicado en la presente invención.

2) Procedimiento para obtener el transformante de la célula hospedadora

25 También, además del sistema de expresión Baculovirus - célula de insecto, el polinucleótido de la presente invención puede ser expresado mediante el siguiente procedimiento.

En primer lugar se integra el ADNc obtenido en un ADN vector según, por ejemplo, el procedimiento convencional.

El vector de expresión es útil para el fin de expresar el polinucleótido de la presente invención para producir la HABP de la presente invención.

30 El vector de expresión no está particularmente limitado, siempre que sea capaz de mantener la capacidad de replicación o de autorreplicación en diversos tipos de células hospedadoras, tales como células procariotas y/o eucariotas, y tenga la función de expresar y producir el polinucleótido de la presente invención. Dichos vectores de expresión incluyen vectores de plásmidos, vectores de fagos, vectores de virus, y similares.

35 Dicho vector incluye específicamente un plásmido derivado de *Escherichia coli* tal como, por ejemplo, pUC 119 (producido por Takara Shuzo Co. Ltd.), el plásmido pQE-TRI (producido por QIAGEN GmbH.), pBluescript II KS+ (producido por Stratagene Corp.), pBR322 (producido por Takara Shuzo Co. Ltd.), pGEM, pGEX, pUC, bpBS, pET, pGEM-3ZpMAL y similares; plásmidos derivados de levaduras tales como, por ejemplo, pB42AD, pESP, pESC, y similares; plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* tales como, por ejemplo, pHT926, pTB51, pHY481, y similares. Además, también están incluidos plásmidos derivados de células de mamífero tales como pCAT3, pADNc3.1, pCMV, y similares.

40 Además, el fago incluye bacteriófagos que incluyen fagos  $\lambda$  tales como  $\lambda$ ENBL 3 (producido por Stratagene Corp.),  $\lambda$ DASHII (producido por Funakoshi, Co. Ltd.),  $\lambda$ gt10,  $\lambda$ gt11 (ambos son producidos por TOYOBO Co. Ltd.), y similares, y vectores cósmidos tales como Charomid DNA (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), Lorist 6 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y similares, y así sucesivamente.

45 Además, se ejemplifica un virus animal o un virus de insecto tal como retrovirus, virus de vaccinia o Virus de la Polihedrosis Nuclear.

El vector de expresión recombinante integrado con el polinucleótido de la presente invención puede prepararse integrando el polinucleótido de la presente invención en el vector descrito anteriormente mediante el procedimiento convencional.

50 Cuando se usa una bacteria, en particular *E. coli*, para la célula hospedadora, el vector de expresión está generalmente formado por al menos una región operadora del promotor, un codón de inicio, el polinucleótido de la presente invención, un codón de terminación, una región terminadora y unidades capaces de replicarse.

Cuando se usa una célula animal o de levadura como célula hospedadora, el vector de expresión comprende preferiblemente al menos un promotor, un codón de inicio, el polinucleótido de la presente invención y un codón de

terminación. También puede integrarse en el vector de expresión un ADN que codifica para el péptido de señalización, una secuencia potenciadora, un área no traducible en el 5' o 3'-terminal del polinucleótido de la presente invención, una zona de unión o un sitio de poliadenilación.

5 La región operadora del promotor para expresar el polinucleótido de la presente invención en bacterias incluye aquella que comprende el promotor, el operador y la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) (por ejemplo, AAGG). Por ejemplo, cuando la célula hospedadora es una bacteria de la especie *Escherichia*, la región incluye adecuadamente el promotor Tac, el promotor Trc, el promotor Trp, el promotor lac, el promotor rec A, el promotor T7 derivado de bacteriófago, el promotor T3, el promotor SP6, el promotor  $\lambda$ PL, y similares.

10 El promotor para expresar el polinucleótido de la presente invención en levaduras incluye el promotor ADH, el promotor GAL1, y similares. Cuando la célula hospedadora es una bacteria del género *Bacillus*, el promotor incluye el promotor penP, y similares. Y cuando la célula hospedadora es una célula eucariota tal como una célula animal, se incluyen el promotor derivado de SV40, el promotor derivado de CMV, el promotor de retrovirus, el promotor de choque térmico, el promotor de polihedrina de nucleopolihedrovirus, y similares. Sin embargo, el promotor no se limita particularmente a estos. Además, el uso de un potenciador de la expresión es un procedimiento eficaz de expresión.

15 Como codón de inicio adecuado puede ejemplificarse el codón de metionina (ATG).

Como codón de terminación, puede ejemplificarse el codón de terminación usado habitualmente (por ejemplo, TAA, TAG, TGA, y similares). La región terminadora incluye un terminador natural o sintético.

20 El término "unidad capaz de replicarse" significa un ADN con una función capaz de replicar la secuencia completa de ADN del mismo en la célula hospedadora, e incluye un plásmido natural, un plásmido modificado artificialmente (por ejemplo, un fragmento de ADN preparado a partir del plásmido natural), un plásmido sintético, y similares.

25 Como secuencia potenciadora puede ejemplificarse una secuencia potenciadora de los principales virus de ADN tales como CMV, SV40, polioma, adeno, papiloma, y similares; una secuencia potenciadora del retrovirus Long Terminal Repeat (LTR); y una secuencia potenciadora del gen de la cadena H o del gen de la cadena L de inmunoglobulina.

30 El vector de expresión puede prepararse uniendo un promotor, un codón de inicio, el polinucleótido de la presente invención, un codón de terminación y una región terminadora en serie y circularmente en una unidad replicable apropiada. También en esta ocasión puede usarse un fragmento de ADN adecuado (por ejemplo, un conector, otro sitio de restricción, o similares) mediante los procedimientos convencionales tales como digestión con enzimas de restricción, ligación usando ligasa T4 de ADN, y similares, si fuera necesario.

35 El transformante implicado en la presente invención puede prepararse induciendo el anteriormente descrito vector de expresión recombinante y similares en una célula hospedadora.

40 La célula hospedadora incluye, por ejemplo, microorganismos [bacterias (por ejemplo, género *Escherichia* y género *Bacillus*), levaduras (por ejemplo, género *Saccharomyces*), células animales, células de insecto, y similares]. Específicamente, la célula hospedadora incluye *Escherichia coli* (*Escherichia coli* BL21, BL21 (DE3), DH1, DH5, DH5 $\alpha$ , M15, HB101, C600, XL-1 Blue, JM109, JM105, JM127 o XL1-Blue) en bacterias del género *Escherichia*, y *B. subtilis*, *B. brevis* o *B. borstelensis* en bacterias del género *Bacillus*. Las levaduras incluyen *S. cerevisiae*, *Sciz. pombe*, *A. nidulans* y *Pichia pastoris*. También pueden usarse hongos filamentosos del género *Aspergillus* tales como *Aspergillus nidulans*, y similares. Las células animales incluyen células de simio COS-7, Vero, células de hámster chino CHO, células L de ratón, células HeLa humanas, células FL y similares. Las células de insecto incluyen BmN4, Sf9, y similares. Sin embargo, la célula hospedadora no está particularmente limitada a éstas.

45 La transformación o la transducción de las células hospedadoras pueden realizarse usando los procedimientos conocidos. Por ejemplo, la transformación puede realizarse, por ejemplo, mediante el método del cloruro de calcio, el método de electroporación, el método del cloruro de rubidio, el método de lipofección, el método del DEAE-dextrano, el método del litio, el método del esferoplasto, procedimientos que usan virus, o similares, y la transducción puede realizarse, por ejemplo, mediante el método de B. Hohn (Method in Enzymology, 68, 299 - 309, 1979), el método del empaquetado descrito en Meyerowitz, E. M., Gvild, G. H., Prestidge, L. S. y Honess, S. S., Gene, 11, 271 (1980), o similares.

(2) Cultivo de las células hospedadoras

50 La HABP de la presente invención puede producirse cultivando la célula hospedadora transfectada por un virus que tiene un vector de expresión recombinante integrado con el polinucleótido de la presente invención obtenido mediante el procedimiento descrito anteriormente, o un transformante obtenido transformando la célula hospedadora con el vector de expresión recombinante en un medio apropiado adecuado para las células hospedadoras (transformantes), produciendo la HABP de la presente invención en el cultivo y separando y purificando la proteína del cultivo.

Preferiblemente, el medio contiene una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno inorgánico o una fuente de nitrógeno orgánico, que son necesarios para el crecimiento de la célula hospedadora (transformante). La fuente de carbono incluye, por ejemplo, glucosa, dextrano, almidón soluble, sacarosa, y similares. La fuente de nitrógeno inorgánico o la fuente de nitrógeno orgánico incluyen, por ejemplo, sales de amonio, sales de nitrato, aminoácidos, licor de maíz fermentado, peptona, caseína, extracto de carne, harina de soja, extracto de patata y similares. Además, pueden contener otros nutrientes (por ejemplo, cloruro cálcico, dihidrogenofosfato sódico o cloruro de magnesio), vitaminas o antibióticos, si fuera necesario.

El cultivo se realiza mediante el procedimiento conocido en la técnica. Las condiciones de cultivo, por ejemplo, temperatura, pH del medio y tiempo de fermentación, se eligen de forma que se obtenga el mayor título de la HABP de la presente invención.

En esta relación, el medio y las condiciones de cultivo específicos se ejemplifican a continuación, pero la presente invención no se limita en modo alguno a los mismos.

Cuando la célula hospedadora es una célula de insecto, el medio incluye, por ejemplo, medio TNM-FH, medio de insecto de Grace [Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., (1985) 82, 8404], medio Sf-100 II SFM (producido por Life Technologies, Inc.), ExCell 400 y ExCell 405 (ambos producidos por JRH Biosciences, Inc.). Alternativamente, puede usarse en estos medios un medio al que se añade suero bovino fetal (FCS) o similares. Deseablemente, el pH del medio es de 5 a 8.

La célula hospedadora transfectada por el Baculovirus recombinante obtenido anteriormente se cultiva habitualmente a entre 20 y 40°C, preferiblemente a entre 25 y 30°C durante entre 12 horas y 10 días, y puede llevarse a cabo una aireación o una agitación, si fuera necesario.

Cuando la célula hospedadora es una bacteria, actinomices, levaduras u hongos filamentosos, por ejemplo, es adecuado un medio líquido que contiene las fuentes de nutrientes descritas anteriormente. En este caso el pH es deseablemente de 5 a 8.

Cuando la célula hospedadora es *E. coli*, el medio preferido para su cultivo incluye medio LB, medio 2YT y se ejemplifican Terrific Broth, medio M9 [Molecular Cloning, 3<sup>a</sup> ed., Apéndice 2.2 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York]. En este caso el cultivo puede realizarse habitualmente a entre 14 y 42°C, preferiblemente a entre 28 y 39°C, durante aproximadamente entre 3 y 24 horas, con aireación o agitación, si fuera necesario.

Cuando la célula hospedadora es una bacteria del género *Bacillus*, el cultivo puede realizarse habitualmente a entre 14 y 42°C, preferiblemente a entre 28 y 39°C, durante aproximadamente entre 3 y 96 horas, con aireación o agitación, si fuera necesario.

Cuando la célula hospedadora es una levadura, el medio incluye, por ejemplo, medio YPD (Molecular Cloning, 3<sup>a</sup> ed., Apéndice 2.2 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York). El pH es deseablemente de entre 5 y 8. El cultivo puede realizarse habitualmente a entre 14 y 42°C, preferiblemente a entre 28 y 35°C, durante aproximadamente entre 12 horas y 10 días, con aireación o agitación, si fuera necesario.

Cuando la célula hospedadora es una célula animal, por ejemplo, puede usarse como medio el medio MEM que contiene entre el 5 y el 20% de FCS [Science, (1952) 122, 501], el medio DMEW [Virology, (1959) 8, 396], el medio RPMI 1640 [J. Am. Med. Assoc., (1967) 199, 519], el medio 199 [proc. SSoc. Exp. Biol. Med., (1950) 73, 1], el medio Daigo T2 (producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), y similares. Preferiblemente, el pH del medio es de aproximadamente 6 a 8, el cultivo puede realizarse habitualmente a entre 30 y 40°C, preferiblemente a entre 34 y 38°C, durante aproximadamente entre 12 y 72 horas, con aireación o agitación, si fuera necesario.

(3) Preparación de la HABP de la presente invención.

Las células se retiran del cultivo obtenido en el anteriormente descrito (2) llevando a cabo un procedimiento tal como filtración, centrifugación o similares, y se recupera el filtrado del cultivo o el sobrenadante del cultivo. Después de eso, la HABP de la presente invención se separa y se purifica a partir del filtrado del cultivo o del sobrenadante del cultivo según procedimientos convencionales usados habitualmente para separar y purificar una proteína natural o sintética.

El procedimiento para la separación y la purificación de la HABP de la presente invención incluye un procedimiento conocido que utiliza la solubilidad, tal como el procedimiento de la precipitación salina, el procedimiento de precipitación con disolvente o similares; un procedimiento que utiliza la diferencia en pesos moleculares tal como diáisis, ultrafiltración, cromatografía de filtración en gel, electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato sódico, y similares; un procedimiento que utiliza la carga eléctrica tal como cromatografía de intercambio iónico, y similares; un procedimiento que utiliza la afinidad específica tal como la cromatografía de afinidad, y similares; un procedimiento que utiliza las diferencias en la naturaleza hidrófoba tal como la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa, y similares; un procedimiento que utiliza la diferencia en el punto isoeléctrico tal como la electroforesis de isoelectroenfoque, y similares; y así sucesivamente.

Por otro lado, cuando la HABP de la presente invención está presente en el periplasma o dentro del citoplasma del cultivo transformante, las células con las bacterias cultivadas se recogen sometiendo el cultivo a un procedimiento convencional tal como filtración, centrifugación o similares, después se suspenden en una disolución tampón adecuada. Después de eso, la pared celular y/o la membrana celular se disagregan mediante un procedimiento tal como, por ejemplo, aplicación de ultrasonidos, tratamiento con lisozima, congelación y descongelación, y similares, y después se obtiene el extracto bruto que contiene la HABP de la presente invención mediante un procedimiento tal como centrifugación, y similares. Y después, la HABP de la presente invención puede separarse del extracto bruto y purificarse según el procedimiento convencional ejemplificado anteriormente.

Para identificar la HABP de la presente invención, el método de inmunotransferencia western, el método ELISA, o similares, en el que se usa como sonda un anticuerpo con reactividad frente a la HABP de la presente invención.

La proteína que puede obtenerse de dichas formas incluye, por ejemplo, la proteína con la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2 ó 4.

Además, la HABP de la presente invención puede producirse mediante un procedimiento de producción química general según la secuencia de aminoácidos de la misma. Por ejemplo, la HABP de la presente invención puede producirse mediante un procedimiento habitual de síntesis química tal como el método del fluorenilmetiloxicarbonilo (el método del Fmoc), el método del t-butiloxicarbonilo (el método del t-Boc), y similares. Además, la proteína puede sintetizarse químicamente usando un equipo de síntesis de péptidos disponible comercialmente.

El procedimiento para medir el ácido hialurónico de la presente invención incluye, por ejemplo, un procedimiento de poner en contacto el ácido hialurónico de una muestra con la HABP de la presente invención para formar un complejo entre el ácido hialurónico y la HABP de la presente invención, haciendo reaccionar después el complejo con un portador que soporte un anticuerpo anti-HABP, medir un cambio óptico mediante el aglutinado obtenido en la reacción y calcular la cantidad de ácido hialurónico a partir del valor medido.

En esta relación, la medición del cambio óptico descrito en el presente documento significa la medición del cambio óptico provocado por la formación de la inmunoaglutinación, y más específicamente, en esta categoría se incluyen los procedimientos de inmunoaglutinación tales como el procedimiento de aglutinación pasiva inversa, el inmunoensayo nefelométrico y el inmunoensayo turbidimétrico. Estos procedimientos de medida pueden realizarse según el procedimiento bien conocido *per se*. Cuando se va a emplear el procedimiento de aglutinación pasiva inversa, el procedimiento puede realizarse según el procedimiento descrito en, por ejemplo, "Successive Course on Biochemical Experiment 5: Investigative Approach to Immunobiochemistry", Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd., págs. 36 - 37, "A Manual of Clinical Laboratory Method", 30<sup>a</sup> ed., Kanehara & Co., Ltd., págs. 844 - 845, y cuando se va a emplear el inmunoensayo nefelométrico, el procedimiento puede realizarse según el procedimiento descrito en, por ejemplo "A Manual of Clinical Laboratory Test", 30<sup>a</sup> ed., Kanehara & Co., Ltd., págs. 851 - 853, y cuando se va a emplear el inmunoensayo turbidimétrico, el procedimiento puede realizarse según el procedimiento descrito en, por ejemplo "A Manual of Clinical Laboratory Method", 30<sup>a</sup> ed., Kanehara & Co., Ltd., págs. 853 - 854.

Un anticuerpo anti-HABP que se va a usar para la medición del ácido hialurónico de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, siempre que el anticuerpo tenga reactividad frente a la HABP de la presente invención. Es preferible un anticuerpo policlonal purificado mediante purificación de afinidad con un único epítopo, o un anticuerpo monoclonal. Es particularmente preferible un anticuerpo monoclonal capaz de unirse eficazmente a la HABP de la presente invención. De entre ellos es preferible el uso de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y similares producidos mediante la apropiada digestión de estos anticuerpos con una enzima tal como pepsina y papaína. Cuando se usa un anticuerpo policlonal como el anticuerpo anti-HABP, el anticuerpo puede prepararse mediante un procedimiento convencional de inmunización de un animal tal como un caballo, una vaca, una oveja, un conejo, una cabra, una rata o un ratón, con la HABP de la presente invención, según los procedimientos descritos en, por ejemplo, "Matsuhashi, T. y col., Introduction to Experimental Immunology, 2<sup>a</sup> ed., 1981, Japan Scientific Societies Press". Cuando se usa un anticuerpo monoclonal como el anticuerpo anti-HABP, el anticuerpo puede prepararse según un procedimiento convencional, a saber, la tecnología de fusión celular establecida por Kohler y Milstein (G. Kohler y C. Milstein: Nature, 256, 495 (1975)), por ejemplo, usando una célula de mieloma obtenida fusionando una línea celular derivada de mieloma de ratón con células de bazo de ratón que han sido previamente inmunizadas con la HABP de la presente invención. Además, en la presente invención puede usarse un anticuerpo producido usando un agrecano bovino con una secuencia de aminoácidos conocida o un agrecano bovino natural como antígeno, en lugar de la HABP de la presente invención, como el "anticuerpo anti-HABP".

Como portador usado para la medición del ácido hialurónico puede adoptarse cualquiera de los vehículos usados habitualmente en las mediciones inmunológicas, específicamente como aquellos preferibles están incluidos los vehículos preparados a partir de, por ejemplo, sustancias poliméricas orgánicas naturales tales como eritrocitos, bacterias, fragmentos celulares, y similares; conjuntos de moléculas tales como liposomas, micelas poliméricas, y similares; compuestos de polímeros sintéticos tales como poliestireno, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, poliacrilamida, metacrilato de poliglicidilo, polipropileno, cloruro de polivinilo, polietileno, policlorocarbonato, resina de silicona, caucho de silicona, y similares; sustancias inorgánicas tales como vidrio poroso, vidrio molido, alúmina, gel de sílice, carbón activo y óxidos metálicos. Además, estos vehículos pueden usarse en diversas formas tales como tubo, perla, chip de tipo disco, micropartícula o partícula de látex. De entre ellas es particularmente preferible la

- partícula de látex desde los puntos de que, por ejemplo, el tratamiento químico de la superficie del portador puede llevarse a cabo fácilmente según sea apropiado para cualquier fin porque el material portador es un polímero artificial y que apenas se produce una reacción inespecífica. Con respecto a la calidad del material, no hay limitación específica, pero preferiblemente incluye, por ejemplo, partículas de látex de tipo estireno tales como partículas de látex de poliestireno y partículas de látex de tipo ácido acrílico.
- En esta relación, de entre estas partículas de látex, son particularmente preferibles las partículas de látex de poliestireno y similares que se preparan mediante una reacción de polimerización en emulsión sin el uso de un agente emulsionante. Debido a que tienen una superficie con una fuerte naturaleza hidrófoba, las proteínas o los péptidos pueden adsorberse suavemente, y también porque tienen una carga superficial negativa y provocan una repulsión mutua entre ellas, y pueden dispersarse de forma estable en una disolución incluso en ausencia de un agente emulsionante. Además, también pueden usarse diversas partículas de látex modificadas (por ejemplo, una partícula de látex modificada con ácido carboxílico producida mediante la introducción de un grupo carboxilo en el poliestireno descrito anteriormente), una partícula de látex magnética (una partícula magnética encapsulada en látex), y similares.
- Además, con respecto a las partículas de látex que se van a usar para la medición del ácido hialurónico, las partículas de látex disponibles comercialmente con un diámetro medio de partícula pequeño, a saber, con una gran área superficial por peso unitario, son capaces de soportar eficazmente el anticuerpo y también proporcionan una buena estabilidad de almacenamiento (buena dispersibilidad en una disolución), y por lo tanto, se usan preferiblemente. Más específicamente, el diámetro medio de partícula es habitualmente de 0,05 a 0,5  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$ . Usando dichas partículas de látex con un tamaño medio de partícula pequeño puede evitarse la deposición de la partícula y puede conseguirse el soporte eficaz del anticuerpo anti-HABP sobre las partículas de látex. Esto es, mediante el uso de dichos anticuerpos soportados sobre partículas de látex, puede conseguirse tanto un aumento en la estabilidad del reactivo de medición como una elevada precisión en la medición.
- El procedimiento de soportar el anteriormente descrito anticuerpo anti-HABP sobre el anteriormente descrito portador puede realizarse sin limitación específica, poniendo en contacto el anticuerpo anti-HABP con el portador. Pueden incluirse todos los métodos de soporte bien conocidos *per se* usados habitualmente en este campo, y por ejemplo, como procedimiento ejemplar, el procedimiento de soportar el anticuerpo anti-HABP sobre el portador mediante adsorción física, el denominado procedimiento de adsorción física (con referencia al documento JP-A-1993-41946; SUMILON Technical Report, SUMILON ELISA series 1 Introduction to ELISA Method, publicado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd.; SUMILON Technical Report, SUMILON ELISA series 2 Solid Phase Surface of ELISA Products, publicado por Sumitomo Bakelite Co., Ltd., y así sucesivamente) se incluyen como ejemplos representativos. El procedimiento mencionado anteriormente se usa habitualmente como procedimiento preferible cuando, por ejemplo, se usa como portador compuestos de polímeros sintéticos tales como poliestireno, polipropileno, cloruro de polivinilo, polietileno, policlorocarbonato y similares; carbón activo; sustancias inorgánicas tales como vidrio poroso, vidrio molido, alúmina, gel de sílice, óxidos metálicos, hidroxiapatito, y similares. De entre ellos es particularmente preferible cuando se usa vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo y similares en forma de, por ejemplo, tubo, perla, chip en disco, micropartícula o partícula de látex.
- Además, cuando se usa un portador disponible comercialmente, el anticuerpo anti-HABP puede ser soportado sobre el portador según el procedimiento de soporte recomendado en las instrucciones del mismo.
- Tomando como ejemplo un caso en el que el anticuerpo anti-HABP está soportado sobre partículas de látex, las partículas de látex se añaden de forma que la concentración sea habitualmente del 0,1 al 10% (p/v), preferiblemente del 0,2 al 5% (p/v), y se suspenden en un disolvente tal como una disolución tampón que contiene habitualmente de 0,05 a 2 mg/ml, preferiblemente de 0,1 a 1 mg/ml de un anticuerpo anti-HABP, y después de reaccionar habitualmente a entre 5 y 30°C y habitualmente durante entre 2 y 3 horas, se llevan a cabo tratamientos posteriores realizados habitualmente en este campo tales como, por ejemplo, centrifugación, tratamiento de bloqueo usando una disolución que contiene una proteína apropiada tal como albúmina sérica bovina (BSA), y por lo tanto se desarrolla el proceso de soporte. En esta relación también puede conseguirse el soporte del anticuerpo anti-HABP sobre un portador mediante procedimientos de unión química usados habitualmente en este campo.
- Tomando el inmunoensayo turbidimétrico que usa un portador de partículas de látex como ejemplo, se describirá más específicamente a continuación el procedimiento para medir el ácido hialurónico usando la HABP de la presente invención. Esto es, una muestra que contiene el ácido hialurónico (más específicamente, por ejemplo, fluidos corporales tales como sangre, plasma, suero, líquido sinovial, líquido pleural, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y orina) se pone en contacto y se mezcla con un reactivo que contiene la anteriormente descrita HABP para formar el complejo de ácido hialurónico/HABP de la presente invención. Entonces, por ejemplo, se soporta (sensibiliza) un reactivo, en el que se ha soportado el anteriormente descrito anticuerpo anti-HABP sobre partículas de látex con un diámetro medio de partícula de, por ejemplo, 0,05 a 0,5  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de 0,1 a 0,4  $\mu\text{m}$ , se hace reaccionar con el complejo descrito anteriormente. El grado de la aglutinación resultante se mide, por ejemplo, mediante la absorbancia, y se determina la concentración a partir de una curva de calibración preparada preliminarmente usando una muestra estándar, y por lo tanto, se ensaya la cantidad de ácido hialurónico de una muestra.
- En esta relación, el procedimiento de medición de la absorbancia puede realizarse habitualmente a una longitud de

onda de entre 340 y 1.000 nm, preferiblemente a entre 500 y 900 nm. Además, la determinación del grado de aglutinación no se limita a la medición de la absorbancia; el grado puede medirse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos *per se*, por ejemplo, mediante nefelometría o mediante inmunoensayo de recuento.

5 Además, cuando se hace reaccionar el complejo de ácido hialurónico/HABP de la presente invención con un reactivo que contiene un anticuerpo anti-HABP que ha sido soportado sobre un portador tal como partículas de látex (en lo sucesivo puede denominarse anticuerpo anti-HABP soportado sobre portador), puede añadirse un agente acelerante de la aglutinación apropiado.

10 En el procedimiento de medición del ácido hialurónico usando la HABP de la presente invención, la concentración en uso de la HABP de la presente invención en las reacciones de la HABP es, aunque puede variar dependiendo del límite de detección del ácido hialurónico que se establezca, habitualmente igual o superior a la concentración que sea capaz de unirse a toda la cantidad de ácido hialurónico correspondiente a la concentración establecida en el límite de detección, preferiblemente 5 veces o más, más preferiblemente 10 veces o más de la concentración establecida en el límite de detección. En esta relación, la concentración límite superior de ácido hialurónico en esta ocasión no tiene límite, considerando la cantidad económica de ácido hialurónico, la concentración es habitualmente de 15 50.000 veces o menos, preferiblemente de 10.000 veces o menos. Específicamente, la concentración es habitualmente de entre 0,1 y 1.000 µg/ml, preferiblemente de entre 0,5 y 1.000 µg/ml, y más preferiblemente de entre 0,5 y 100 µg/ml. Por ejemplo, cuando se mide la concentración de ácido hialurónico en suero, como el límite de determinación habitual es desde 10 hasta 1.000 ng/ml, la concentración en uso de la HABP de la presente invención en la reacción de la HABP puede establecerse por tanto apropiadamente dentro del intervalo 20 anteriormente descrito basado en el límite de determinación.

25 Además, con respecto al pH de la reacción, el intervalo del mismo no está limitado específicamente siempre que no inhiba la formación del complejo, y habitualmente está entre 5 y 10, preferiblemente entre 6 y 8. También, con respecto a la temperatura de la reacción, el intervalo de la misma no está limitado específicamente siempre que no inhiba la formación del complejo, y habitualmente es de entre 5 y 40°C. Además, la reacción puede realizarse durante entre varios segundos hasta varias horas según sea apropiado según cada condición.

30 En el procedimiento para medir el ácido hialurónico que usa la HABP de la presente invención, la concentración en uso del anticuerpo anti-HABP soportado sobre el portador en la reacción entre el anticuerpo anti-HABP soportado sobre el portador y el complejo de ácido hialurónico/HABP de la presente invención es, aunque puede variar dependiendo de la concentración en uso de la HABP de la presente invención en la reacción anterior, habitualmente de entre 0,2 y 25 mg/ml, preferiblemente de entre 0,5 y 12 mg/ml cuando se usan partículas de látex con una cantidad de soporte de anticuerpo de entre 0,01 y 0,1 mg/mg del anticuerpo anti-HABP, y si está en el intervalo de 35 concentraciones descrito anteriormente, el ácido hialurónico de una muestra puede medirse con un alto grado de precisión. En esta relación, la condición y el tiempo de la reacción del anticuerpo anti-HABP soportado sobre el portador con el complejo de ácido hialurónico/HABP de la presente invención puede realizarse según aquellas en las que la HABP de la presente invención se hace reaccionar con ácido hialurónico.

40 El kit de reactivos para la medición del ácido hialurónico de la presente invención es aquel que comprende la HABP de la presente invención como un constituyente.

45 Además, el kit puede contener un reactivo que contiene el anticuerpo anti-HABP soportado sobre un portador. Además, el kit puede contener una sustancia estándar usada habitualmente en este campo tal como, por ejemplo, hialuronato potásico (derivado de cresta de gallo, producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y hialuronato sódico (derivado de especies de *Streptococcus*, producido por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

50 La HABP comprendida en el kit de reactivos para la medición del ácido hialurónico de la presente invención puede ser un reactivo que comprende la HABP de la presente invención, y puede disolverse la HABP de la presente invención en una disolución tampón apropiada. Como agentes tamponantes usados con este fin, puede adoptarse cualquier tipo de agente tamponante usado habitualmente en las mediciones inmunológicas, por ejemplo, agente tamponante Tris, agente tamponante de fosfato, agente tamponante veronal, agente tamponante de ácido bórico y agente tamponante Good, y la concentración de dicho agente tamponante es habitualmente de entre 5 y 300 mM, preferiblemente de entre 10 y 150 mM, y el pH es habitualmente de entre 5 y 10, preferiblemente de entre 6 y 8, y la concentración y el pH se eligen apropiadamente a partir de los correspondientes intervalos descritos anteriormente.

55 Con respecto a la concentración de la HABP de la presente invención en el anterior reactivo que comprende la HABP de la presente invención, la concentración en la reacción puede establecerse para que sea la misma concentración a la descrita anteriormente, y puede elegirse apropiadamente de forma que esté en el intervalo de desde 0,1 hasta 500 µg/ml, preferiblemente desde 0,5 hasta 100 µg/ml.

60 El reactivo que comprende el anticuerpo anti-HABP soportado sobre un portador en el kit de reactivos para la medición del ácido hialurónico de la presente invención puede ser aquel que comprende el anteriormente descrito anticuerpo anti-HABP soportado sobre un portador. El reactivo es aquel en el que el anticuerpo anti-HABP soportado sobre un portador se suspende en una disolución tampón adecuada o aquel liofilizado del mismo. El agente tamponante que se va a usar con este fin puede ser cualquier tipo de agente tamponante siempre que no tenga un carácter que altere al anticuerpo anti-HABP implicado en la presente invención con la HABP de la presente

invención, e incluye los mismos agentes tamponantes para el reactivo descrito anteriormente que comprende la HABP de la presente invención. De forma análoga, el pH y la concentración del mismo también pueden establecerse según los valores descritos anteriormente.

Además, el reactivo que comprende un anticuerpo anti-HABP soportado sobre un portador se proporciona en 5 muchos casos en forma de suspensión, suspendido en una disolución tal como una disolución tampón. Como disolución tampón usada para preparar dicha suspensión se adopta cualquiera usada habitualmente en este campo sin limitación específica, y habitualmente aquella con una acción tamponante a un pH de entre 5,0 y 10,0, preferiblemente alrededor de pH neutro, de pH 6,5 a 8,5, por ejemplo, es preferible tampón de fosfato, tampón Tris o 10 tampón Good. En esta relación, dependiendo de las características de las micropartículas insolubles, alguna presenta tendencia a agregarse naturalmente dejándola en estado suspendido. En dicho caso, es bastante más preferible el uso de una disolución tampón suavemente alcalina tal como tampón de glicina o tampón de ácido bórico 15 para la preparación de la suspensión, desde un punto de vista de estabilidad de almacenamiento. Además, la concentración del agente tamponante en estos tampones se elige apropiadamente en el intervalo de desde 10 hasta 500 mM, preferiblemente desde 10 hasta 300 mM. En esta relación, en el reactivo puede añadirse, por ejemplo, un agente estabilizante tal como un azúcar, una proteína y un agente activador superficial, una sal tal como Nad y una sustancia conservante, y similares, en el intervalo usado habitualmente en este campo.

Cuando el anticuerpo anti-HABP soportado sobre un portador implicado en la presente invención se suspende en 20 una disolución tampón descrita anteriormente, la concentración del anticuerpo anti-HABP soportado sobre un portador en la reacción puede establecerse, aunque puede variar dependiendo del tipo de anticuerpo anti-HABP usado, para que sea la misma concentración a la descrita anteriormente, y puede elegirse apropiadamente de forma que esté habitualmente dentro de un intervalo de desde 0,1 hasta 100 mg/ ml, preferiblemente desde 2 hasta 50 mg/ ml.

Además, en el reactivo que comprende el anticuerpo anti-HABP soportado sobre un portador implicado en la 25 presente invención, puede coexistir un acelerante de la reacción inmunológica (acelerante de la reacción de aglutinación) (por ejemplo, polietilenglicol y alcohol polivinílico) en el intervalo de concentraciones usado habitualmente en este campo, e incluso con la coexistencia de dicho acelerante de la reacción de aglutinación, el aspecto de la turbidez inespecífica del constituyente proteico desnaturalizado del agente de medición, que es provocado por algún tipo de factor, puede evitarse o reducirse mediante el procedimiento de la presente invención. Además, puede contener un monómero o un polímero usado como acelerante de la aglutinación descrito en el 30 documento JP-A-2002-365296, un acelerante de la aglutinación en el reactivo descrito anteriormente, y el intervalo de concentraciones del mismo puede elegirse según el valor descrito en el documento JP-A-2002-365296. En esta relación, el monómero o el polímero pueden prepararse según el procedimiento descrito en la anterior solicitud de patente.

Como muestra implicada en la presente invención puede adoptarse cualquier mezcla que contenga ácido 35 hialurónico, y específicamente incluye, por ejemplo, fluidos corporales tales como sangre, plasma, suero, líquido sinovial, líquido pleural, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo y orina, y como muestra preferible de entre ellas se incluyen suero, orina, y similares.

En lo sucesivo se explicará más específicamente la presente invención con referencia a los Ejemplos, pero la presente invención no se limita a los mismos en modo alguno.

#### 40 Ejemplo 1

##### (1) Recuperación del ARN

Se recuperó el ARN total a partir de cartílago bovino del septo nasal usando el kit RNeasy Lipid Tissue producido por 45 QIAGEN GmbH según el protocolo del kit, según se describe a continuación.

En primer lugar se añadió el cartílago bovino del septo nasal (producido en Nueva Zelanda) (1 g) a un tubo que 50 contenía reactivo QIAzol Lysis (5 ml) que acompañaba al kit, y el tejido se desgregó usando un homogeneizador Polytron.

Después de incubar el homogeneizado obtenido a temperatura ambiente durante 5 minutos, se añadió cloroformo (1 ml) al mismo. La mezcla se agitó durante 15 segundos, y se incubó adicionalmente a temperatura ambiente durante 55 3 minutos. Después de eso, el homogeneizado se centrifugó a 4°C a 5.000 x G durante 15 minutos, después la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se añadió al mismo un volumen igual de etanol al 70%. Después de agitar, se transfirió la disolución obtenida (3 ml) al tubo de recolección (15 ml) del conjunto RNeasy Midi Spin Column que acompaña al kit, y la columna se centrifugó a 25°C a 3.000 x G durante 5 minutos. Mediante este procedimiento, el ARN total unido a la membrana de RNeasy Midi Spin Column. Entonces se añadió el tampón RW1 (4 ml) que acompaña al kit a la columna, y se centrifugó a 25°C a 3.000 x G durante 5 minutos. Después de eso se añadió tampón RPE (2,5 ml) y se centrifugó a 25°C a 3.000 x G durante 2 minutos. Además, se añadió tampón RPE (2,5 ml) y se centrifugó a 25°C a 3.000 x G durante 5 minutos.

La columna RNeasy Midi Spin con el ARN total unido se transfirió a un nuevo tubo de recolección. Se añadió agua esterilizada (150 µl) a la membrana de la columna RNeasy Midi Spin, y la columna se centrifugó a 25°C a 3.000 x G

durante 3 minutos, y este procedimiento se repitió dos veces para eluir el ARN total de la membrana. Se midió la absorbancia del eluido obtenido para confirmar que se recuperaron 500 µg de ARN total a partir de 1 g de cartílago bovino del septo nasal.

La electroforesis se realizó con la disolución del ARN total recuperado (5 µl) en gel de agarosa al 1%.

5 Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 1.

Como resulta evidente a partir de la Fig. 1, pudieron identificarse claras bandas de ARNr 18s y ARNr 28s, y se confirmó que pudo recuperarse el ARN total sin descomposición mediante el procedimiento descrito anteriormente.

(2) Purificación del ARNm

10 Usando Oligotex™-dT30 <Super> (producido por Takara Bio, Inc.), se purificó el ARNm mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar se añadió tampón de elución (que acompañaba al kit) (250 µl) a una disolución acuosa del ARN total (250 µl) obtenida en el anterior (1), y se añadió Oligotex™-dT30 (500 µl) adicional a la misma. La disolución se incubó a 65°C durante 5 minutos, después de lo cual la disolución de reacción se dejó en hielo durante 3 minutos. A la disolución de reacción se añadió NaCl 5 M (0,1 ml), y la disolución se incubó a 37°C durante 15 minutos. La disolución de reacción se centrifugó a 15.000 rpm durante 3 minutos, se retiró el sobrenadante y se disolvió el sedimento en TE (tampón Tris-EDTA, pH 8,0) (450 µl). Después de eso, la disolución se incubó a 65°C durante 5 minutos y se dejó en hielo durante 3 minutos. Después de eso, la disolución se centrifugó a 15.000 rpm durante 3 minutos y se recuperó el sobrenadante (400 µl). Después de un tratamiento de precipitación con etanol convencional, el precipitado se disolvió en TE (10 µl) para obtener una disolución de ARNm purificada.

(3) Preparación del ADNc y clonación mediante PCR

20 La síntesis del ADNc se realizó mediante PCR usando el ARNm purificado obtenido en el anterior (2), según se describe a continuación.

1) Cebador

25 Basándonos en la secuencia genética conocida del agrecano de *Bos Taurus* que ha sido desvelada en la base de datos del DDBJ (Banco de Datos de ADN de Japón), se diseñaron las siguientes secuencias de cebadores y se sintetizaron mediante procedimientos de síntesis convencionales. Los cebadores tienen una secuencia correspondiente a una parte de la secuencia de nucleótidos conocida que codifica para la secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal hasta la posición 692, incluyendo el anteriormente descrito conocido sitio de unión al ácido hialurónico del agrecano de *Bos Taurus*. Además, en el cebador directo y en el cebador inverso se inserta una secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos del sitio de la enzima de restricción de EcoRI, y además se añade el codón de terminación en el cebador inverso.

Secuencias del cebador

cebador directo atgaattcatgaccacttactcttgggtttg (ID. SEC. N°: 5)  
cebador inverso atgaattctcatggagaggcgccgctgaaacacc (ID. SEC. N°: 6)

2) PCR

35 Usando una combinación de los cebadores descritos anteriormente y el ARNm purificado obtenido en el anterior (2) como molde, se amplificó el ADNc con una secuencia similar a la secuencia de nucleótidos conocida que codifica para la secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal hasta la posición 692, que incluye el conocido sitio de unión al ácido hialurónico del agrecano de *Bos Taurus*, mediante el procedimiento convencional de replicación de ADNc a partir de ARNm mediante PCR.

40 La PCR se realizó en las siguientes condiciones de reacción. Después de calentar a 98°C durante 2 minutos, se repitieron 30 ciclos a 95°C durante 15 segundos, a 63°C durante 30 minutos, y a 68°C durante 2 minutos, y finalmente se realizó un tratamiento a 68°C durante 5 minutos. Condiciones de reacción de la PCR:

Agua esterilizada:	71 µl
Disolución de ARN:	1 µl
Cebador directo:	1 µl
Cebador inverso:	1 µl
MgCl <sub>2</sub> :	4 µl
dNTP (la mezcla de dATP, dGTP, dCTP, dTTP):	10 µl
Disolución tampón:	10 µl
KOD:	2 µl

El producto obtenido de la PCR contiene una secuencia de nucleótidos del sitio de la enzima de restricción de EcoRI. Por lo tanto, el producto de la PCR se digirió y se cortó en este sitio de la enzima de restricción.

El fragmento de producto de la PCR obtenido se sometió a una electroforesis en gel de agarosa al 1% que contenía 1 µg/ ml de bromuro de etidio.

Los resultados se muestran en la Fig. 2. En la Fig. 2, el carril 1 muestra el resultado cuando se usó como muestra el marcador 6 de ADN (λ/Sty I, producido por Nippon Gene, Co., Ltd.), que es un marcador de peso molecular, y el carril 2 muestra el resultado cuando se usó como muestra un fragmento del producto de la PCR. Además, la flecha muestra una fracción del fragmento del producto de la PCR.

Como resulta evidente a partir de la Fig. 2, se identificó una banda principal en la posición de aproximadamente 2.100 pb (la fracción indicada con la flecha en la Fig. 2).

Esta fracción se cortó, y el fragmento del producto de la PCR se purificó usando GENEPURE (producido por Nippon Gene, Co., Ltd.).

(4) Preparación del vector recombinante y determinación de la secuencia de nucleótidos

Después de eso, usando el kit Baculogold Starter (producido por Becton Dickinson & Co.), se preparó un vector recombinante cortando el fragmento del producto de la PCR preparado en el anterior (3) en el sitio EcoRI, que está secuencia abajo del promotor de la polihedrina del vector de transferencia pVL1392 para la célula de insecto que acompaña al kit. Dado que el vector recombinante obtenido se insertó en la misma secuencia de nucleótidos que el ADNc obtenido en el anterior (3)2), en lo sucesivo, el vector recombinante obtenido se describirá como "pVL1392/ADNc".

Usando como molde el vector recombinante pVL1392/ADNc (200 ng) y una combinación de los cebadores usados en el anterior (3) 1), se realizó una PCR usando el kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (producido por GE Healthcare Life Sciences, Co.) según el procedimiento descrito en el manual adjunto para obtener un producto de PCR.

(5) Búsqueda de homologías en la secuencia de nucleótidos

La descodificación del producto obtenido en la PCR (con la misma secuencia de nucleótidos que el ADNc obtenido en el anterior (3)) se realizó usando BaseStation (producido por Biorad Laboratories, Inc.).

Después de eso se realizó una búsqueda de homologías (BLAST) en la secuencia de nucleótidos del producto obtenido en la PCR usando la base de datos del DDBJ (Banco de Datos de ADN de Japón). Como resultado se reveló que la secuencia de nucleótidos del producto obtenido en la PCR, es decir la secuencia de nucleótidos del ADNc, mostraba una elevada homología con la secuencia génica conocida del agrecano de *Bos Taurus*.

A saber, en la secuencia génica conocida del agrecano de *Bos Taurus*, las bases que codifican para los aminoácidos de las posiciones 129 a 130 a partir del N-terminal (Ile - Leu) eran "ATTCTA", mientras que las bases del ADNc obtenido en las posiciones correspondientes, es decir, en las posiciones 388 a 393, eran "ATCTAT". Se encontró que las secuencias de nucleótidos en otras partes eran idénticas entre sí.

A partir de los hechos descritos anteriormente, se confirmó que la secuencia de nucleótidos del ADNc obtenida en el anterior (3) era la secuencia mostrada en la ID. SEC. Nº: 3, y el vector recombinante (pVL1392/ADNc) obtenido en el anterior (4) era un vector recombinante en el que estaba integrado el ADNc.

Además, la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos de la ID. SEC. Nº: 3 estimada a partir de la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. Nº: 3 es la secuencia de aminoácidos que consiste en 692 aminoácidos en la longitud total mostrada en la ID. SEC. Nº: 4. La secuencia de aminoácidos se comparó con la secuencia completa conocida de 2.327 aminoácidos del agrecano de *Bos Taurus*. Como resultado, en la secuencia conocida de aminoácidos del agrecano de *Bos Taurus*, un aminoácido en la posición 131 a partir del N-terminal era leucina, mientras que un aminoácido en la posición 131 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. Nº: 4 era tirosina. Como en las secuencias de aminoácidos de otras partes, una secuencia a partir del N-terminal hasta un residuo de aminoácido en la posición 692 de los 2.327 aminoácidos completos del agrecano conocido de *Bos Taurus* y una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. Nº: 4 eran idénticas.

(6) Preparación de Baculovirus

Se preparó el Baculovirus integrado en el ADNc mediante el siguiente procedimiento, usando el kit Baculogold Starter (producido por Becton Dickinson & Co.).

En primer lugar se mezcló el ADN linealizado de Baculovirus (virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* modificado: AcNPV) (0,5 µg) que acompaña al kit, con el vector recombinante pVL1392/ADNc obtenido en el anterior (4), y se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y después se mezcló con tampón B (1 ml) para elaborar una disolución de ADN.

En medio TNH-FH (4 ml) que contenía FCS al 10%, se cultivaron células sf9, y el medio fue sustituido por tampón A (1 ml), y el contenido celular se ajustó a  $2 \times 10^6/25 \text{ cm}^2$ . La disolución de ADN (1 ml) preparada según se ha descrito

anteriormente se vertió gota a gota el mismo, y la mezcla se incubó a 27°C durante 4 horas para que se realizara la cotransfección. Después de eso, las células sf9 se lavaron con medio TNM-FH nuevo y se añadió de nuevo medio TNM-FH (3 ml), y la mezcla se cultivó durante 3 días.

5 Dado que el virus recombinante en el que el vector recombinante pVL1392/ADNc se integró en el ADN genómico del mismo surgió en el cultivo, después de cultivar las células sf9 durante 3 días, se recuperó el medio de cultivo.

(7) Expresión de la HABP de la presente invención

El número de virus recombinantes en el medio de cultivo obtenido en el anterior (6) se examinó mediante un procedimiento de ensayo convencional en placa.

10 Después de esto, el virus recombinante se transfeció en las células sf9 a una MOI de 5, y se incubó en medio de insecto de Grace que contenía FCS al 10% a 27°C durante 4 días.

Después del cultivo, el medio de cultivo se centrifugó y se recuperó el sobrenadante del cultivo obtenido. Después de eso, el sobrenadante del cultivo se sometió a una cromatografía de afinidad usando una columna con anticuerpos de agrecano para purificar la proteína.

15 En esta relación, la columna con anticuerpos de agrecano usada se preparó mediante el procedimiento recomendado que acompañaba al portador (mostrado en el siguiente (2)), (1) usando un anticuerpo monoclonal anti-HABP preparado mediante el procedimiento convencional, usando como antígeno el agrecano (producido por Seikagaku Corp.) que se purificó a partir del cartílago bovino del septo nasal mediante el método de Laurant modificado, y (2) usando como portador un flujo rápido de Sepharose 4 activada por NHS (producido por y GE Healthcare-Biosciences).

20 La producción de la HABP de la presente invención se identificó con la técnica de inmunotransferencia Western en los siguientes procedimientos.

Los procedimientos de SDS-PAGE se realizaron usando el sobrenadante del cultivo antes de la purificación por afinidad, el sobrenadante del cultivo después de la purificación por afinidad y la proteína obtenida mediante la purificación por afinidad como muestras, respectivamente, y cada una de ellas se transfirió a una membrana de PVDF. Después del tratamiento de bloqueo de la membrana de PVDF, la membrana se hizo reaccionar con un anticuerpo anti-agrecano marcado con peroxidasa a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar la membrana de PVDF 3 veces con PBS-T, la membrana se hizo luminescente usando ECLplus (producido por GE Healthcare-Biosciences), y se expuso una película UV a la misma.

30 En esta relación, el anticuerpo anti-agrecano marcado con peroxidasa usado según se ha descrito anteriormente era aquel en el que se usó el mismo anticuerpo monoclonal anti-agrecano al usado para la columna con anticuerpo de agrecano usada en la anteriormente descrita cromatografía de afinidad, se marcó con peroxidasa de rábano picante verde según el procedimiento convencional. Además, el gel después de la SDS-PAGE se sometió a una tinción de plata según el procedimiento convencional.

35 Los resultados se muestran en la Fig. 3. En la Fig. 3, (a) muestra el resultado de la tinción de plata del gel después de la SDS-PAGE, y (b) muestra el resultado de la inmunotransferencia Western usando anticuerpo anti-agrecano marcado con peroxidasa.

40 Además, en (a) y (b) de la Fig. 3, se muestran los resultados cuando se usaron los siguientes materiales como muestra, respectivamente: carril 1: el marcador de peso molecular de la proteína, Precisionplus Protein Standard (BIO-RAD), carril 2: el sobrenadante del cultivo antes de la purificación por afinidad, carril 3: el sobrenadante del cultivo después de la purificación por afinidad, y carril 4: la proteína obtenida mediante purificación por afinidad. Además, la flecha de la Fig. 3 (b) indica una fracción de la HABP de la presente invención.

45 Como resulta evidente a partir de la comparación de los resultados de (a) y (b) de la Fig. 3, se detectó una fracción cruzada con el anticuerpo anti-agrecano marcado con peroxidasa en el sobrenadante del cultivo antes de la purificación por afinidad (carril 2), mientras que no se detectó una fracción cruzada con el anticuerpo anti-agrecano marcado con peroxidasa en el sobrenadante del cultivo después de la purificación por afinidad (carril 3). Además, en una fracción de proteína purificada obtenida eluyendo el portador de afinidad con disolución tampón de elución (carril 4) se detectó una fracción cruzada con el anticuerpo anti-agrecano marcado con peroxidasa.

50 Además, el tamaño de la proteína de la fracción cruzada con el anticuerpo de agrecano identificado mediante SDS-PAGE era de aproximadamente 90 kDa, y era mayor que el peso molecular estimado a partir de la secuencia de aminoácidos del agrecano conocido de *Bos Taurus* que había sido desvelado en la base de datos, y por lo tanto, se supuso que se ha añadido una cadena de azúcar a la proteína obtenida.

A partir de los resultados anteriores se confirmó que la proteína expresada era una proteína cruzada con el anticuerpo anti-agrecano. Por lo tanto se confirmó que la deseada HABP de la presente invención podía expresarse mediante los procedimientos descritos anteriormente.

55 **Ejemplo 2**

Medición del ácido hialurónico-1 (Preparación de la curva estándar)

(1) Preparación de los reactivos

1) Preparación del primer reactivo (que contiene la HABP de la presente invención)

5 Se disolvió la HABP de la presente invención (100 µg), después de la purificación mediante cromatografía de afinidad obtenida en el Ejemplo 1 (7), en disolución tampón de HEPES 100 mM (que contenía BSA al 0,1% y NaCl al 1%, pH 7,0) (10 ml) para elaborar un primer reactivo.

2) Preparación del segundo reactivo (partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal anti-HABP)

10 Se añadió agua purificada (800 µl), una disolución de partículas de látex (producida por Sekisui Chemical Co., Ltd., EOSK29S, 10% en peso, diámetro de la partícula de látex: 0,3 µm) (100 µl), una disolución tampón de borato 500 mM (pH 7,3) (100 µl), una disolución tampón de ASES 50 mM que contenía el anticuerpo monoclonal anti-HABP (concentración del anticuerpo monoclonal anti-HABP: 4,24 mg/ml, pH 6,5) (100 µl) a un tubo de centrifuga de policarbonato de 2 ml, y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 100 minutos con agitación para obtener una suspensión de anticuerpos monoclonales anti-HABP soportados sobre partículas de látex. La concentración del anticuerpo monoclonal anti-HABP en la incubación era de aproximadamente 0,385 mg/ml.

15 Además, el anteriormente descrito anticuerpo monoclonal anti-HABP era el que se preparó mediante el procedimiento convencional usando como antígeno la proteína de unión al ácido hialurónico purificada a partir de cartílago bovino del septo nasal mediante el método modificado de Laurant y col. (producida por Seikagaku Corp.).

20 Después de eso, la suspensión obtenida de anticuerpos monoclonales anti-HABP soportados sobre partículas de látex se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se retiró, y se añadió disolución tampón de borato 50 mM (que contenía BSA al 2,5%, pH 7,3) (1 ml) al sedimento del fondo del tubo. El sedimento se sometió a un tratamiento con ultrasonidos con enfriamiento por hielo durante 1 minuto, y se suspendió de nuevo. La suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 120 minutos con agitación, y el área de la superficie de las partículas de látex en la que no había anticuerpo soportado se cubrió con BSA.

25 Después de eso, la suspensión de las partículas de látex se centrifugó a 15.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se retiró, y se añadió una disolución tampón de borato 50 mM (que contenía BSA al 0,5%, pH 7,3) (1 ml) al sedimento del fondo del tubo. Después de eso, el sedimento se suspendió de nuevo aplicando un tratamiento por ultrasonidos durante 1 minuto con enfriamiento por hielo, y se diluyó 3,33 veces con disolución tampón de borato 50 mM (que contenía BSA al 2,5%, pH 7,3), para elaborar un segundo reactivo.

3) Preparación de las disoluciones de ácido hialurónico

30 Se diluyó hialuronato sódico (producido por Kibun Food Chemifa Co., Ltd.) con disolución tampón de borato 50 mM (pH 7,0) de forma que se obtuvieran unas concentraciones en la disolución de ácido hialurónico de 50, 100, 200, 500 y 1.000 ng/ml, para elaborar unas disoluciones de ácido hialurónico.

(2) Medición del ácido hialurónico

35 Usando como muestra las disoluciones de ácido hialurónico preparadas en el anterior (1) 3), se midió la absorbancia a 805 nm de cada muestra con un sistema de medida completamente automático (JEOL Ltd., Modelo BM-8) en las siguientes condiciones de medida.

	Muestra:	2,4 µl
	Primer reactivo:	90 µl
	Segundo reactivo:	30 µl
40	Procedimiento de medida:	método del punto final doble
	Longitud de onda principal:	805 nm

La concentración de la HABP de la presente invención en la medición era de aproximadamente 7,35 µg/ml.

(3) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4 (- O -).

45 El valor del eje longitudinal en la Fig. 4 es un valor obtenido restando el valor en blanco (la absorbancia cuando la concentración de ácido hialurónico era 0) de la absorbancia obtenida con la medición, y multiplicándolo por 10.000.

**Ejemplo Comparativo 1**

(1) Preparación del reactivo

1) Preparación del primer reactivo (que contiene la HABP natural)

Se disolvió la proteína de unión al ácido hialurónico (purificada a partir del cartílago bovino del septo nasal mediante el método modificado de Laurant, y col., producida por Seikagaku Corp., en lo sucesivo, denominada "HABP natural") (20 µg) en disolución tampón de HEPES 100 mM (que contenía BSA al 0,1% y NaCl al 1%, pH 7,0) (10 ml) para elaborar un primer reactivo.

5 2) Preparación del segundo reactivo (partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal anti-HABP)

Se usó el mismo segundo reactivo al preparado en el Ejemplo 2 (1) 2).

3) Preparación de la disolución de ácido hialurónico

Se usó la misma disolución de ácido hialurónico preparada en el Ejemplo 2 (1) 3).

2) Medición del ácido hialurónico

10 Usando como muestra la disolución de ácido hialurónico preparada en el anterior (1) 3), se midió la absorbancia a 805 nm de cada muestra con el mismo equipo y mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 2 (2). La concentración de la HABP natural de la medición era de aproximadamente 1,47 µg/ ml.

(3) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran mediante (- ♦ -) en la Fig. 4, junto con los resultados del Ejemplo 2.

15 Como resulta evidente a partir de los resultados de la Fig. 4, como resultado de realizar la medición del ácido hialurónico usando la HABP de la presente invención, se obtuvo una curva estándar superior o igual al caso en el que se usó la HABP natural. A partir de estos resultados, puede entenderse que la medición del ácido hialurónico puede realizarse usando la HABP de la presente invención.

### Ejemplo 3

20 Medición del ácido hialurónico-2 (efecto del fenómeno de prozona)

(1) Preparación del reactivo

1) Preparación del primer reactivo (que contiene la HABP de la presente invención)

25 Se disolvió la HABP de la presente invención (100 µg), después de la purificación mediante cromatografía de afinidad obtenida en el Ejemplo 1 (7), en disolución tampón de HEPES 100 mM (que contenía BSA al 0,1% y NaCl al 1%, pH 7,0) (10 ml) para elaborar un primer reactivo.

2) Preparación del segundo reactivo (partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal anti-HABP)

Se usó el mismo segundo reactivo al preparado en el Ejemplo 2 (1) 2).

3) Preparación de una disolución de ácido hialurónico de elevada concentración

30 Se diluyó hialuronato sódico (producido por Kibun Food Chemifa Co., Ltd.) con disolución tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0) de forma que se obtuvieran unas concentraciones en la disolución de ácido hialurónico de elevada concentración de 5.000, 10.000, 20.000, 50.000, 100.000, 200.000, 500.000 y 1.000.000 ng/ml, para elaborar unas disoluciones de ácido hialurónico de elevada concentración.

(2) Medición del ácido hialurónico

35 Usando como muestra las disoluciones de ácido hialurónico preparadas en el anterior (1) 3), se midió la absorbancia a 805 nm de cada muestra con un sistema de medición completamente automático (JEOL Ltd., Modelo BM-8) en las siguientes condiciones de medida.

Muestra:	2,4 µl
Primer reactivo:	90 µl
Segundo reactivo:	30 µl
Procedimiento de medida:	método del punto final doble
Longitud de onda principal:	805 nm

La concentración de la HABP de la presente invención en la medición era de aproximadamente 7,35 µg/ml.

(3) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 5 (- O -).

45 Además, se muestran conjuntamente los resultados de las mediciones usando las muestras en las que las concentraciones de ácido hialurónico en las disoluciones de ácido hialurónico eran de 50, 100, 200, 500 y 1.000 ng/

ml obtenidos en el Ejemplo 2 en la Fig. 5 (- O -).

El valor del eje longitudinal en la Fig. 5 es un valor obtenido restando el valor en blanco (la absorbancia cuando la concentración de ácido hialurónico era 0) de la absorbancia obtenida con la medición, y multiplicándolo por 10.000.

### **Ejemplo Comparativo 2**

5 (1) Preparación de los reactivos

1) Preparación del primer reactivo (que contiene la HABP natural)

La HABP natural (producida por Seikagaku Corp.) (20 µg) se disolvió en disolución tampón de HEPES 100 mM (que contenía BSA al 0,1% y NaCl al 1%, pH 7,0) (10 ml) para elaborar un primer reactivo.

2) Preparación del segundo reactivo (partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal anti-HABP)

10 Se usó el mismo segundo reactivo al preparado en el Ejemplo 3 (1) 2).

3) Preparación de una disolución de ácido hialurónico de elevada concentración

Se usó la misma disolución de ácido hialurónico de elevada concentración a la preparada en el Ejemplo 3 (1) 3).

(2) Medición del ácido hialurónico

15 Usando la disolución de ácido hialurónico preparada en el anterior (1) 3) como muestra, se midió la absorbancia a 805 nm de cada muestra con el mismo equipo y mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 2 (2). La concentración de la HABP natural de la medición era de aproximadamente 1,47 µg/ ml.

(3) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran mediante (- ♦ -) en la Fig. 5, junto con los resultados del Ejemplo 3.

20 Como resulta evidente a partir de la Fig. 5, cuando se realizó la medición en una zona con exceso de antígeno, el grado de disminución en la absorbancia provocado por el fenómeno de prozona obtenido mediante la medición que usa la HABP de la presente invención era menor que el obtenido mediante la medición que usa la HABP natural convencional.

25 A partir de los resultados descritos anteriormente puede entenderse que cuando la concentración de ácido hialurónico se mide usando la HABP de la presente invención puede realizarse una medición de elevada precisión de la concentración de ácido hialurónico incluso en una zona con exceso de antígeno.

### **Ejemplo 4**

Medición del ácido hialurónico-3

(1) Preparación del reactivo

1) Preparación del primer reactivo (que contiene la HABP de la presente invención)

30 Se disolvió la HABP de la presente invención tras la purificación mediante cromatografía de afinidad, obtenida en el Ejemplo 1 (7) en disolución tampón de HEPES 100 mM (que contenía BSA al 0,1% y NaCl al 1%, pH 7,0) de forma que se obtuviera una concentración del primer reactivo de 2 µg/ml a 8 µg/ ml, para elaborar un primer reactivo.

2) Preparación del segundo reactivo (partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal anti-HABP)

Se usó el mismo segundo reactivo al preparado en el Ejemplo 2 (1) 2).

35 3) Preparación de la disolución de ácido hialurónico

Se diluyó hialuronato sódico (producido por Kibun Food Chemifa Co., Ltd.) con disolución tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0) de forma que se obtuviera una concentración en la disolución de ácido hialurónico de 1.000 ng/ml, para elaborar una disolución de ácido hialurónico.

(2) Medición del ácido hialurónico

40 Usando como muestra las disoluciones de ácido hialurónico preparadas en el anterior (1) 3), se midió la absorbancia a 805 nm de cada muestra con un sistema de medida completamente automático (JEOL Ltd., Modelo BM-8) en las siguientes condiciones de medida.

	Muestra:	2,4 µl
	Primer reactivo:	90 µl
45	Segundo reactivo:	30 µl

Procedimiento de medida: método del punto final doble  
 Longitud de onda principal: 805 nm

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 6 (- ◊ -).

5 El valor del eje longitudinal en la Fig. 6 es un valor obtenido restando el valor en blanco (la absorbancia cuando la concentración de ácido hialurónico era 0) de la absorbancia obtenida con la medición, y multiplicándolo por 10.000.

### Ejemplo Comparativo 3

(1) Preparación de la HABP con la secuencia de aminoácidos conocida

10 Se realizaron los procedimientos desde (1) Recuperación del ARN hasta (5) Búsqueda de homologías en la secuencia de nucleótidos del Ejemplo 1, y para el ADNc obtenido, se realizó una corrección de la secuencia de nucleótidos usando Mutan-K (producido por Takara Bio, Inc.) según el protocolo del producto.

15 A saber, según se ha descrito anteriormente, en la secuencia de aminoácidos conocida del agrecano de *Bos Taurus*, la secuencia de nucleótidos que codifica para los aminoácidos de las posiciones 129 hasta 130 a partir del N-terminal (Ile - Leu) era "ATTCTA", mientras que la secuencia de nucleótidos en las posiciones 388 hasta 393 del ADNc obtenido en el Ejemplo 1 (5) correspondiente a la parte descrita anteriormente del agrecano conocido de *Bos Taurus*, era "ATCTAT". Por lo tanto, usando el ADNc obtenido en el Ejemplo 1(5), se realizó un procesado para cambiar la secuencia de nucleótidos de las posiciones desde la 388 hasta la 393 del ADNc desde "ATCTAT" hasta "ATTCTA".

20 Después de eso, se realizó un cartografiado de la secuencia de nucleótidos del ADNc corregido preparado mediante el procesado descrito anteriormente usando Base Station (producido por Biorad Laboratories, Inc.). Y se confirmó que la secuencia de nucleótidos del ADNc corregido era idéntica a la secuencia de nucleótidos conocida que codifica para la secuencia de aminoácidos a partir del N-terminal hasta el residuo de aminoácido la posición 692 del agrecano conocido de *Bos Taurus* (ID. SEC. N°: 8) (es decir, codifica para la secuencia de aminoácidos en la que los residuos de aminoácidos de las posiciones 129 y 130 a partir del N-terminal eran Ile - Leu del agrecano conocido de *Bos Taurus*.)

25 Después de eso se preparó un vector recombinante pVL1392/ADNc corregido mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 1 (4), excepto porque se usó como vector recombinante el ADNc corregido obtenido según se ha descrito anteriormente en lugar del fragmento producto de la PCR preparado en el Ejemplo 1 (3).

30 Mediante la expresión del ADNc corregido mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 1 (6) a (7), excepto porque se usó el vector recombinante pVL1392 ADNc corregido, se obtuvo la HABP con la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia de aminoácidos conocida a partir del N-terminal hasta la posición 693 del agrecano de *Bos Taurus* desvelada en la base de datos (la secuencia mostrada en la ID. SEC. N°: 9) (en lo sucesivo, descrita como "la HABP de secuencia de aminoácidos conocida").

(2) Preparación del reactivo

1) Preparación del primer reactivo (que contiene la HABP de secuencia de aminoácidos conocida)

35 La HABP de secuencia de aminoácidos conocida obtenida en el anterior (1) se disolvió en disolución tampón de HEPES 100 mM (que contenía BSA al 0,1% y NaCl al 1%, pH 7,0) de forma que se obtuviera una concentración del primer reactivo de 2 µg/ml a 8 µg/ ml, para elaborar un primer reactivo.

2) Preparación del segundo reactivo (partículas de látex sensibilizadas con el anticuerpo monoclonal anti-HABP)

Se usó el mismo segundo reactivo al preparado en el en el Ejemplo 4 (1) 2).

40 3) Disolución de ácido hialurónico

Se usó la misma disolución de ácido hialurónico de elevada concentración que la preparada en el Ejemplo 4 (1) 3).

(2) Medición del ácido hialurónico

Usando como muestra las disoluciones de ácido hialurónico preparadas en el anterior (1) 3), se midió la absorbancia a 805 nm de cada muestra con el mismo equipo y mediante el mismo procedimiento que el del Ejemplo 4 (2).

45 (3) Resultados

Los resultados obtenidos se muestran con un cuadrado negro (- ■ -) en la Fig. 6, junto con los resultados del Ejemplo 4. Como resulta evidente a partir de los resultados de la Fig. 6, cuando la medición del ácido hialurónico se realizó usando "la HABP con la secuencia de aminoácidos obtenida mediante la expresión del ADNc preparado basándose en la secuencia de nucleótidos del agrecano conocido de *Bos Taurus* desvelada en la base de datos", el aumento en la absorbancia era pequeño incluso cuando la concentración de la HABP de secuencia de aminoácidos conocida

aumentaba, es decir, la sensibilidad era baja. Consecuentemente, puede entenderse que la medición no puede realizarse cuando la concentración de ácido hialurónico en suero es baja.

Por otro lado, cuando la medición del ácido hialurónico se realizó usando la HABP de la presente invención, la absorbancia aumentó de acuerdo con el aumento en la concentración de la HABP de la presente invención. Esto es, 5 puede encontrarse que puede obtenerse una sensibilidad suficiente para la medición del ácido hialurónico mediante la preparación de la concentración de la HABP.

Además, como resulta evidente a partir de los hechos descritos anteriormente, dado que la HABP de la presente invención tiene una reactividad suficiente para realizar la medición del ácido hialurónico, puede encontrarse que la 10 presente invención tiene un efecto tal que puede proporcionarse un kit de medición para medir el ácido hialurónico en un cierto intervalo de concentraciones mediante el uso de una cierta concentración de la HABP, cuando se usa la HABP de la presente invención.

#### Aplicabilidad industrial

Dado que la HABP de la presente invención es un producto recombinante, la HABP puede obtenerse a bajo coste y 15 en grandes cantidades, y tiene una calidad superior y sin fluctuaciones, en comparación con el agrecono natural. Además, dado que la HABP de la presente invención tiene las características descritas anteriormente, puede realizarse una medición barata y de elevada precisión del ácido hialurónico usando la misma.

#### Explicación de los símbolos

En la Fig. 4, (- O -) muestra los resultados cuando las mediciones se realizaron usando el primer reactivo que 20 contiene la HABP de la presente invención, y (- ♦ -) muestra los resultados cuando las mediciones se realizaron usando el primer reactivo que contiene la HABP natural.

En la Fig. 5, (- O -) muestra los resultados cuando las mediciones se realizaron usando el primer reactivo que contiene la HABP de la presente invención, y (- ♦ -) muestra los resultados cuando las mediciones se realizaron usando el primer reactivo que contiene la HABP natural.

En la Fig. 6, (- O -) muestra los resultados cuando las mediciones se realizaron usando el primer reactivo que 25 contiene la HABP de la presente invención, y (-■-) muestra los resultados cuando las mediciones se realizaron usando el primer reactivo que contiene la HABP con una secuencia de aminoácidos conocida.

Lista de secuencias

30 <110> Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

35 <120> Nueva proteína de unión al ácido hialurónico y procedimiento para medir el ácido hialurónico usando la misma

40 <130> F1786WAKOPAT

45 <150> JP2008-106190

<151> 15-04-2008

50 <160> 9

<170> PatentIn versión 3.3

55 <210> 1

<211> 2076

<212> ADN

<213> Bos taurus

<220>

<221> CDS

60 <222> (1)..(2076)

<220>

<221> misc\_feature

<222> (393).. (393)

65 <223> n es a, c, g o t

<400> 1

ES 2 399 584 T3

atg acc act tta ctc ttg gtg ttt gtg act ctg agg gtc atc aca gca	48
Met Thr Thr Leu Leu Leu Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala	
1 5 10 15	
gcc atc tca gta gaa gtt tca gaa cct gac aac tcg ctg agt gtc agc	96
Ala Ile Ser Val Glu Val Ser Glu Pro Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser	
20 25 30	

# ES 2 399 584 T3

atc cct gaa ccg tcc cca ctt cg <sup>g</sup> gtc ctc ctg ggg agc tcc ctc acc			144
Ile Pro Glu Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Thr			
35	40	45	
atc ccc tgc tac ttc atc gac ccc atg cac ccc gtg acc acc gcc ccc			192
Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro			
50	55	60	
tcc acc gcc ccc ctt gcc cca aga atc aag tgg agc cgc att tcc aag			240
Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Ile Ser Lys			
65	70	75	80
gag aag gag gtg gtg ctg ctg gtg gcc act gaa ggg cgg gtg cgg gtc			288
Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val			
85	90	95	
aac agc gcc tac caa gac aag gtc acg ctg ccc aac tac ccc gcc atc			336
Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Thr Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile			
100	105	110	
ccc agc gac gcc acc ctg gaa atc cag aac atg cgc tcc aat gac tcc			384
Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Asn Met Arg Ser Asn Asp Ser			
115	120	125	
ggg ath hvn cgc tgc gag gtg atg cac ggc atc gag gac agc cag gcc			432
Gly Ile Xaa Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Gln Ala			
130	135	140	
acc cta gag gtc gtg gta aaa ggc atc gtg ttc cat tac aga gcc atc			480
Thr Leu Glu Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile			
145	150	155	160
tcc acg cgc tac acc ctg gac ttt gac agg gcg cag cgg gcc tgc ctg			528
Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu			
165	170	175	
cag aac agc gcc atc atc gcc acg ccc gag cag ctg cag gct gcc tat			576
Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr			
180	185	190	

## ES 2 399 584 T3

gag	gac	ggc	ttc	cac	cag	tgc	gac	gcc	ggc	tgg	ctg	gcc	gat	cag	act	624
Glu	Asp	Gly	Phe	His	Gln	Cys	Asp	Ala	Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	Gln	Thr	
195								200						205		
gtg	agg	tat	ccc	atc	cac	acg	ccg	agg	gaa	ggt	tgc	tat	gga	gac	aag	672
Val	Arg	Tyr	Pro	Ile	His	Thr	Pro	Arg	Glu	Gly	Cys	Tyr	Gly	Asp	Lys	
210								215						220		
gac	gag	ttt	ccc	ggc	gtg	aga	acc	tac	ggc	atc	cg	gac	acc	aac	gaa	720
Asp	Glu	Phe	Pro	Gly	Val	Arg	Thr	Tyr	Gly	Ile	Arg	Asp	Thr	Asn	Glu	
225								230						235		240
acc	tat	gac	gtg	tac	tgc	ttc	gcg	gag	gag	atg	gag	ggc	gag	gtc	ttc	768
Thr	Tyr	Asp	Val	Tyr	Cys	Phe	Ala	Glu	Glu	Met	Glu	Gly	Glu	Val	Phe	
245								250						255		
tat	gca	aca	tcc	ccg	gag	aag	ttc	acc	ttc	caa	gag	gca	gcc	aac	gag	816
Tyr	Ala	Thr	Ser	Pro	Glu	Lys	Phe	Thr	Phe	Gln	Glu	Ala	Ala	Asn	Glu	
260								265						270		
tgc	cg	cg	ctg	ggc	ggc	cg	ctg	ggc	acc	acg	ggc	caa	ctc	tac	ctg	864
Cys	Arg	Arg	Leu	Gly	Ala	Arg	Leu	Ala	Thr	Thr	Gly	Gln	Leu	Tyr	Leu	
275								280						285		
gcc	tgg	cag	ggt	ggc	atg	gac	atg	tgc	agc	gcc	ggc	tgg	ctg	gct	gac	912
Ala	Trp	Gln	Gly	Gly	Met	Asp	Met	Cys	Ser	Ala	Gly	Trp	Leu	Ala	Asp	
290								295						300		
cgc	agc	gtg	cga	tac	ccc	atc	tcc	aag	gcc	cg	cct	aa	tgc	ggg	ggc	960
Arg	Ser	Val	Arg	Tyr	Pro	Ile	Ser	Lys	Ala	Arg	Pro	Asn	Cys	Gly	Gly	
305								310						315		320
aac	ctc	ctg	gga	gtg	agg	acc	gtc	tac	ctg	cac	gcc	aa	cag	acg	ggc	1008
Asn	Leu	Leu	Gly	Val	Arg	Thr	Val	Tyr	Leu	His	Ala	Asn	Gln	Thr	Gly	
325								330						335		
tac	cct	gac	cct	tca	tcc	cgc	tat	gac	gcc	atc	tgc	tac	aca	ggt	gaa	1056
Tyr	Pro	Asp	Pro	Ser	Ser	Arg	Tyr	Asp	Ala	Ile	Cys	Tyr	Thr	Gly	Glu	
340								345						350		

## ES 2 399 584 T3

gac ttt gtg gac atc cca gaa agc ttt ttc ggg gtg ggc ggt gag gag			1104
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Ser Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu			
355	360	365	
gac atc acc atc cag acg gtg acc tgg cct gac gtg gag ctg ccc ctg			1152
Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Leu			
370	375	380	
ccc cga aat atc act gag ggt gaa gcc cga ggc agc gtg atc ctc acg			1200
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr			
385	390	395	400
gca aag ccc gac ttt gaa gtc tcc ccc acc gcc ccg gaa ccc gag gag			1248
Ala Lys Pro Asp Phe Glu Val Ser Pro Thr Ala Pro Glu Pro Glu Glu			
405	410	415	
cct ttc acg ttt gtc cct gaa gta agg gcc act gca ttc ccc gaa gta			1296
Pro Phe Thr Phe Val Pro Glu Val Arg Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val			
420	425	430	
gag aac agg act gaa gag gcc acc cgg ccc tgg gcc ttt ccc aga gag			1344
Glu Asn Arg Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Arg Glu			
435	440	445	
tcc acc ccc ggc ctg gga gcc ccc acg gcc ttc acc agc gag gac ctc			1392
Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu			
450	455	460	
gtc gtg cag gtg acc tta gcc cca ggt gcg gct gag gtc cct ggg cag			1440
Val Val Gln Val Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln			
465	470	475	480
cca cga ctg cca ggg gga gtc gtg ttc cac tac cgc ccg ggc tcc tcc			1488
Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Ser			
485	490	495	
cgc tac tcg ctg acc ttt gag gag gcc aag cag gcc tgc ctg cgc acc			1536
Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Lys Gln Ala Cys Leu Arg Thr			
500	505	510	

## ES 2 399 584 T3

ggg gcc atc atc gcc tcg ccc gag cag ctc cag gcc gcc tat gaa gca	515	520	525	1584
Gly Ala Ile Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala				
ggc tac gag cag tgt gac gcc ggc tgg ctg cag gac cag aca gtc aga	530	535	540	1632
Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg				
tac ccc att gtg agc ccg cgg acc ccc tgt gtg ggt gac aag gac agc	545	550	555	1680
Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser				
agc ccg ggg gtc cgg acc tac ggc gtg cgg cca cca tca gaa acc tac	565	570	575	1728
Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr				
gat gtc tac tgc tac gtg gac aga ctc gag ggg gag gtg ttc ttc gcc	580	585	590	1776
Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala				
aca cgc ctg gag cag ttc acc ttc tgg gaa gcc cag gag ttc tgt gaa	595	600	605	1824
Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Trp Glu Ala Gln Glu Phe Cys Glu				
tcc caa aac gcc act ctg gcc acc aca ggc cag ctc tat gct gcc tgg	610	615	620	1872
Ser Gln Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp				
agc cgt ggt ctg gac aag tgc tac gcc ggc tgg ctg gct gac ggc agc	625	630	635	1920
Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser				
ctc cgc tac ccc atc gtc acc cca agg ccc gcc tgt ggc ggg gac aaa	645	650	655	1968
Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys				
ccg ggc gtg aga acc gtc tac ctc tac ccc aac cag acg ggc ctc ctg	660	665	670	2016
Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Leu				

# ES 2 399 584 T3

	gat ccg ctg tcc cgg cac cac gcc ttc tgc ttc cga ggt gtt tca gcg	2064
	Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala	
	675	680
		685
	gcg ccc tct cca	2076
	Ala Pro Ser Pro	
	690	
5	<210> 2	
	<211> 692	
	<212> PRT	
	<213> Bos taurus	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (131).. (131)	
	<223> El 'Xaa' en la ubicación 131 representa Asn, Ser, Thr, Gln, Tyr o Cys.	
	<400> 2	
	Met Thr Thr Leu Leu Leu Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala	
	1	5
		10
		15
	Ala Ile Ser Val Glu Val Ser Glu Pro Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser	
	20	25
		30
	Ile Pro Glu Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Thr	
	35	40
		45
	Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro	
	50	55
		60
	Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Ile Ser Lys	
	65	70
		75
		80

ES 2 399 584 T3

Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val  
85 90 95

Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Thr Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile  
100 105 110

Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Asn Met Arg Ser Asn Asp Ser  
115 120 125

Gly Ile Xaa Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Gln Ala  
130 135 140

Thr Leu Glu Val Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile  
145 150 155 160

Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu  
165 170 175

Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr  
180 185 190

Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr  
195 200 205

Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys  
210 215 220

Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu  
225 230 235 240

ES 2 399 584 T3

Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe  
245 250 255

Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu  
260 265 270

Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu  
275 280 285

Ala Trp Gln Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp  
290 295 300

Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly  
305 310 315 320

Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly  
325 330 335

Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu  
340 345 350

Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Ser Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu  
355 360 365

Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Leu  
370 375 380

Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr  
385 390 395 400

ES 2 399 584 T3

Ala Lys Pro Asp Phe Glu Val Ser Pro Thr Ala Pro Glu Pro Glu Glu  
405 410 415

Pro Phe Thr Phe Val Pro Glu Val Arg Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val  
420 425 430

Glu Asn Arg Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Arg Glu  
435 440 445

Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu  
450 455 460

Val Val Gln Val Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln  
465 470 475 480

Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Ser  
485 490 495

Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Lys Gln Ala Cys Leu Arg Thr  
500 505 510

Gly Ala Ile Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala  
515 520 525

Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg  
530 535 540

Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser  
545 550 555 560

ES 2 399 584 T3

Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr  
565 570 575

Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala  
580 585 590

Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Trp Glu Ala Gln Glu Phe Cys Glu  
595 600 605

Ser Gln Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp  
610 615 620

Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser  
625 630 635 640

Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys  
645 650 655

Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Leu  
660 665 670

Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala  
675 680 685

Ala Pro Ser Pro  
690

<210> 3  
<211> 2076  
5 <212> ADN  
<213> Bos taurus

<220>  
10 <221> CDS  
<222> (1)..(2076)

## ES 2 399 584 T3

&lt;400&gt; 3

atg acc act tta ctc ttg gtg ttt gtg act ctg agg gtc atc aca gca	48
Met Thr Thr Leu Leu Leu Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala	
1 5 10 15	
gcc atc tca gta gaa gtt tca gaa cct gac aac tcg ctg agt gtc agc	96
Ala Ile Ser Val Glu Val Ser Glu Pro Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser	
20 25 30	
atc cct gaa ccg tcc cca ctt cgg gtc ctc ctg ggg agc tcc ctc acc	144
Ile Pro Glu Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Thr	
35 40 45	
atc ccc tgc tac ttc atc gac ccc atg cac ccc gtg acc acc gcc ccc	192
Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro	
50 55 60	
tcc acc gcc ccc ctt gcc cca aga atc aag tgg agc cgc att tcc aag	240
Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Ile Ser Lys	
65 70 75 80	
gag aag gag gtg gtg ctg ctg gtc act gaa ggg cgg gtg cgg gtc	288
Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val	
85 90 95	
aac agc gcc tac caa gac aag gtc acg ctg ccc aac tac ccc gcc atc	336
Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Thr Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile	
100 105 110	
ccc agc gac gcc acc ctg gaa atc cag aac atg cgc tcc aat gac tcc	384
Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Asn Met Arg Ser Asn Asp Ser	
115 120 125	

# ES 2 399 584 T3

ggg atc tat cgc tgc gag gtg atg cac ggc atc gag gac agc cag gcc	130	135	140	432
Gly Ile Tyr Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Gln Ala				
acc cta gag gtc gtg gta aaa ggc atc gtg ttc cat tac aga gcc atc	145	150	155	480
Thr Leu Glu Val Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile				
tcc acg cgc tac acc ctg gac ttt gac agg gcg cag cgg gcc tgc ctg	165	170	175	528
Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu				
cag aac agc gcc atc atc gcc acg ccc gag cag ctg cag gct gcc tat	180	185	190	576
Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr				
gag gac ggc ttc cac cag tgc gac gcc ggc tgg ctg gcc gat cag act	195	200	205	624
Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr				
gtg agg tat ccc atc cac acg ccg agg gaa ggt tgc tat gga gac aag	210	215	220	672
Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys				
gac gag ttt ccc ggc gtg aga acc tac ggc atc cgg gac acc aac gaa	225	230	235	720
Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu				
acc tat gac gtg tac tgc ttc gcg gag gag atg gag ggc gag gtc ttc	245	250	255	768
Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe				
tat gca aca tcc ccg gag aag ttc acc ttc caa gag gca gcc aac gag	260	265	270	816
Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu				
tgc cgg cgg ctg ggc gcc cgg ctg gcc acc acg ggc caa ctc tac ctg	275	280	285	864
Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu				

# ES 2 399 584 T3

gcc tgg cag ggt ggc atg gac atg tgc agc gcc ggc tgg ctg gct gac	912	
Ala Trp Gln Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp		
290	295	300
cgc agc gtg cga tac ccc atc tcc aag gcc cgg cct aac tgc ggg ggc	960	
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly		
305	310	315
aac ctc ctg gga gtg agg acc gtc tac ctg cac gcc aac cag acg ggc	1008	
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly		
325	330	335
tac cct gac cct tca tcc cgc tat gac gcc atc tgc tac aca ggt gaa	1056	
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu		
340	345	350
gac ttt gtg gac atc cca gaa agc ttt ttc ggg gtg ggc ggt gag gag	1104	
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Ser Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu		
355	360	365
gac atc acc atc cag acg gtg acc tgg cct gac gtg gag ctg ccc ctg	1152	
Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Leu		
370	375	380
ccc cga aat atc act gag ggt gaa gcc cga ggc agc gtg atc ctc acg	1200	
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr		
385	390	395
395	400	
gca aag ccc gac ttt gaa gtc tcc ccc acc gcc ccg gaa ccc gag gag	1248	
Ala Lys Pro Asp Phe Glu Val Ser Pro Thr Ala Pro Glu Pro Glu Glu		
405	410	415
cct ttc acg ttt gtc cct gaa gta agg gcc act gca ttc ccc gaa gta	1296	
Pro Phe Thr Phe Val Pro Glu Val Arg Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val		
420	425	430
430	435	
gag aac agg act gaa gag gcc acc cgg ccc tgg gcc ttt ccc aga gag	1344	
Glu Asn Arg Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Arg Glu		
440	445	

## ES 2 399 584 T3

tcc acc ccc ggc ctg gga gcc ccc acg gcc ttc acc agc gag gac ctc	450	455	460	1392
Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu				
gtc gtg cag gtg acc tta gcc cca ggt gcg gct gag gtc cct ggg cag	465	470	475	1440
Val Val Gln Val Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln				
cca cga ctg cca ggg gga gtc gtg ttc cac tac cgc ccg ggc tcc tcc	485	490	495	1488
Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Ser				
cgc tac tcg ctg acc ttt gag gag gcc aag cag gcc tgc ctg cgc acc	500	505	510	1536
Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Lys Gln Ala Cys Leu Arg Thr				
ggg gcc atc atc gcc tcg ccc gag cag ctc cag gcc gcc tat gaa gca	515	520	525	1584
Gly Ala Ile Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala				
gac tac gag cag tgt gac gcc ggc tgg ctg cag gac cag aca gtc aga	530	535	540	1632
Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg				
tac ccc att gtg agc ccg cgg acc ccc tgt gtg ggt gac aag gac agc	545	550	555	1680
Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser				
agc ccg ggg gtc cgg acc tac ggc gtg cgg cca cca tca gaa acc tac	565	570	575	1728
Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr				
gat gtc tac tgc tac gtg gac aga ctc gag ggg gag gtg ttc ttc gcc	580	585	590	1776
Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala				
aca cgc ctg gag cag ttc acc ttc tgg gaa gcc cag gag ttc tgt gaa	595	600	605	1824
Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Trp Glu Ala Gln Glu Phe Cys Glu				

ES 2 399 584 T3

tcc caa aac gcc act ctg gcc acc aca ggc cag ctc tat gct gcc tgg 1872  
 Ser Gln Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp  
 610 615 620

agc cgt ggt ctg gac aag tgc tac gcc ggc tgg ctg gct gac ggc agc 1920  
 Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser  
 625 630 635 640

ctc cgc tac ccc atc gtc acc cca agg ccc gcc tgt ggc ggg gac aaa 1968  
 Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys  
 645 650 655

ccg ggc gtg aga acc gtc tac ctc tac ccc aac cag acg ggc ctc ctg 2016  
 Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Leu  
 660 665 670

gat ccg ctg tcc cgg cac cac gcc ttc tgc ttc cga ggt gtt tca gcg 2064  
 Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala  
 675 680 685

gcg ccc tct cca 2076  
 Ala Pro Ser Pro  
 690

5  
 <210> 4  
 <211> 692  
 <212> PRT  
 <213> Bos taurus

<400> 4

Met Thr Thr Leu Leu Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala  
 1 5 10 15

Ala Ile Ser Val Glu Val Ser Glu Pro Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser  
 20 25 30

ES 2 399 584 T3

Ile Pro Glu Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Thr  
35 40 45

Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro  
50 55 60

Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Ile Ser Lys  
65 70 75 80

Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val  
85 90 95

Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Thr Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile  
100 105 110

Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Asn Met Arg Ser Asn Asp Ser  
115 120 125

Gly Ile Tyr Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Gln Ala  
130 135 140

Thr Leu Glu Val Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile  
145 150 155 160

Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu  
165 170 175

Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr  
180 185 190

ES 2 399 584 T3

Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr  
195 200 205

Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys  
210 215 220

Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu  
225 230 235 240

Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe  
245 250 255

Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu  
260 265 270

Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu  
275 280 285

Ala Trp Gln Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp  
290 295 300

Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly  
305 310 315 320

Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly  
325 330 335

Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu  
340 345 350

ES 2 399 584 T3

Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Ser Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu  
355 360 365

Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Leu  
370 375 380

Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr  
385 390 395 400

Ala Lys Pro Asp Phe Glu Val Ser Pro Thr Ala Pro Glu Pro Glu Glu  
405 410 415

Pro Phe Thr Phe Val Pro Glu Val Arg Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val  
420 425 430

Glu Asn Arg Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Arg Glu  
435 440 445

Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu  
450 455 460

Val Val Gln Val Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln  
465 470 475 480

Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Ser  
485 490 495

Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Lys Gln Ala Cys Leu Arg Thr  
500 505 510

ES 2 399 584 T3

Gly Ala Ile Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala  
515 520 525

Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg  
530 535 540

Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser  
545 550 555 560

Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr  
565 570 575

Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala  
580 585 590

Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Trp Glu Ala Gln Glu Phe Cys Glu  
595 600 605

Ser Gln Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp  
610 615 620

Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser  
625 630 635 640

Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys  
645 650 655

Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Leu  
660 665 670

ES 2 399 584 T3

Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala  
675 680 685

Ala Pro Ser Pro  
690

		<210> 5		
		<211> 33		
	5	<212> ADN		
		<213> Artificial		
		<220>		
10		<223> cebador oligonucleotídico		
		<400> 5		
		atgaattcat gaccacttta ctcttggtgt ttg	33	
		<210> 6		
15		<211> 35		
		<212> ADN		
		<213> Artificial		
		<220>		
20		<223> cebador oligonucleotídico		
		<400> 6		
		atgaattctc atggagaggg cgccgctgaa acacc	35	
		<210> 7		
25		<211> 2327		
		<212> PRT		
		<213> Bos taurus		
		<400> 7		
30				

ES 2 399 584 T3

Met Thr Thr Leu Leu Leu Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala  
1 5 10 15

Ala Ile Ser Val Glu Val Ser Glu Pro Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser  
20 25 30

Ile Pro Glu Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Thr  
35 40 45

Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro  
50 55 60

Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Ile Ser Lys  
65 70 75 80

Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val  
85 90 95

Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Thr Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile  
100 105 110

Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Asn Met Arg Ser Asn Asp Ser  
115 120 125

Gly Ile Leu Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Gln Ala  
130 135 140

Thr Leu Glu Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile  
145 150 155 160

ES 2 399 584 T3

Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu  
165 170 175

Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr  
180 185 190

Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr  
195 200 205

Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys  
210 215 220

Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu  
225 230 235 240

Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe  
245 250 255

Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu  
260 265 270

Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu  
275 280 285

Ala Trp Gln Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp  
290 295 300

Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly  
305 310 315 320

ES 2 399 584 T3

Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly  
325 330 335

Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu  
340 345 350

Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Ser Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu  
355 360 365

Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Leu  
370 375 380

Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr  
385 390 395 400

Ala Lys Pro Asp Phe Glu Val Ser Pro Thr Ala Pro Glu Pro Glu Glu  
405 410 415

Pro Phe Thr Phe Val Pro Glu Val Arg Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val  
420 425 430

Glu Asn Arg Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Arg Glu  
435 440 445

Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu  
450 455 460

Val Val Gln Val Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln  
465 470 475 480

ES 2 399 584 T3

Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Ser  
485 490 495

Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Lys Gln Ala Cys Leu Arg Thr  
500 505 510

Gly Ala Ile Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala  
515 520 525

Gly Tyr Glu Glu Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg  
530 535 540

Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser  
545 550 555 560

Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr  
565 570 575

Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala  
580 585 590

Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Trp Glu Ala Gln Glu Phe Cys Glu  
595 600 605

Ser Gln Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp  
610 615 620

Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser  
625 630 635 640

ES 2 399 584 T3

Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys  
645 650 655

Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Leu  
660 665 670

Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala  
675 680 685

Ala Pro Ser Pro Glu Glu Glu Gly Ser Ala Pro Thr Ala Gly Pro  
690 695 700

Asp Val Glu Glu Trp Met Val Thr Gln Val Gly Pro Gly Val Ala Ala  
705 710 715 720

Val Pro Ile Gly Glu Glu Thr Thr Ala Ile Pro Gly Phe Thr Val Glu  
725 730 735

Pro Glu Asn Lys Thr Glu Trp Glu Leu Ala Tyr Thr Pro Ala Gly Thr  
740 745 750

Leu Pro Leu Pro Gly Ile Pro Pro Thr Trp Pro Pro Thr Gly Glu Ala  
755 760 765

Thr Glu Glu His Thr Glu Gly Pro Ser Ala Thr Glu Val Pro Ser Ala  
770 775 780

Ser Glu Lys Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro  
785 790 795 800

ES 2 399 584 T3

Phe Pro Ser Glu Lys Pro Phe Pro Pro Glu Glu Leu Phe Pro Ser Glu  
805 810 815

Lys Pro Phe Pro Ser Glu Lys Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro  
820 825 830

Ser Glu Lys Pro Phe Pro Pro Glu Glu Leu Phe Pro Ser Glu Lys Pro  
835 840 845

Ile Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu  
850 855 860

Lys Pro Phe Pro Pro Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu Lys Pro Ile Pro  
865 870 875 880

Ser Glu Glu Pro Phe Pro Ser Glu Lys Pro Phe Pro Ser Glu Glu Pro  
885 890 895

Phe Pro Ser Glu Glu Pro Ser Thr Leu Ser Ala Pro Val Pro Ser Arg  
900 905 910

Thr Glu Leu Pro Ser Ser Gly Glu Val Ser Gly Val Pro Glu Ile Ser  
915 920 925

Gly Asp Phe Thr Gly Ser Gly Glu Ile Ser Gly His Leu Asp Phe Ser  
930 935 940

Gly Gln Pro Ser Gly Glu Ser Ala Ser Gly Leu Pro Ser Glu Asp Leu  
945 950 955 960

ES 2 399 584 T3

Asp Ser Ser Gly Leu Thr Ser Thr Val Gly Ser Gly Leu Pro Val Glu  
965 970 975

Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Glu Glu Arg Ile Thr Trp Thr Ser Ala  
980 985 990

Pro Lys Val Asp Arg Leu Pro Ser Gly Gly Glu Gly Pro Glu Val Se  
995 1000 1005

Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Gly Glu Val His  
1010 1015 1020

Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro  
1025 1030 1035

Ser Gly Gly Glu Val His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu  
1040 1045 1050

Asp Leu Ser Arg Ile Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ile Ser Ala  
1055 1060 1065

Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Gly Leu Pro Ser Gly Glu Glu Gly  
1070 1075 1080

His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Ile  
1085 1090 1095

Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp  
1100 1105 1110

ES 2 399 584 T3

Leu Ile Gly Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser Ala Ser  
1115 1120 1125

Gly Val Glu Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu  
1130 1135 1140

Val Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly  
1145 1150 1155

Glu Gly Pro Glu Val Ser Val Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Arg  
1160 1165 1170

Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser Ala Ser Gly Val Glu  
1175 1180 1185

Asp Leu Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Ile Ser Val  
1190 1195 1200

Ser Gly Val Glu Asp Ile Ser Ile Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro  
1205 1210 1215

Glu Val Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Val Leu Pro Ser  
1220 1225 1230

Gly Glu Gly His Leu Glu Ile Ser Thr Ser Gly Val Glu Asp Leu  
1235 1240 1245

Ser Val Leu Pro Ser Gly Glu Gly His Leu Glu Thr Ser Ser Gly  
1250 1255 1260

ES 2 399 584 T3

Val Glu Asp Ile Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val  
1265 1270 1275

Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Val Leu Pro Ser Gly Glu  
1280 1285 1290

Asp His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Gly Val  
1295 1300 1305

Leu Pro Ser Gly Glu Asp His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val  
1310 1315 1320

Glu Asp Ile Ser Arg Leu Pro Ser Gly Glu Gly Pro Glu Val Ser  
1325 1330 1335

Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Val Leu Pro Ser Gly Glu Gly  
1340 1345 1350

His Leu Glu Ile Ser Ala Ser Gly Val Glu Asp Leu Ser Arg Leu  
1355 1360 1365

Pro Ser Gly Gly Glu Asp His Leu Glu Thr Ser Ala Ser Gly Val  
1370 1375 1380

Gly Asp Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Arg Glu Gly Leu Glu Ile  
1385 1390 1395

Ser Ala Ser Gly Ala Gly Asp Leu Ser Gly Leu Thr Ser Gly Lys  
1400 1405 1410

ES 2 399 584 T3

Glu Asp Leu Thr Gly Ser Ala Ser Gly Ala Leu Asp Leu Gly Arg  
1415 1420 1425

..

Ile Pro Ser Val Thr Leu Gly Ser Gly Gln Ala Pro Glu Ala Ser  
1430 1435 1440

Gly Leu Pro Ser Gly Phe Ser Gly Glu Tyr Ser Gly Val Asp Leu  
1445 1450 1455

Glu Ser Gly Pro Ser Ser Gly Leu Pro Asp Phe Ser Gly Leu Pro  
1460 1465 1470

Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Leu Val Asp Thr Thr Leu Val Glu  
1475 1480 1485

Val Val Thr Ala Thr Thr Ala Gly Glu Leu Glu Gly Arg Gly Thr  
1490 1495 1500

Ile Asp Ile Ser Gly Ala Gly Glu Thr Ser Gly Leu Pro Phe Ser  
1505 1510 1515

Glu Leu Asp Ile Ser Gly Gly Ala Ser Gly Leu Ser Ser Gly Ala  
1520 1525 1530

Glu Leu Ser Gly Gln Ala Ser Gly Ser Pro Asp Ile Ser Gly Glu  
1535 1540 1545

Thr Ser Gly Leu Phe Gly Val Ser Gly Gln Pro Ser Gly Phe Pro  
1550 1555 1560

ES 2 399 584 T3

Asp Ile Ser Gly Glu Thr Ser Gly Leu Leu Glu Val Ser Gly Gln  
1565 1570 1575

Pro Ser Gly Phe Tyr Gly Glu Ile Ser Gly Val Thr Glu Leu Ser  
1580 1585 1590

Gly Leu Ala Ser Gly Gln Pro Glu Ile Ser Gly Glu Ala Ser Gly  
1595 1600 1605

Ile Leu Ser Gly Leu Gly Pro Pro Phe Gly Ile Thr Asp Leu Ser  
1610 1615 1620

Gly Glu Ala Pro Gly Ile Pro Asp Leu Ser Gly Gln Pro Ser Gly  
1625 1630 1635

Leu Pro Glu Phe Ser Gly Thr Ala Ser Gly Ile Pro Asp Leu Val  
1640 1645 1650

Ser Ser Ala Val Ser Gly Ser Gly Glu Ser Ser Gly Ile Thr Phe  
1655 1660 1665

Val Asp Thr Ser Leu Val Glu Val Thr Pro Thr Thr Phe Lys Glu  
1670 1675 1680

Glu Glu Gly Leu Gly Ser Val Glu Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly  
1685 1690 1695

Glu Leu Gly Val Ser Gly Thr Ser Gly Leu Ala Asp Val Ser Gly  
1700 1705 1710

ES 2 399 584 T3

Leu Ser Ser Gly Ala Ile Asp Ser Ser Gly Phe Thr Ser Gln Pro  
1715 1720 1725

Pro Glu Phe Ser Gly Leu Pro Ser Gly Val Thr Glu Val Ser Gly  
1730 1735 1740

Glu Ala Ser Gly Ala Glu Ser Gly Ser Ser Leu Pro Ser Gly Ala  
1745 1750 1755

Tyr Asp Ser Ser Gly Leu Pro Ser Gly Phe Pro Thr Val Ser Phe  
1760 1765 1770

Val Asp Arg Thr Leu Val Glu Ser Val Thr Gln Ala Pro Thr Ala  
1775 1780 1785

Gln Glu Ala Gly Glu Gly Pro Ser Gly Ile Leu Glu Leu Ser Gly  
1790 1795 1800

Ala Pro Ser Gly Ala Pro Asp Met Ser Gly Asp His Leu Gly Ser  
1805 1810 1815

Leu Asp Gln Ser Gly Leu Gln Ser Gly Leu Val Glu Pro Ser Gly  
1820 1825 1830

Glu Pro Ala Ser Thr Pro Tyr Phe Ser Gly Asp Phe Ser Gly Thr  
1835 1840 1845

Thr Asp Val Ser Gly Glu Ser Ser Ala Ala Thr Ser Thr Ser Gly  
1850 1855 1860

ES 2 399 584 T3

Glu Ala Ser Gly Leu Pro Glu Val Thr Leu Ile Thr Ser Glu Leu  
1865 1870 1875

Val Glu Gly Val Thr Glu Pro Thr Val Ser Gln Glu Leu Gly Gln  
1880 1885 1890

Arg Pro Pro Val Thr Tyr Thr Pro Gln Leu Phe Glu Ser Ser Gly  
1895 1900 1905

Glu Ala Ser Ala Ser Gly Asp Val Pro Arg Phe Pro Gly Ser Gly  
1910 1915 1920

Val Glu Val Ser Ser Val Pro Glu Ser Ser Gly Glu Thr Ser Ala  
1925 1930 1935

Tyr Pro Glu Ala Glu Val Gly Ala Ser Ala Ala Pro Glu Ala Ser  
1940 1945 1950

Gly Gly Ala Ser Gly Ser Pro Asn Leu Ser Glu Thr Thr Ser Thr  
1955 1960 1965

Phe His Glu Ala Asp Leu Glu Gly Thr Ser Gly Leu Gly Val Ser  
1970 1975 1980

Gly Ser Pro Ser Ala Phe Pro Glu Gly Pro Thr Glu Gly Leu Ala  
1985 1990 1995

Thr Pro Glu Val Ser Gly Glu Ser Thr Thr Ala Phe Asp Val Ser  
2000 2005 2010

ES 2 399 584 T3

Val Glu Ala Ser Gly Ser Pro Ser Ala Thr Pro Leu Ala Ser Gly  
2015 2020 2025

Asp Arg Thr Asp Thr Ser Gly Asp Leu Ser Gly His Thr Ser Gly  
2030 2035 2040

Leu Asp Ile Val Ile Ser Thr Thr Ile Pro Glu Ser Glu Trp Thr  
2045 2050 2055

Gln Gln Thr Gln Arg Pro Ala Glu Ala Arg Leu Glu Ile Glu Ser  
2060 2065 2070

Ser Ser Pro Val His Ser Gly Glu Glu Ser Gln Thr Ala Asp Thr  
2075 2080 2085

Ala Thr Ser Pro Thr Asp Ala Ser Ile Pro Ala Ser Ala Gly Gly  
2090 2095 2100

Thr Asp Asp Ser Glu Ala Thr Thr Thr Asp Gln Lys Leu Cys Glu  
2105 2110 2115

Glu Gly Trp Thr Lys Phe Gln Gly His Cys Tyr Arg His Phe Pro  
2120 2125 2130

Asp Arg Ala Thr Trp Val Asp Ala Glu Ser Gln Cys Arg Lys Gln  
2135 2140 2145

Gln Ser His Leu Ser Ser Ile Val Thr Pro Glu Glu Gln Glu Phe  
2150 2155 2160

ES 2 399 584 T3

Val Asn Asn Asn Ala Gln Asp Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp  
2165 2170 2175

Lys Thr Ile Glu Gly Asp Phe Arg Trp Ser Asp Gly His Ser Leu  
2180 2185 2190

Gln Phe Glu Asn Trp Arg Pro Asn Gln Pro Asp Asn Phe Phe Ala  
2195 2200 2205

Thr Gly Glu Asp Cys Val Val Met Ile Trp His Glu Lys Gly Glu  
2210 2215 2220

Trp Asn Asp Val Pro Cys Asn Tyr Gln Leu Pro Phe Thr Cys Lys  
2225 2230 2235

Lys Gly Thr Val Ala Cys Gly Glu Pro Pro Val Val Glu His Ala  
2240 2245 2250

Arg Ile Phe Gly Gln Lys Lys Asp Arg Tyr Glu Ile Asn Ala Leu  
2255 2260 2265

Val Arg Tyr Gln Cys Thr Glu Gly Phe Ile Gln Gly His Val Pro  
2270 2275 2280

Thr Ile Arg Cys Gln Pro Ser Gly His Trp Glu Glu Pro Arg Ile  
2285 2290 2295

Thr Cys Thr Asp Pro Ala Thr Tyr Lys Arg Arg Leu Gln Lys Arg  
2300 2305 2310

ES 2 399 584 T3

	Ser	Ser	Arg	Pro	Leu	Arg	Arg	Ser	His	Pro	Ser	Thr	Ala	His
	2315				2320				2325					
5	<210> 8													
	<211> 2076													
	<212> ADN													
	<213> Bos taurus													
10	<220>													
	<221> CDS													
	<222> (1).. (2076)													
	<400> 8													
	atg acc act tta ctc ttg gtg ttt gtg act ctg agg gtc atc aca gca													48
	Met Thr Thr Leu Leu Leu Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala													
	1	5	10	15										
	gcc atc tca gta gaa gtt tca gaa cct gac aac tcg ctg agt gtc agc													96
	Ala Ile Ser Val Glu Val Ser Glu Pro Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser													
	20	25	30											
	atc cct gaa ccg tcc cca ctt cgg gtc ctc ctg ggg agc tcc ctc acc													144
	Ile Pro Glu Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Thr													
	35	40	45											
	atc ccc tgc tac ttc atc gac ccc atg cac ccc gtg acc acc gcc ccc													192
	Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro													
	50	55	60											
	tcc acc gcc ccc ctt gcc cca aga atc aag tgg agc cgc att tcc aag													240
	Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Ile Ser Lys													
	65	70	75	80										
	gag aag gag gtg gtg ctg ctg gtg gcc act gaa ggg cgg gtg cgg gtc													288
	Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val													
	85	90	95											

# ES 2 399 584 T3

aac agc gcc tac caa gac aag gtc acg ctg ccc aac tac ccc gcc atc	336		
Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Thr Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile			
100	105	110	
ccc agc gac gcc acc ctg gaa atc cag aac atg cgc tcc aat gac tcc	384		
Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Asn Met Arg Ser Asn Asp Ser			
115	120	125	
ggg att cta cgc tgc gag gtg atg cac ggc atc gag gac agc cag gcc	432		
Gly Ile Leu Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Gln Ala			
130	135	140	
acc cta gag gtc gtg gta aaa ggc atc gtg ttc cat tac aga gcc atc	480		
Thr Leu Glu Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile			
145	150	155	160
tcc acg cgc tac acc ctg gac ttt gac agg ggc cag cgg gcc tgc ctg	528		
Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu			
165	170	175	
cag aac agc gcc atc atc gcc acg ccc gag cag ctg cag gct gcc tat	576		
Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr			
180	185	190	
gag gac ggc ttc cac cag tgc gac gcc ggc tgg ctg gcc gat cag act	624		
Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr			
195	200	205	
gtg agg tat ccc atc cac acg ccg agg gaa ggt tgc tat gga gac aag	672		
Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys			
210	215	220	
gac gag ttt ccc ggc gtg aga acc tac ggc atc cgg gac acc aac gaa	720		
Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu			
225	230	235	240
acc tat gac gtg tac tgc ttc ggc gag gag atg gag ggc gag gtc ttc	768		
Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe			
245	250	255	

## ES 2 399 584 T3

tat gca aca tcc ccg gag aag ttc acc ttc caa gag gca gcc aac gag	260	265	270	816
Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu				
tgc cgg cgg ctg ggc gcc cgg ctg gcc acc acg ggc caa ctc tac ctg	275	280	285	864
Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu				
gcc tgg cag ggt ggc atg gac atg tgc agc gcc ggc tgg ctg gct gac	290	295	300	912
Ala Trp Gln Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp				
cgc agc gtg cga tac ccc atc tcc aag gcc cgg cct aac tgc ggg ggc	305	310	315	960
Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly				
aac ctc ctg gga gtg agg acc gtc tac ctg cac gcc aac cag acg ggc	325	330	335	1008
Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly				
tac cct gac cct tca tcc cgc tat gac gcc atc tgc tac aca ggt gaa	340	345	350	1056
Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu				
gac ttt gtg gac atc cca gaa agc ttt ttc ggg gtg ggc ggt gag gag	355	360	365	1104
Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Ser Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu				
gac atc acc atc cag acg gtg acc tgg cct gac gtg gag ctg ccc ctg	370	375	380	1152
Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Leu				
ccc cga aat atc act gag ggt gaa gcc cga ggc agc gtg atc ctc acg	385	390	395	1200
Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr				
gca aag ccc gac ttt gaa gtc tcc ccc acc gcc ccg gaa ccc gag gag	405	410	415	1248
Ala Lys Pro Asp Phe Glu Val Ser Pro Thr Ala Pro Glu Pro Glu Glu				

## ES 2 399 584 T3

cct ttc acg ttt gtc cct gaa gta agg gcc act gca ttc ccc gaa gta	1296		
Pro Phe Thr Phe Val Pro Glu Val Arg Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val			
420	425	430	
gag aac agg act gaa gag gcc acc cgg ccc tgg gcc ttt ccc aga gag	1344		
Glu Asn Arg Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Arg Glu			
435	440	445	
tcc acc ccc ggc ctg gga gcc ccc acg gcc ttc acc agc gag gac ctc	1392		
Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu			
450	455	460	
gtc gtg cag gtg acc tta gcc cca ggt gcg gct gag gtc cct ggg cag	1440		
Val Val Gln Val Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln			
465	470	475	480
cca cga ctg cca ggg gga gtc gtg ttc cac tac cgc ccg ggc tcc tcc	1488		
Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Ser			
485	490	495	
cgc tac tcg ctg acc ttt gag gag gcc aag cag gcc tgc ctg cgc acc	1536		
Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Lys Gln Ala Cys Leu Arg Thr			
500	505	510	
ggg gcc atc atc gcc tcg ccc gag cag ctc cag gcc tat gaa gca	1584		
Gly Ala Ile Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala			
515	520	525	
ggc tac gag cag tgt gac gcc ggc tgg ctg cag gac cag aca gtc aga	1632		
Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg			
530	535	540	
tac ccc att gtg agc ccg cgg acc ccc tgt gtg ggt gac aag gac agc	1680		
Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser			
545	550	555	560
agc ccg ggg gtc cgg acc tac ggc gtg cgg cca cca tca gaa acc tac	1728		
Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr			
565	570	575	

## ES 2 399 584 T3

gat gtc tac tgc tac gtg gac aga ctc gag ggg gag gtg ttc ttc gcc	580	585	590	1776
Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala				
aca cgc ctg gag cag ttc acc ttc tgg gaa gcc cag gag ttc tgt gaa	595	600	605	1824
Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Trp Glu Ala Gln Glu Phe Cys Glu				
tcc caa aac gcc act ctg gcc acc aca ggc cag ctc tat gct gcc tgg	610	615	620	1872
Ser Gln Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp				
agc cgt ggt ctg gac aag tgc tac gcc ggc tgg ctg gct gac ggc agc	625	630	635	1920
Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser				
ctc cgc tac ccc atc gtc acc cca agg ccc gcc tgt ggc ggg gac aaa	645	650	655	1968
Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys				
ccg ggc gtg aga acc gtc tac ctc tac ccc aac cag acg ggc ctc ctg	660	665	670	2016
Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Leu				
gat ccg ctg tcc cgg cac cac gcc ttc tgc ttc cga ggt gtt tca gcg	675	680	685	2064
Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala				
gcg ccc tct cca	690			2076
Ala Pro Ser Pro				
<210> 9				
<211> 692				
<212> PRT				
<213> Bos taurus				
<400> 9				

ES 2 399 584 T3

Met Thr Thr Leu Leu Leu Val Phe Val Thr Leu Arg Val Ile Thr Ala  
1 5 10 15

Ala Ile Ser Val Glu Val Ser Glu Pro Asp Asn Ser Leu Ser Val Ser  
20 25 30

Ile Pro Glu Pro Ser Pro Leu Arg Val Leu Leu Gly Ser Ser Leu Thr  
35 40 45

Ile Pro Cys Tyr Phe Ile Asp Pro Met His Pro Val Thr Thr Ala Pro  
50 55 60

Ser Thr Ala Pro Leu Ala Pro Arg Ile Lys Trp Ser Arg Ile Ser Lys  
65 70 75 80

Glu Lys Glu Val Val Leu Leu Val Ala Thr Glu Gly Arg Val Arg Val  
85 90 95

Asn Ser Ala Tyr Gln Asp Lys Val Thr Leu Pro Asn Tyr Pro Ala Ile  
100 105 110

Pro Ser Asp Ala Thr Leu Glu Ile Gln Asn Met Arg Ser Asn Asp Ser  
115 120 125

Gly Ile Leu Arg Cys Glu Val Met His Gly Ile Glu Asp Ser Gln Ala  
130 135 140

Thr Leu Glu Val Val Lys Gly Ile Val Phe His Tyr Arg Ala Ile  
145 150 155 160

ES 2 399 584 T3

Ser Thr Arg Tyr Thr Leu Asp Phe Asp Arg Ala Gln Arg Ala Cys Leu  
165 170 175

Gln Asn Ser Ala Ile Ile Ala Thr Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr  
180 185 190

Glu Asp Gly Phe His Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gln Thr  
195 200 205

Val Arg Tyr Pro Ile His Thr Pro Arg Glu Gly Cys Tyr Gly Asp Lys  
210 215 220

Asp Glu Phe Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Ile Arg Asp Thr Asn Glu  
225 230 235 240

Thr Tyr Asp Val Tyr Cys Phe Ala Glu Glu Met Glu Gly Glu Val Phe  
245 250 255

Tyr Ala Thr Ser Pro Glu Lys Phe Thr Phe Gln Glu Ala Ala Asn Glu  
260 265 270

Cys Arg Arg Leu Gly Ala Arg Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Leu  
275 280 285

Ala Trp Gln Gly Gly Met Asp Met Cys Ser Ala Gly Trp Leu Ala Asp  
290 295 300

Arg Ser Val Arg Tyr Pro Ile Ser Lys Ala Arg Pro Asn Cys Gly Gly  
305 310 315 320

ES 2 399 584 T3

Asn Leu Leu Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu His Ala Asn Gln Thr Gly  
325 330 335

Tyr Pro Asp Pro Ser Ser Arg Tyr Asp Ala Ile Cys Tyr Thr Gly Glu  
340 345 350

Asp Phe Val Asp Ile Pro Glu Ser Phe Phe Gly Val Gly Gly Glu Glu  
355 360 365

Asp Ile Thr Ile Gln Thr Val Thr Trp Pro Asp Val Glu Leu Pro Leu  
370 375 380

Pro Arg Asn Ile Thr Glu Gly Glu Ala Arg Gly Ser Val Ile Leu Thr  
385 390 395 400

Ala Lys Pro Asp Phe Glu Val Ser Pro Thr Ala Pro Glu Pro Glu Glu  
405 410 415

Pro Phe Thr Phe Val Pro Glu Val Arg Ala Thr Ala Phe Pro Glu Val  
420 425 430

Glu Asn Arg Thr Glu Glu Ala Thr Arg Pro Trp Ala Phe Pro Arg Glu  
435 440 445

Ser Thr Pro Gly Leu Gly Ala Pro Thr Ala Phe Thr Ser Glu Asp Leu  
450 455 460

Val Val Gln Val Thr Leu Ala Pro Gly Ala Ala Glu Val Pro Gly Gln  
465 470 475 480

ES 2 399 584 T3

Pro Arg Leu Pro Gly Gly Val Val Phe His Tyr Arg Pro Gly Ser Ser  
485 490 495

Arg Tyr Ser Leu Thr Phe Glu Glu Ala Lys Gln Ala Cys Leu Arg Thr  
500 505 510

Gly Ala Ile Ile Ala Ser Pro Glu Gln Leu Gln Ala Ala Tyr Glu Ala  
515 520 525

Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Gln Asp Gln Thr Val Arg  
530 535 540

Tyr Pro Ile Val Ser Pro Arg Thr Pro Cys Val Gly Asp Lys Asp Ser  
545 550 555 560

Ser Pro Gly Val Arg Thr Tyr Gly Val Arg Pro Pro Ser Glu Thr Tyr  
565 570 575

Asp Val Tyr Cys Tyr Val Asp Arg Leu Glu Gly Glu Val Phe Phe Ala  
580 585 590

Thr Arg Leu Glu Gln Phe Thr Phe Trp Glu Ala Gln Glu Phe Cys Glu  
595 600 605

Ser Gln Asn Ala Thr Leu Ala Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp  
610 615 620

Ser Arg Gly Leu Asp Lys Cys Tyr Ala Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser  
625 630 635 640

ES 2 399 584 T3

Leu Arg Tyr Pro Ile Val Thr Pro Arg Pro Ala Cys Gly Gly Asp Lys  
645 650 655

Pro Gly Val Arg Thr Val Tyr Leu Tyr Pro Asn Gln Thr Gly Leu Leu  
660 665 670

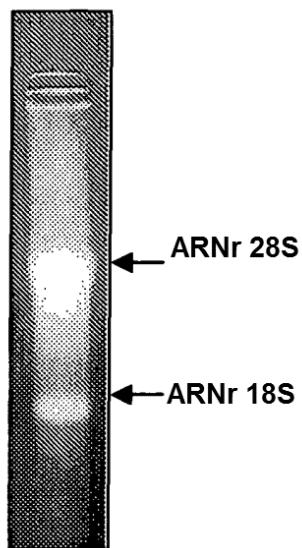
Asp Pro Leu Ser Arg His His Ala Phe Cys Phe Arg Gly Val Ser Ala  
675 680 685

Ala Pro Ser Pro  
690

## REIVINDICACIONES

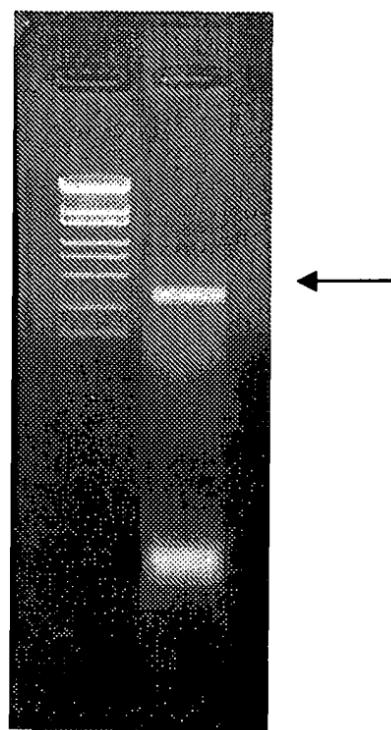
1. Un polinucleótido que codifica para una proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2, en el que la secuencia de aminoácidos tiene un residuo de isoleucina en la posición 130 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos, y un residuo de aminoácido seleccionado de entre un residuo de tirosina, un residuo de serina, un residuo de treonina, un residuo de cisteína, un residuo de asparragina y un residuo de glutamina en la posición 131 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos.
- 5 2. El polinucleótido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos se muestra en la ID. SEC. N°: 4.
- 10 3. El polinucleótido según la reivindicación 1, en el que el polinucleótido que codifica para una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2 es un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1; una base en la posición 390 a partir del 5' terminal del polinucleótido es la base seleccionada de entre T, C y A; y las bases en las posiciones 391 hasta 393 a partir del 5' terminal son secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre TAT, TAC, TCT, TCC, TCA, TCG, ACT, ACC, ACA, 15 ACG, TGT, TGC, AAT, AAC, CAA y CAG (en esta relación, A representa adenina, C representa citosina, G representa guanina y T representa timina, respectivamente, y en lo sucesivo igual que anteriormente).
4. El polinucleótido según la reivindicación 3, en el que la secuencia de nucleótidos de las posiciones 391 hasta 393 es TAT.
5. El polinucleótido según la reivindicación 3, en el que la base de la posición 390 es C.
- 20 6. El polinucleótido según la reivindicación 3, que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 3.
7. Una proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico, en la que la proteína comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. N°: 2; un residuo de aminoácido en la posición 130 a partir del N-terminal de la secuencia de aminoácidos es isoleucina; un residuo de aminoácido en la posición 131 es un residuo de un aminoácido seleccionado de entre un residuo de tirosina, un residuo de serina, un residuo de treonina, un residuo de cisteína, un residuo de asparragina y un residuo de glutamina.
- 25 8. La proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico según la reivindicación 7, en la que la secuencia de aminoácidos se muestra en la ID. SEC. N°: 4.
9. Un procedimiento para producir la proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico según la reivindicación 7, que comprende; 30 cultivar una célula hospedadora transfected por un Baculovirus integrado con un vector de expresión recombinante con un polinucleótido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la ID. SEC. N°: 1, o un transformante obtenido transformando las células hospedadoras con el vector de expresión recombinante, y separar y purificar una proteína a partir del medio de cultivo.
- 35 10. Un procedimiento para medir el ácido hialurónico, que comprende; poner en contacto el ácido hialurónico de una muestra con la proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico según la reivindicación 7 para formar un complejo entre el ácido hialurónico y la proteína, 40 hacer reaccionar el complejo con un portador que soporta un anticuerpo específico para la proteína, medir un cambio óptico mediante un aglutinado obtenido a partir de la reacción, y calcular la cantidad de ácido hialurónico a partir del valor medido.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en el que el portador es látex.
12. Un kit de reactivos para medir el ácido hialurónico, que comprende la proteína con capacidad de unión al ácido hialurónico según la reivindicación 7 como un constituyente.

[Fig.1]

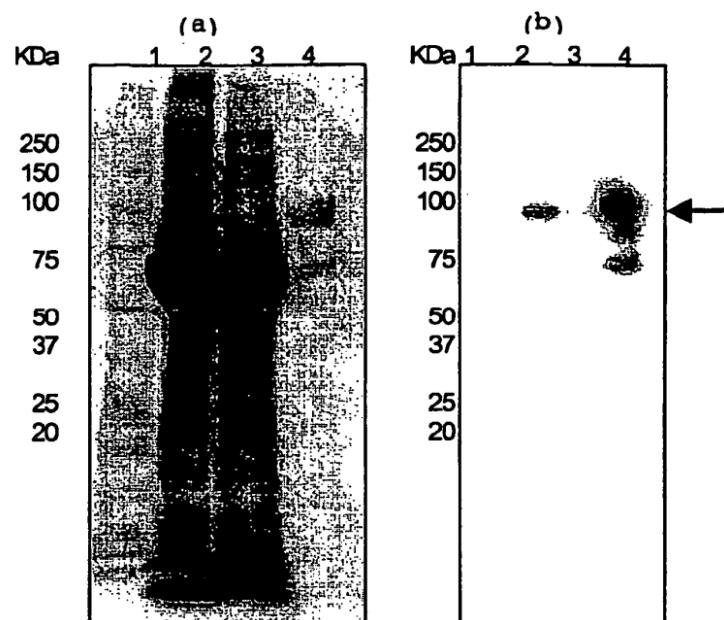


[Fig.2]

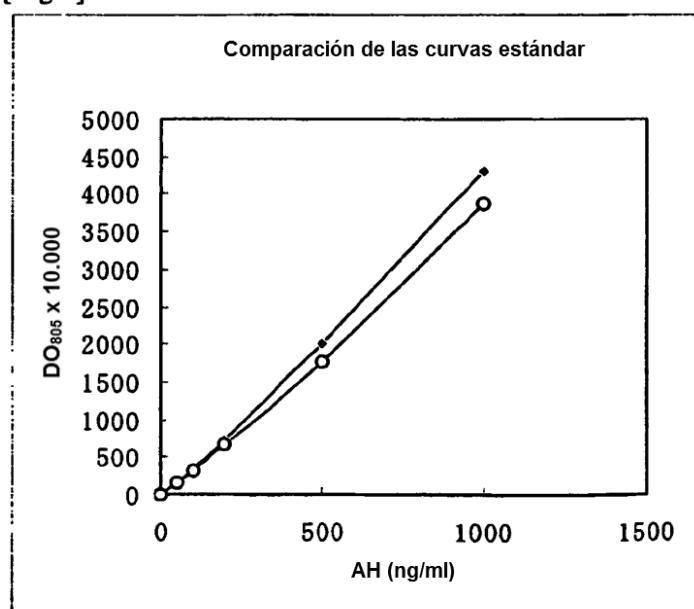
1            2



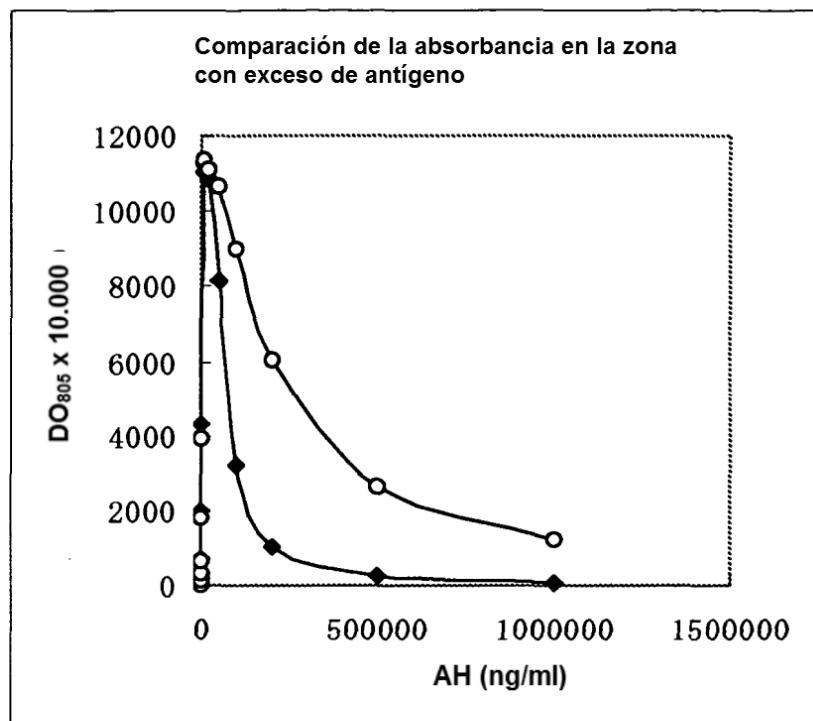
[Fig.3]



[Fig.4]



[Fig.5]



[Fig.6]

