

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 443 042**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2007 E 07818638 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013 EP 2102357**

54 Título: **LTBP2 como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica**

30 Prioridad:

16.10.2006 EP 06021595

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.02.2014

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH
(100.0%)
Alfred-Nobel-Strasse 10
40789 Monheim, DE**

72 Inventor/es:

**GOLZ, STEFAN;
SUMMER, HOLGER;
GEERTS, ANDREAS;
BRÜGGEMEIER, ULF;
ALBRECHT-KÜPPER, BARBARA;
KLEIN, MARTINA;
STEPPAN, SONJA;
ELLINGHAUS, PETER;
D'URSO, DONATELLA;
SEEWALD, MICHAEL y
MILTING, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 443 042 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

LTBP2 como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica

Campo técnico de la invención

5 La presente invención pertenece al campo de la biología molecular, más particularmente la presente invención se refiere al uso de ARNm de LTBP2 como biomarcador de diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva.

Antecedentes de la invenciónTecnología TaqMan / perfilado de expresión

10 TaqMan es una técnica recientemente desarrollada, en la que la liberación de un colorante indicador fluorescente de una sonda de hibridación en tiempo real durante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es proporcional a la acumulación de producto de PCR. La cuantificación se basa en la parte lineal temprana de la reacción, y determinando el ciclo umbral (CU), al que la fluorescencia se detecta primero por encima de la referencia.

15 Las tecnologías de expresión génica pueden ser útiles en varias áreas del descubrimiento y desarrollo de fármacos, tales como identificación de dianas, optimización de cabezas de serie e identificación de mecanismos de acción. La tecnología TaqMan puede usarse para comparar diferencias entre perfiles de expresión de tejido normal y tejido enfermo. El perfilado de expresión se ha usado en la identificación de genes, que son regulados por incremento o por disminución en una variedad de enfermedades. Una aplicación interesante del perfilado de expresión es la monitorización temporal de cambios en la expresión génica durante la progresión de la enfermedad y tratamiento con fármacos o en pacientes frente a individuos sanos. La suposición en este enfoque es que los cambios en el patrón de expresión génica en respuesta a estímulos fisiológicos o medioambientales (por ejemplo, fármacos) pueden servir de pistas indirectas sobre genes causantes de enfermedad o dianas de fármaco. Además, los efectos de fármacos con eficacia establecida sobre patrones de expresión génica globales pueden proporcionar una indicación, o una forma genética, contra la que puede compararse un nuevo candidato a fármaco.

LTBP2

25 La secuencia de nucleótidos de LTBP2 está accesible en las bases de datos por el número de acceso Z37976 (humana) y Y12760 (rata). Las secuencias se administran en SEC ID N°: (humana) y SEC ID N°: 2 (rata). La secuencia de aminoácidos de LTBP2 representada en SEC ID N°: 3 (humana) y SEC ID N°: 4 (rata).

30 Las citocinas del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) son una familia multifuncional que ejerce una amplia variedad de efectos sobre tanto células de mamífero normales como transformadas. La secreción y activación de TGF β está regulada por su asociación con proteínas asociadas a latencia y proteínas de unión a TGF β latente (LTBP). El factor de crecimiento transformante β (TGF β) existe como tres isoformas de mamífero (TGF β 1, TGF β 2 y TGF β 3). Cada uno de éstas es normalmente secretada en grandes complejos latentes (LLC) que no tienen actividad biológica y comprenden tres componentes: un homodímero unido por disulfuro de TGF β maduro asociado no covalentemente con proteínas asociadas a latencia (LAP; homodímeros del fragmento del extremo N de TGF β precursor) y una molécula covalentemente unida de proteína de unión a TGF β latente (LTBP). Se han identificado cuatro genes LTBP: LTBP1 a LTBP4. Las LAP son suficientes para convertir el homodímero maduro en inactivo, y eliminación de tanto las LAP como las LTBP o la modulación de su interacción es esencial para que funcione cualquiera de las isoformas de TGF β . Las citocinas de TGF β modulan el crecimiento y funciones de una amplia variedad de tipos de células de mamífero. Es evidente en los últimos años que las LTBP pueden participar en el ensamblaje, secreción y elección como diana de TGF β para sitios en los que se almacena y/o activa. Así, estas proteínas pueden desempeñar funciones críticas en controlar y dirigir la actividad de TGF β . Las LTBP pueden también ejercer efectos independientemente de aquellos asociados a TGF β , por ejemplo, como proteínas de matriz estructural [Oklu y col., (2000)]

45 Se sabe relativamente poco sobre la función funcional de LTBP2. A diferencia de las otras LTBP, LTBP2 es incapaz de asociarse al TGF β latente pequeño [Saharinen y col. (2000)]. LTBP2 humana se expresa principalmente en el pulmón y a menor grado en el hígado, músculo esquelético, placenta y corazón [Vehvilainen y col. (2003)]. La proteína de unión a TGF β latente LTBP2 disminuye la adhesión de fibroblastos a fibronectina [Hyytiainen y col. (2003)]. La elucidación de la función funcional de LTBP2 está adicionalmente limitada por el hecho de que la delección de LTBP2 en ratones conduce a letalidad embrionaria [Shiple y col. (2000)].

50 Con respecto a una función funcional de LTBP2 en el sistema cardiovascular, se demostró que la síntesis de LTBP2 aumentó en respuesta a lesión arterial en un modelo porcino de angioplastia coronaria [Sinha y col. (2000)]. Así, junto con la muy conocida función de TGF β en el desarrollo de insuficiencia cardíaca [Watkins y col. (2006)], el hallazgo de los presentes inventores de que la función de TGF β que modifica LTBP2 está regulada en el nivel de ARN en corazones de DAVI, además de en diversos modelos animales de insuficiencia cardíaca hace que LTBP2 sea un atractivo biomarcador candidato para CHF.

LTBP2 se publica (pero no se limita a) en las patentes WO2004075835 y WO02068579.

Se conocía la expresión diferencial génica en insuficiencia cardíaca (por ejemplo, Tan y col., 2002, PNAS, vol. 99 (nº 17): 11387 - 11392.

Sumario de la invención

- 5 La invención definida en las reivindicaciones adjuntas se refiere al uso de ARNm de LTBP2 como biomarcador en el diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva.

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 muestra la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de LTBP2 humano (SEC ID Nº: 1).
- La Fig. 2 muestra la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido de LTBP2 de rata (SEC ID Nº: 2).
- 10 La Fig. 3 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de LTBP2 humano (SEC ID Nº: 3).
- La Fig. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de LTBP2 de rata (SEC ID Nº: 4).
- La Fig. 5 muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador útil para la invención (SEC ID Nº: 5).
- La Fig. 6 muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador útil para la invención (SEC ID Nº: 6).
- La Fig. 7 muestra una secuencia de nucleótidos útil como sonda para detectar proteínas de la invención (SEC ID Nº: 7).
- 15 La Fig. 8 muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador útil para la invención (SEC ID Nº: 8).
- La Fig. 9 muestra la secuencia de nucleótidos de un cebador útil para la invención (SEC ID Nº: 9).
- La Fig. 10 muestra una secuencia de nucleótidos útil como sonda para detectar proteínas de la invención (SEC ID Nº: 10).
- 20 La Fig. 11 muestra los resultados de análisis de expresión en tiempo real de LTBP2 en corazones de rata (DOCA). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C1: compuesto P / concentración 1; C2: compuesto P / concentración 2; C3: compuesto P / concentración. La expresión de LTBP2 está regulada dependiente del estado de enfermedad, tratamiento y dosis en el modelo animal.
- La Fig. 12 muestra los resultados de análisis de expresión en tiempo real de LTBP2 en corazones de rata (oclusión). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C1: compuesto P / concentración 1; C2: compuesto P / concentración 2; C3: compuesto P / concentración. La expresión de LTBP2 está regulada dependiente del estado de enfermedad, tratamiento y dosis en el modelo animal.
- 25 La Fig. 13 muestra los resultados de análisis de expresión en tiempo real de LTBP2 en corazones de rata (monocrotalina). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C1: compuesto P / concentración 1; C2: compuesto P / concentración 2. La expresión de LTBP2 está regulada dependiente del estado de enfermedad, tratamiento y dosis en el modelo animal.
- 30 La Fig. 14 muestra los resultados de análisis de expresión de micromatrices de LTBP2 en corazones de rata (DOCA). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C: compuesto P / concentración 1; D: compuesto P / concentración 2. La expresión de LTBP2 está regulada dependiente del estado de enfermedad, tratamiento y dosis en el modelo animal.
- 35 La Fig. 15 muestra los resultados de análisis de expresión de micromatrices de LTBP2 en corazones de rata (oclusión). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C: compuesto P / concentración 1; D: compuesto P / concentración 2. La expresión de LTBP2 está regulada dependiente del estado de enfermedad, tratamiento y dosis en el modelo animal.
- 40 La Fig. 16 muestra los resultados de análisis de expresión de micromatrices de LTBP2 en corazones de rata (monocrotalina). Eje X: tratamiento; eje Y: expresión relativa; A: control; B: control/placebo; C: compuesto P / concentración 1; D: compuesto P / concentración 2. La expresión de LTBP2 está regulada dependiente del estado de enfermedad, tratamiento y dosis en el modelo animal.
- 45 La Fig. 17 muestra los resultados de análisis de expresión de micromatrices de LTBP2 en corazones humanos. Eje X: estado de enfermedad; eje Y: expresión relativa; N: sin fallo; P: pre-DAVI. La expresión de LTBP2 está regulada en estado de enfermedad en corazón humano.

Descripción detallada de la invención**Definición de términos**

- 5 Un “oligonucleótido” es un estiramiento de residuos de nucleótidos que tiene un número de bases suficiente que va a usarse como oligómero, amplímero o sonda en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos se preparan a partir de secuencia de ADN genómico o ADNc y se usan para amplificar, revelar o confirmar la presencia de un ADN o ARN similar en una célula o tejido particular. Los oligonucleótidos u oligómeros comprenden porciones de una secuencia de ADN que tiene al menos aproximadamente 10 nucleótidos y hasta aproximadamente 35 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 25 nucleótidos.
- 10 Las “sondas” pueden derivarse de ácidos nucleicos que se producen naturalmente o monocatenarios o bicatenarios recombinantes o pueden sintetizarse químicamente. Son útiles en detectar la presencia de secuencias idénticas o similares. Tales sondas pueden marcarse con moléculas indicadoras usando traducción de mellas, reacción de llenado de Klenow, PCR u otros procedimientos muy conocidos en la técnica. Pueden usarse sondas de ácido nucleico en hibridaciones Southern, Northern o *in situ* para determinar si el ADN o ARN que codifica una cierta proteína está presente o no en un tipo de célula, tejido u órgano.
- 15 Un “fragmento de un polinucleótido” es un ácido nucleico que comprende toda o cualquier parte de una molécula de nucleótido dada, teniendo el fragmento menos nucleótidos de aproximadamente 6 kb, preferentemente menos de aproximadamente 1 kb.
- 20 “Moléculas indicadoras” son radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos que se asocian con una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos particular, estableciendo así la presencia de una cierta secuencia, o permitiendo la cuantificación de una cierta secuencia.
- Pueden construirse moléculas “quiméricas” introduciendo toda o parte de la secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector que contiene secuencia de ácidos nucleicos adicional que podría esperarse que cambiara una cualquiera o varias de las siguientes características de LTBP2: localización celular, distribución, afinidades de unión a ligando, afinidades entre cadenas, degradación/tasa de renovación, señalización, etc.
- 25 “Activo”, con respecto a un polipéptido de LTBP2, se refiere a aquellas formas, fragmentos o dominios de un polipéptido de LTBP2 que retienen la actividad biológica y/o antigénica de un polipéptido de LTBP2.
- 30 “Polipéptido de LTBP2 que se produce naturalmente” se refiere a un polipéptido producido por células que no se han modificado genéticamente y específicamente contempla diversos polipéptidos que se producen a partir de modificaciones postraduccionales del polipéptido que incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.
- “Derivado” se refiere a polipéptidos que se han modificado químicamente por técnicas tales como ubiquitinación, marcado (véase anteriormente), PEGilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución química de aminoácidos tales como ornitina que normalmente no se producen en proteínas humanas.
- 35 “Sustituciones de aminoácidos conservativas” resultan de la sustitución de un aminoácido con otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, o una treonina con una serina.
- Las “inserciones” o “deleciones” están normalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse experimentalmente produciendo el péptido sintéticamente mientras que se hacen sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de nucleótidos en la secuencia usando técnicas de ADN recombinante.
- 40 Una “secuencia señal” o “secuencia conductora” puede usarse, cuando se desee, para dirigir el polipéptido a través de una membrana de una célula. Una secuencia tal puede estar naturalmente presente en los polipéptidos de la presente invención o proporcionarse a partir de fuentes heterólogas por técnicas de ADN recombinante.
- 45 Un “oligopéptido” es un estiramiento corto de residuos de aminoácidos y puede expresarse a partir de un oligonucleótido. Los oligopéptidos comprenden un estiramiento de residuos de aminoácidos de al menos 3, 5, 10 aminoácidos y como máximo 10, 15, 25 aminoácidos, normalmente de al menos 9 a 13 aminoácidos, y de suficiente longitud para mostrar actividad biológica y/o antigénica.
- “Inhibidor” es cualquier sustancia que retarda o previene una reacción o respuesta química o fisiológica. Inhibidores comunes incluyen, pero no se limitan a, moléculas antisentido, anticuerpos y antagonistas.
- 50 “Biomarcador” son parámetros biológicos medibles y cuantificables (por ejemplo, concentración de enzimas específica, concentración de hormonas específica, distribución de fenotipos de genes específicos en una población, presencia de

sustancias biológicas) que sirven de índices para evaluaciones relacionadas con la salud y la fisiología tales como riesgo de enfermedad, trastornos psiquiátricos, exposición medioambiental y sus efectos, diagnóstico de enfermedad, procesos metabólicos, drogadicción, embarazo, desarrollo de líneas celulares, estudios epidemiológicos, etc. El parámetro que puede usarse para identificar un efecto tóxico en un organismo individual y puede usarse en extrapolación entre especies. El indicador que señala un evento o afección en un sistema biológico o muestra y que da una medida de exposición, efecto o susceptibilidad.

Los marcadores biológicos pueden reflejar una variedad de características de enfermedad, que incluyen el nivel de exposición a un desencadenante medioambiental o genético, un elemento del propio proceso de enfermedad, una etapa intermedia entre la exposición y la aparición de enfermedad, o un factor independiente asociado al estado de enfermedad, pero no causante de patogénesis. Dependiendo de la característica específica, los biomarcadores pueden usarse para identificar el riesgo de desarrollar una enfermedad (biomarcadores de referencia), ayudar en identificar enfermedad (biomarcadores de diagnóstico), o predecir la futura evolución de la enfermedad, que incluye respuesta a terapia (biomarcadores de pronóstico).

La "expresión estándar" es una medición cuantitativa o cualitativa para comparación. Se basa en un número estadísticamente apropiado de muestras normales y se crea para usar como base de comparación cuando se realizan ensayos de diagnóstico, ejecución de ensayos clínicos, o seguir perfiles de tratamiento de pacientes.

"Animal", como se usa en el presente documento, puede definirse que incluye especies humanas, domésticas (por ejemplo, gatos, perros, etc.), agrícolas (por ejemplo, vacas, caballos, ovejas, etc.) o especies para ensayo (por ejemplo, ratón, rata, conejo, etc.).

Un "polinucleótido de LTBP2", dentro del significado de la invención, debe entenderse que es una molécula de ácido nucleico seleccionada de un grupo que consiste en

(i) moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4,

(ii) moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2,

(iii) moléculas de ácidos nucleicos que tienen la secuencia de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2,

(iv) moléculas de ácidos nucleicos cuya hebra complementaria se hibrida bajo condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico de (i), (ii) o (iii),

(v) moléculas de ácidos nucleicos cuya secuencia se diferencia de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético,

(vi) moléculas de ácidos nucleicos que tienen una identidad de secuencias de al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o el 99%; y

(vii) en el que el polipéptido codificado por dichas moléculas de ácidos nucleicos de (i)-(vi) tienen actividad de LTBP2.

Un "polipéptido de LTBP2", dentro del significado de la invención, debe entenderse que es un polipéptido seleccionado de un grupo que consiste en

(i) polipéptidos que tienen la secuencia de SEC ID N°: 3 ó 4,

(ii) polipéptidos que comprenden la secuencia de SEC ID N°: 3 ó 4,

(iii) polipéptidos codificados por polinucleótidos de LTBP2; y

(iv) polipéptidos que muestran al menos el 99%, 98%, 95%, 90% o el 80% de identidad con un polipéptido de (i), (ii) o (iii);

en el que dicho polipéptido tiene actividad de LTBP2.

Las secuencias de nucleótidos que codifican una LTBP2 (o su complemento) tienen numerosas aplicaciones en técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia de la biología molecular. Estas técnicas incluyen uso como sondas de hibridación, uso en la construcción de oligómeros para PCR, uso para mapeo de cromosomas y génico, uso en la producción recombinante de LTBP2 y uso en generación de ADN o ARN antisentido, sus análogos químicos y similares. Usos de nucleótidos que codifican una LTBP2 en el presente documento se desvelan a modo de ejemplo de técnicas conocidas y no pretenden limitar su uso en ninguna técnica conocida para una persona experta habitual en la materia. Además, las secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento pueden usarse en técnicas de

biología molecular que todavía no se han desarrollado, dado que las nuevas técnicas se basan en propiedades de secuencias de nucleótidos que son actualmente conocidas, por ejemplo, el código genético triplete, interacciones de pares de bases específicos, etc.

5 Se apreciará por aquellos expertos en la materia que como resultado de la degeneración del código genético puede producirse una multitud de LTBP2 - que codifica secuencias de nucleótidos. Algunas de éstas solo poseerán homología mínima con la secuencia de nucleótidos de la LTBP2 conocida y que se produce naturalmente. La invención ha contemplado específicamente todas y cada variación posible de secuencia de nucleótidos que podría prepararse seleccionando combinaciones basadas en posibles elecciones de codones. Estas combinaciones se hacen según el código genético de triplete estándar como se aplica a la secuencia de nucleótidos de LTBP2 que se produce naturalmente, y todas aquellas deben considerarse como que se han desvelado específicamente.

10 Aunque las secuencias de nucleótidos que codifican una LTBP2, sus derivados o sus variantes pueden hibridarse preferentemente con la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de LTBP2 que se producen naturalmente bajo condiciones rigurosas, puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos de LTBP2 o sus derivados que poseen un uso de codones sustancialmente diferente. Los codones pueden seleccionarse para aumentar la tasa a la que se produce la expresión del péptido en un huésped de expresión procariota o eucariota particular según la frecuencia con la que se utilizan codones particulares por el huésped. Otros motivos para alterar sustancialmente la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de LTBP2 y/o sus derivados sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada incluyen la producción de transcritos de ARN que tienen propiedades más deseables tales como una mayor semivida que los transcritos producidos a partir de la secuencia que se produce naturalmente.

15 Secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido de LTBP2 pueden unirse a una variedad de otras secuencias de nucleótidos por medio de técnicas de ADN recombinante bien establecidas. Secuencias de nucleótidos útiles para unirse con polinucleótidos de LTBP2 incluyen una selección de vectores de clonación tales como plásmidos, cósmidos, derivados del fago lambda, fagémidos, y similares. Vectores de interés incluyen vectores de expresión, vectores de replicación, vectores de generación de sondas, vectores de secuenciación, etc. En general, los vectores de interés pueden contener un origen de replicación funcional en al menos un organismo, sitios sensibles a endonucleasa de restricción convenientes y marcadores de selección para uno o más sistemas de células huésped.

20 Otro aspecto de la invención objeto es proporcionar sondas de hibridación específicas de LTBP2 que pueden hibridarse con secuencias de nucleótidos que se producen naturalmente que codifican LTBP2. Tales sondas también pueden usarse para la detección de secuencias codificantes de proteínas similares y deben mostrar preferentemente al menos el 40% de identidad de nucleótidos con polinucleótidos de LTBP2. Las sondas de hibridación de la invención objeto pueden derivarse de la secuencia de nucleótidos presentada como SEC ID N°: 1 o de secuencias genómicas que incluyen promotor, potenciadores o intrones del gen nativo. Pueden marcarse sondas de hibridación mediante una variedad de moléculas indicadoras usando técnicas muy conocidas en la técnica.

25 Se reconocerá que muchos análogos de delección o de mutación de polinucleótidos de LTBP2 serán sondas de hibridación eficaces para polinucleótidos de LTBP2. Por consiguiente, la invención se refiere a secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan con tales secuencias de ácidos nucleicos que codifican LTBP2 bajo condiciones rigurosas.

30 "Condiciones rigurosas" se refiere a condiciones que permiten la hibridación de secuencias de ácidos nucleicos sustancialmente relacionadas. Por ejemplo, tales condiciones permitirán generalmente la hibridación de secuencia con al menos aproximadamente el 85% de identidad de secuencias, preferentemente con al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias, más preferentemente con al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencias. Las condiciones de hibridación y sondas pueden ajustarse de formas bien caracterizadas para lograr la hibridación selectiva de sondas derivadas de ser humano. Condiciones rigurosas, dentro del significado de la invención, son 68 °C en un tampón que contiene 0,2 x SSC (1x solución salina-citrato estándar = NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM) [Sambrook y col., (1989)].

35 Moléculas de ácidos nucleicos que se hibridarán con polinucleótidos de LTBP2 bajo condiciones rigurosas pueden identificarse funcionalmente. Sin limitación, ejemplos de los usos para sondas de hibridación incluyen: usos histoquímicos tales como identificar tejidos que expresan LTBP2; medición de niveles de ARNm, por ejemplo, para identificar un tipo de tejido de muestra o para identificar células que expresan niveles anormales de LTBP2; y detectar polimorfismos de LTBP2.

40 La PCR proporciona usos adicionales para oligonucleótidos basados en la secuencia de nucleótidos que codifica LTBP2. Tales sondas usadas en PCR pueden ser de origen recombinante, químicamente sintetizadas, o una mezcla de ambos. Los oligómeros pueden comprender secuencias de nucleótidos discretas empleadas bajo condiciones optimizadas para la identificación de LTBP2 en tejidos específicos o uso diagnóstico. Los dos mismos oligómeros, un conjunto anidado de oligómeros, o incluso una agrupación degenerada de oligómeros, pueden emplearse bajo condiciones menos rigurosas para identificación de ADN o ARN estrechamente relacionados.

Las reglas para diseñar cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) están ahora establecidas, como se ha revisado por protocolos de PCR. Pueden diseñarse cebadores degenerados, es decir, preparaciones de cebadores que son heterogéneas en localizaciones de secuencia dadas, para amplificar secuencias de ácidos nucleicos que son altamente homólogas a, pero no idénticas a, LTBP2. Ahora están disponibles estrategias que permiten que solo uno de los cebadores se requiera para hibridarse específicamente con una secuencia conocida. Por ejemplo, pueden ligarse cebadores de ácidos nucleicos apropiados al ácido nucleico que se busca amplificar para proporcionar el componente de hibridación para uno de los cebadores. De esta forma, solo uno de los cebadores necesita basarse en la secuencia del ácido nucleico que se busca amplificar.

Los procedimientos de PCR para amplificar ácido nucleico utilizarán al menos dos cebadores. Uno de estos cebadores podrá hibridarse con una primera hebra del ácido nucleico que va a amplificarse y cebar la síntesis de ácidos nucleicos accionada por enzimas en una primera dirección. La otra podrá hibridarse con la secuencia recíproca de la primera hebra (si la secuencia que va a amplificarse es monocatenaria, esta secuencia será inicialmente hipotética, pero se sintetizará en el primer ciclo de amplificación) y sondar la síntesis de ácidos nucleicos a partir de esa hebra en la dirección opuesta a la primera dirección y hacia el sitio de hibridación para el primer cebador. Las condiciones para realizar tales amplificaciones, particularmente bajo condiciones de hibridación rigurosas preferidas, son muy conocidas.

Otros medios de producción de sondas de hibridación específicas para LTBP2 incluyen la clonación de secuencias de ácidos nucleicos que codifican derivados de LTBP2 o LTBP2 en vectores para la producción de sondas de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* por medio de la adición de la ARN polimerasa apropiada como T7 o ARN polimerasa SP6 y las moléculas indicadoras apropiadas.

Es posible producir una secuencia de ADN, o porciones de la misma, completamente por química sintética. Después de la síntesis, la secuencia de ácidos nucleicos puede insertarse en cualquiera de los muchos vectores de ADN disponibles y sus células huésped respectivas usando técnicas que son muy conocidas en la técnica. Además, puede usarse química sintética para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos. Alternativamente, una parte de la secuencia en la que se desea una mutación puede sintetizarse y recombinarse con porción más larga de una secuencia genómica o recombinante existente.

Pueden usarse polinucleótidos de LTBP2 para producir un oligo- o polipéptido purificado usando procedimientos muy conocidos de tecnología de ADN recombinante. El oligopéptido puede expresarse en una variedad de células huésped, tanto procariontas como eucariotas. Las células huésped pueden ser de las mismas especies de las que se derivó la secuencia de nucleótidos o de una especie diferente. Ventajas de producción de un oligonucleótido por tecnología de ADN recombinante incluyen obtener cantidades adecuadas de la proteína para la purificación y la disponibilidad de procedimientos de purificación simplificados.

Determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos

Una etapa importante en el análisis genético molecular de enfermedad humana es frecuentemente la enumeración del número de copias de un ácido nucleico o la expresión relativa de un gen en tejidos particulares.

Varios enfoques diferentes están actualmente disponibles para hacer determinaciones cuantitativas de ácidos nucleicos. Las técnicas basadas en cromosomas, tales como hibridación genómica comparativa (CGH) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH), facilitan los esfuerzos para localizar citogenéticamente regiones que están alteradas en células tumorales. Las regiones de alteración genómica pueden estrecharse adicionalmente usando análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH), en el que el ADN de la enfermedad se analiza y se compara con ADN normal para la pérdida de un marcador polimórfico heterocigótico. Los primeros experimentos usaron polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción (RFLP) [Johnson, (1989)], o ADN mini-satélite hipervariable [Barnes, 2000]. En los últimos años se ha realizado LOH principalmente usando amplificación por PCR de marcadores de microsatélite y electroforesis de los productos de PCR marcados con radio [Jeffreys, (1985)] o marcados fluorescentemente [Weber, (1990)] y se comparado entre ADN normales y enfermos apareados.

También se han desarrollado varios otros procedimientos para cuantificar ácidos nucleicos [Gergen, (1992)]. Más recientemente, se han desarrollado procedimientos de PCR y RT-PCR que pueden medir la cantidad de un ácido nucleico en una muestra. Un enfoque, por ejemplo, mide la cantidad de producto de PCR en la fase logarítmica de la reacción antes de la formación de mesetas de productos de reacción [Thomas, (1980)].

Una secuencia de gen contenida en todas las muestras a cantidad relativamente constante se utiliza normalmente para la normalización de la eficiencia de amplificación de muestras. Este enfoque, sin embargo, sufre varios inconvenientes. El procedimiento requiere que cada muestra tenga cantidades de entrada iguales de ácido nucleico y que la eficiencia de amplificación entre muestras sea idéntica hasta el momento de análisis. Además, es difícil usar los procedimientos convencionales de cuantificación por PCR tales como electroforesis en gel o hibridación por captura en placa para determinar que todas las muestras sean de hecho analizadas durante la fase logarítmica de la reacción según se

requiera mediante el procedimiento.

Otro procedimiento llamado (QC)-PCR cuantitativa competitiva, como el nombre implica, se basa en la inclusión de un competidor de control interno en cada reacción [Piatak, (1993), BioTechniques]. La eficiencia de cada reacción se normaliza al competidor interno. Una cantidad conocida de competidor interno se añade normalmente a cada muestra. El producto de PCR diana desconocido se compara con el producto de PCR competidor conocido para obtener cuantificación relativa. Una dificultad con este enfoque general se basa en desarrollar un control interno que se amplifique con la misma eficiencia que la molécula diana.

Ensayos de 5' nucleasa fluorogénica

Los ensayos de nucleasa fluorogénica son un procedimiento de cuantificación en tiempo real que usa una sonda para monitorizar la formación de producto de amplificación. La base para este procedimiento de monitorización de la formación de producto de amplificación es medir continuamente la acumulación de producto de PCR usando una sonda de oligonucleótidos fluorogénica dualmente marcada, un enfoque frecuentemente denominado en la bibliografía simplemente el "procedimiento TaqMan" [Piatak,(1993), Science; Heid, (1996); Gibson, (1996); Holland. (1991)].

La sonda usada en tales ensayos es normalmente un oligonucleótido corto (aproximadamente 20-25 bases) que se marca con dos colorantes fluorescentes diferentes. El extremo 5' de la sonda está unido a un colorante indicador y el extremo 3' está unido a un colorante extintor, aunque los colorantes también podrían unirse en otras localizaciones sobre la sonda. La sonda se diseña para tener al menos complementariedad de secuencias sustancial con el sitio de unión a sonda. En la dirección 5' y en la dirección 3', los cebadores de PCR que se unen a regiones flanqueantes del sitio se añaden a la mezcla de reacción. Cuando la sonda está intacta se produce la transferencia de energía entre los dos fluoróforos y el extintor extingue la emisión del indicador. Durante la fase de extensión de PCR, la sonda se escinde por la actividad de 5' nucleasa de una polimerasa de ácido nucleico tal como Taq polimerasa, liberando así el indicador del extintor de oligonucleótido y produciendo un aumento de la intensidad de emisión del indicador que puede medirse por un detector apropiado.

Un detector que está específicamente adaptado para medir emisiones de fluorescencia tales como aquellas creadas durante un ensayo fluorogénico es ABI 7700 o 4700 HT fabricados por Applied Biosystems, Inc. en Foster City, Calif. ABI 7700 usa fibra óptica conectada con cada pocillo de una disposición de tubos de PCR de 96 ó 384 pocillos. El instrumento incluye un láser para excitar las marcas y puede medir la intensidad de espectros de fluorescencia de cada tubo con monitorización continua durante la amplificación por PCR. Cada tubo se vuelve a examinar cada 8,5 segundos.

El software informático provisto del instrumento puede registrar la intensidad de fluorescencia del indicador y extintor durante el transcurso de la amplificación. Los valores grabados se usarán entonces para calcular continuamente el aumento en la emisión de indicador normalizada. El aumento en la intensidad de emisión se representa frente al tiempo, es decir, el número de ciclos de amplificación, para producir una medida continua de la amplificación. Para cuantificar el sitio en cada reacción de amplificación, la representación de la amplificación se examina en un punto durante la fase logarítmica de acumulación de producto. Esto se lleva a cabo asignando una intensidad umbral de fluorescencia por encima de la referencia y determinando el punto en el que cada representación de amplificación cruza el umbral (definido como el número de ciclos umbral o Ct). Las diferencias en el número de ciclos umbral se usan para cuantificar la cantidad relativa de diana de PCR contenida dentro de cada tubo. Asumiendo que cada reacción funciona al 100% de eficiencia de PCR, una diferencia de una Ct representa una diferencia doble en la cantidad de molde de partida. El valor de fluorescencia puede usarse conjuntamente con una curva patrón para determinar la cantidad de producto de amplificación presente.

Procedimientos de detección basados en no sonda

Están disponibles una variedad de opciones para medir los productos de amplificación a medida que se forman. Un procedimiento utiliza marcas tales como colorantes, que solo se unen a ADN bicatenario. En este tipo de enfoque, el producto de amplificación (que es bicatenario) se une a moléculas de colorante en disolución para formar un complejo. Con los colorantes apropiados es posible distinguir entre moléculas de colorante libres en disolución y moléculas de colorante unidas a producto de amplificación. Por ejemplo, ciertos colorantes fluorescen solo cuando se unen a producto de amplificación. Ejemplos de colorantes que pueden usarse en procedimientos de este tipo general incluyen, pero no se limitan a, Syber Green.TM. y Pico Green de Molecular Probes, Inc. de Eugene, Oreg., bromuro de etidio, yoduro de propidio, cromomicina, naranja de acridina, Hoechst 33258, Toto-1, Yoyo-1, DAPI (clorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol).

Otra técnica de detección en tiempo real mide la alteración en la transferencia de energía de fluorescencia entre fluoróforos conjugados con cebadores de PCR [Livak, (1995)].

Procedimientos de detección basados en sondas

Estos procedimientos de detección implican alguna alteración a la estructura o conformación de una sonda hibridada con el sitio entre el par de cebadores de amplificación. En algunos casos, la alteración es producida por la extensión dependiente de molde catalizada por una polimerasa de ácido nucleico durante el procedimiento de amplificación. La alteración genera una señal detectable que es una medida indirecta de la cantidad de producto de amplificación formado.

5 Por ejemplo, algunos procedimientos implican la degradación o digestión de la sonda durante la reacción de extensión. Estos procedimientos son una consecuencia de la actividad de 5'-3' nucleasa asociada a algunas polimerasas de ácido nucleico. Las polimerasas que tienen esta actividad escinden mononucleótidos o pequeños oligonucleótidos de una sonda de oligonucleótidos hibridada con su secuencia complementaria localizada dentro del sitio.

10 El extremo 3' del cebador en la dirección 5' proporciona el sitio de unión inicial para la polimerasa de ácido nucleico. Como la polimerasa cataliza la extensión del cebador en la dirección 5' y se encuentra con la sonda unida, la polimerasa de ácido nucleico desplaza una parte del extremo 5' de la sonda y mediante su actividad de nucleasa escinde mononucleótidos u oligonucleótidos de la sonda.

15 El cebador en la dirección 5' y la sonda pueden diseñarse de forma que se hibriden con la hebra complementaria en estrecha proximidad entre sí. En realidad, el extremo 3' del cebador en la dirección 5' y el extremo 5' de la sonda pueden sucederse el uno al otro. En esta situación, la extensión del cebador en la dirección 5' no es necesaria para que la polimerasa de ácido nucleico empiece a escindir la sonda. En el caso de que nucleótidos intervinientes separen el cebador en la dirección 5' y la sonda, la extensión del cebador es necesaria antes de que la polimerasa de ácido nucleico se encuentre con el extremo 5' de la sonda. Una vez se produce el contacto y continúa la polimerización, la actividad de 5'-3' exonucleasa de la polimerasa de ácido nucleico empieza a escindir mononucleótidos o oligonucleótidos a partir del extremo 5' de la sonda. La digestión de la sonda continúa hasta que la porción restante de la sonda se disocia de la hebra complementaria.

20 En disolución, las dos secciones terminales pueden hibridarse entre sí para formar un bucle de horquilla. En esta conformación, el colorante indicador y extintor están en proximidad suficientemente próxima de forma que la fluorescencia del colorante indicador sea eficazmente extinguida por el colorante extintor. La sonda hibridada, a diferencia, produce una conformación linealizada en la que el grado de extinción disminuye. Así, monitorizando los cambios de emisión para los dos colorantes es posible monitorizar indirectamente la formación de producto de amplificación.

Sondas

30 La sonda marcada está seleccionada de manera que su secuencia sea sustancialmente complementaria a un segmento del sitio de prueba o un sitio de referencia. Como se indica anteriormente, el sitio de ácido nucleico al que la sonda se une debe localizarse entre los sitios de unión de la sonda para los cebadores de amplificación en la dirección 5' y en la dirección 3'.

Cebadores

35 Los cebadores usados en la amplificación están seleccionados de manera que puedan hibridarse con secuencias en regiones flanqueantes del sitio que se amplifica. Los cebadores se eligen para tener al menos complementariedad sustancial con las diferentes hebras del ácido nucleico que se amplifica. Cuando una sonda se utiliza para detectar la formación de productos de amplificación, los cebadores se seleccionan de forma que flanqueen la sonda, es decir, se localicen en la dirección 5' y en la dirección 3' de la sonda.

40 El cebador debe tener longitud suficiente de manera que pueda cebar la síntesis de productos de extensión en presencia de un agente para la polimerización. La longitud y composición del cebador dependen de muchos parámetros que incluyen, por ejemplo, la temperatura a la que se realiza la reacción de hibridación, proximidad del sitio de unión a sonda a la del cebador, concentraciones relativas de cebador y sonda, y la composición de ácido nucleico particular de la sonda. Normalmente, el cebador incluye 15-30 nucleótidos. Sin embargo, la longitud del cebador puede ser más o menos dependiendo de la complejidad del sitio de unión del cebador y los factores enumerados anteriormente.

Marcas para sondas y cebadores

50 Las marcas usadas para marcar las sondas o cebadores de la presente invención y que pueden proporcionar la señal correspondiente a la cantidad de producto de amplificación pueden tomar una variedad de formas. Como se indica anteriormente con respecto al procedimiento de 5' nucleasa fluorogénica, una señal fluorescente es una señal que puede medirse. Sin embargo, también pueden hacerse mediciones, por ejemplo, monitorizando radiactividad, colorimetría, absorción, parámetros magnéticos o actividad enzimática. Así, marcas que pueden emplearse incluyen, pero no se limitan a, fluoróforos, cromóforos, isótopos radiactivos, reactivos densos en electrones, enzimas y ligandos que tienen componentes de unión específica (por ejemplo, biotina-avidina).

La monitorización de cambios en la fluorescencia es una forma particularmente útil para monitorizar la acumulación de productos de amplificación. Están comercialmente disponibles varias marcas útiles para unión a sondas o cebadores que incluyen fluoresceína y diversos derivados de fluoresceína tales como FAM, HEX, TET y JOE (todos están disponibles de Applied Biosystems, Foster City, Calif.); amarillo Lucifer y derivados de cumarina.

5 Las marcas pueden unirse a la sonda o cebador usando una variedad de técnicas y pueden unirse en el extremo 5', y/o el extremo 3' y/o en un nucleótido interno. La marca también puede unirse a brazos separadores de diversos tamaños que están unidos a la sonda o cebador. Estos brazos separadores son útiles para obtener una distancia deseada entre múltiples marcas unidas a la sonda o cebador.

10 En algunos casos puede utilizarse una única marca; mientras que, en otros casos, tales como con los ensayos de 5' nucleasa fluorogénica, por ejemplo, dos o más marcas se unen a la sonda. En casos en los que la sonda incluye múltiples marcas, es generalmente aconsejable mantener separación entre las marcas que sea suficiente para permitir la separación de las marcas durante la digestión de la sonda mediante la actividad de 5'-3' nucleasa de la polimerasa de ácido nucleico.

Micromatriz

15 Las matrices de ácidos nucleicos que se han usado en la presente invención son aquellas que están comercialmente disponibles de Affymetrix (Santa Clara, Calif.) bajo el nombre de marca GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array® o Rat Genome U230 Plus 2.0 Array, respectivamente, que representa la cobertura completa de los conjuntos de sondas Human Genome U133 Set Plus 9921 que representan aproximadamente 6.500 nuevos genes (con un total de aproximadamente 56.000 transcritos) o el genoma de rata, respectivamente. La plataforma de tecnología de Affymetrix
20 (Santa Clara, Calif.) consiste en micromatrices de alta densidad y herramientas GeneChip para ayudar a procesar y analizar aquellas matrices, que incluyen ensayos y reactivos normalizados, instrumentación y gestión de datos y herramientas de análisis.

25 Las micromatrices GeneChip consisten en pequeños fragmentos de ADN (denominados sondas) químicamente sintetizados en localizaciones específicas sobre una superficie de cuarzo recubierta. Extrayendo y marcando ácidos nucleicos de muestras experimentales, y luego hibridando aquellas muestras preparadas con la matriz, la cantidad de marca puede monitorizarse permitiendo una medida de la regulación génica.

Las matrices de genoma humano GeneChip incluyen un conjunto de genes de mantenimiento humanos para facilitar la normalización y el escalado de experimentos en matriz y para realizar comparación de datos. Este conjunto de genes de normalización muestra niveles de expresión coherentes con respecto a un diverso conjunto de tejidos.

30 **Pacientes que presentan síntomas de enfermedad**

Varias enfermedades están asociadas a cambios en el número de copias de un cierto gen. Para pacientes que tienen síntomas de una enfermedad, el procedimiento de PCR en tiempo real puede usarse para determinar si el paciente tiene alteraciones en el número de copias que se sabe que están ligadas a enfermedades que están asociadas a los síntomas que tiene el paciente.

35 **Expresión de LTBP2**

Proteínas de fusión de LTBP2

40 Las proteínas de fusión son útiles para generar anticuerpos contra polipéptidos de LTBP2 y para su uso en diversos sistemas de ensayo. Por ejemplo, pueden usarse proteínas de fusión para identificar proteínas que interactúan con porciones de polipéptidos de LTBP2. Para este fin puede usarse cromatografía de afinidad de proteína o ensayos basados en bibliotecas para interacciones proteína-proteína, tales como los sistemas de expresión de dos híbridos en levadura o en fago. Tales procedimientos son muy conocidos en la técnica y también pueden usarse como cribados de fármacos.

45 Una proteína de fusión de LTBP2 comprende dos segmentos de polipéptido fusionados juntos por medio de un enlace peptídico. El primer segmento de polipéptido puede comprender al menos 54, 75, 100, 125, 139, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325 ó 350 aminoácidos contiguos de SEC ID N^o: 3 ó 4 o de una variante, tales como aquellos descritos anteriormente. El primer segmento de polipéptido también puede comprender LTBP2 de longitud completa.

50 El segundo segmento de polipéptido puede ser una proteína de longitud completa o un fragmento de proteína. Proteínas comúnmente usadas en la construcción de proteínas de fusión incluyen, pero no se limitan a, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteínas autofluorescentes, que incluyen proteína azul fluorescente (BFP), glutatión-S-transferasa (GST), luciferasa, peroxidasa de rábano picante (HRP) y cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Adicionalmente se usan marcas de epítopes en construcciones de proteínas de fusión, que incluyen marcas de histidina (His), marcas FLAG, marcas de hemaglutinina de la gripe (HA), marcas Myc, marcas VSV-

G y marcas de tiorredoxina (Trx). Otras construcciones de fusión pueden incluir proteína de unión a maltosa (MBP), S-tag, fusiones de Lex A-dominio de unión de ADN (DBD), fusiones de GAL4-dominio de unión de ADN y fusiones del virus del herpes simple (HSV)-proteína BP16. Una proteína de fusión también puede manipularse para contener un sitio de escisión localizado adyacente a LTBP2.

5 *Preparación de polinucleótidos*

Un polinucleótido de LTBP2 que se produce naturalmente puede aislarse libre de otros componentes celulares tales como componentes de membrana, proteínas y lípidos. Pueden prepararse polinucleótidos por una célula y aislarse usando técnicas de purificación de ácidos nucleicos convencionales o sintetizarse usando una técnica de amplificación, tal como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o usando un sintetizador automático. Los procedimientos para aislar polinucleótidos son rutinarios y se conocen en la técnica. Cualquier técnica tal para obtener un polinucleótido puede usarse para obtener polinucleótidos de LTBP2 aislados. Por ejemplo, pueden usarse enzimas de restricción y sondas para aislar fragmentos de polinucleótidos que comprenden secuencias de nucleótidos de LTBP2. Los polinucleótidos aislados están en preparaciones que están libres o al menos el 70, 80 o el 90% libres de otras moléculas.

15 Pueden prepararse moléculas de ADNc de LTBP2 con técnicas de biología molecular convencionales usando ARNm de LTBP2 como molde. Las moléculas de ADNc de LTBP2 pueden después replicarse usando técnicas de biología molecular conocidas en la técnica. Una técnica de amplificación, tal como PCR, puede usarse para obtener copias de polinucleótidos adicionales de la invención, usando tanto ADN genómico humano como ADNc como molde.

20 Alternativamente, pueden usarse técnicas de química sintética para sintetizar polinucleótidos de LTBP2. La degeneración del código genético permite sintetizar secuencias de nucleótidos alternativas que codificarán LTBP2 que tienen, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 2 o una variante biológicamente activa de la misma.

Extensión de polinucleótidos

25 Pueden usarse diversos procedimientos basados en PCR para extender secuencias de ácidos nucleicos que codifican LTBP2 humana, por ejemplo, para detectar secuencias en la dirección 5' del gen LTBP2 tales como promotores y elementos reguladores. Por ejemplo, la PCR de sitio de restricción usa cebadores universales para recuperar secuencia desconocida adyacente a un sitio conocido. El ADN genómico se amplifica primero en presencia de un cebador con una secuencia de ligador y un cebador específico para la región conocida. Las secuencias amplificadas se someten entonces a una segunda ronda de PCR con el mismo cebador ligador y otro cebador específico interno al primero. Los productos de cada ronda de PCR se transcriben con una ARN polimerasa apropiada y se secuencian usando transcriptasa inversa.

30 También puede usarse PCR inversa para amplificar o extender secuencias usando cebadores divergentes basados en una región conocida. Los cebadores pueden diseñarse usando software comercialmente disponible, tal como el software de análisis de cebadores OLIGO 4.06 (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), para que tengan 22-30 nucleótidos de longitud, para tener un contenido de GC del 50% o más, y para hibridarse con la secuencia diana a temperaturas de aproximadamente 68-72 °C. El procedimiento usa varias enzimas de restricción para generar un fragmento adecuado en la región conocida de un gen. El fragmento se circulariza entonces por ligación intramolecular y se usa como molde de PCR.

40 Otro procedimiento que puede usarse es PCR de captura, que implica amplificación por PCR de fragmentos de ADN adyacentes a una secuencia conocida en ADN cromosómico artificial humano y de levadura. En este procedimiento también pueden usarse múltiples digestiones con enzima de restricción y ligaciones para poner una secuencia bicatenaria manipulada en un fragmento desconocido de la molécula de ADN antes de realizar la PCR.

45 Cuando se criba ADNc de longitud completa es preferible usar bibliotecas que han sido seleccionadas por tamaño para incluir ADNc mayores. Se prefieren bibliotecas cebadas al azar, porque contendrán más secuencias que contienen las regiones 5' de genes. El uso de una biblioteca cebada al azar puede ser especialmente preferible para situaciones en las que una biblioteca de oligo d(T) no da un ADNc de longitud completa. Pueden ser útiles bibliotecas genómicas para extensión de secuencia en regiones reguladoras no transcritas de 5'.

50 Pueden usarse sistemas de electroforesis capilar comercialmente disponibles para analizar el tamaño o confirmar la secuencia de nucleótidos de PCR o productos de secuenciación. Por ejemplo, la secuenciación capilar puede emplear polímeros fluidos para separación electroforética, cuatro colorantes fluorescentes diferentes (uno para cada nucleótido) que son activados por láser, y detección de las longitudes de onda emitidas por una cámara de dispositivo de carga acoplada. La intensidad de salida/luz puede convertirse en señal eléctrica usando equipo y software apropiado (por ejemplo, GENOTYPER y Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), y el procedimiento entero de cargar muestras para el análisis informático y la visualización de datos electrónicos pueden ser controlados por ordenador. La electroforesis capilar es especialmente preferible para la secuenciación de trozos pequeños de ADN que podrían estar presentes en

55

cantidades limitadas en una muestra particular.

Obtención de polipéptidos

LTBP2 puede obtenerse, por ejemplo, por purificación de células humanas, por expresión de polinucleótidos de LTBP2, o por síntesis química directa.

5 *Purificación de proteínas*

LTBP2 puede purificarse a partir de cualquier célula humana que expresa la enzima, que incluye aquellas que se han transfectado con construcciones de expresión que expresan LTBP2. Una LTBP2 purificada se separa de otros compuestos que normalmente se asocian con LTBP2 en la célula, tales como ciertas proteínas, hidratos de carbono o lípidos, usando procedimientos muy conocidos en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero no se limitan a, 10 cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad y electroforesis preparativa en gel.

Expresión de polinucleótidos de LTBP2

Para expresar LTBP2, los polinucleótidos de LTBP2 pueden insertarse en un vector de expresión que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Pueden usarse 15 procedimientos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican LTBP2 y elementos de control de la transcripción y traducción apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*.

Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión/huésped para contener y expresar secuencias que codifican LTBP2. Éstos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con 20 vectores de expresión de ADN de bacteriófago, plásmido o cósmido recombinante; levadura transformada con vectores de expresión en levadura, sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión en virus (por ejemplo, baculovirus), sistemas de célula de planta transformados con vectores de expresión en virus (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o con vectores de expresión bacterianos (por ejemplo, plásmidos Ti o pBR322), o sistemas de células animales.

Los elementos de control o secuencias reguladoras son aquellas regiones del vector no traducidas - potenciadores, 25 promotores, regiones sin traducir de 5' y 3' - que interactúan con proteínas celulares huésped para llevar a cabo la transcripción y traducción. Tales elementos pueden variar en su intensidad y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y huésped utilizado puede usarse cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, que incluye promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos pueden usarse promotores inducibles tales como el promotor lacZ híbrido del fagémido BLUESCRIPT (Stratagene, LaJolla, Calif.) o el plásmido pSPORT1 (Life Technologies) y similares. El promotor de la poliedrina del baculovirus puede usarse en células de insecto. Promotores o potenciadores derivados de los genomas de células vegetales (por 30 ejemplo, choque térmico, RUBISCO, y genes de proteína de almacenamiento) o de virus de plantas (por ejemplo, promotores virales o secuencias conductoras) pueden clonarse en el vector. En sistemas de células de mamífero se prefieren promotores de genes de mamífero o de virus de mamífero. Si es necesario generar una línea celular que contiene múltiples copias de una secuencia de nucleótidos que codifica LTBP2, vectores basados en SV40 o EBV pueden usarse con un marcador de selección apropiado.

Sistemas de expresión en bacterias y levadura

En sistemas bacterianos pueden seleccionarse varios vectores de expresión. Por ejemplo, cuando se necesita una 40 gran cantidad de LTBP2 para la inducción de anticuerpos, pueden usarse vectores que dirigen la expresión de alto nivel de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan a, clonación de *E. coli* multifuncional y vectores de expresión tales como BLUESCRIPT (Stratagene). En un vector BLUESCRIPT, una secuencia que codifica LTBP2 puede ligarse en el vector en marco con secuencias para la Met del extremo amino y los 7 residuos posteriores de β -galactosidasa de manera que se produzca una proteína híbrida. Los vectores pIN o los 45 vectores pGEX (Promega, Madison, Wis.) también pueden usarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de células lisadas por adsorción a perlas de glutatión-agarosa, seguido de elución en presencia de glutatión libre. Proteínas hechas en tales sistemas pueden diseñarse para incluir heparina, trombina o sitios de escisión de proteasa del factor Xa de manera que el polipéptido clonado de interés pueda liberarse del resto GST a voluntad.

50 *Sistemas de expresión en plantas e insectos*

Si se usan vectores de expresión en plantas, la expresión de secuencias que codifican LTBP2 puede accionarse por distintos promotores. Por ejemplo, promotores virales tales como los promotores 35S y 19S del CaMV pueden usarse solos o en combinación con la secuencia conductora omega de TMV. Alternativamente pueden usarse promotores de

plantas tales como la subunidad pequeña de RUBISCO o promotores de choque térmico. Estas construcciones pueden introducirse en células vegetales por transformación de ADN directa o por transfección mediada por patógenos.

5 También puede usarse un sistema de insecto para expresar LTBP2. Por ejemplo, en un sistema *Autographa californica* tal, el virus de la poliedrosis nuclear (AcNPV) se usa como vector para expresar genes extraños en células de *Spodoptera frugiperda* o en larvas de *Trichoplusia*. Pueden clonarse secuencias que codifican LTBP2 en una región no esencial del virus, tal como el gen de poliedrina, y ponerse bajo el control del promotor de la poliedrina. La inserción satisfactoria de LTBP2 convertirá el gen de la poliedrina en inactivo y producirá virus recombinante que carece de proteína de la envuelta. Los virus recombinantes pueden entonces usarse para infectar células de *S. frugiperda* o larvas de *Trichoplusia* en las que puede expresarse LTBP2.

10 *Sistemas de expresión en mamíferos*

Pueden usarse varios sistemas de expresión basados en virus para expresar LTBP2 en células huésped de mamífero. Por ejemplo, si se usa un adenovirus como vector de expresión, las secuencias que codifican LTBP2 pueden ligarse en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que comprende el promotor tardío y la secuencia conductora tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede usarse para obtener un virus viable que puede expresar LTBP2 en células huésped infectadas [Engelhard, (1994)]. Si se desea, potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (RSV), pueden usarse para aumentar la expresión en células huésped de mamífero.

20 También pueden usarse cromosomas artificiales humanos (HAC) para administrar fragmentos de ADN más grandes que pueden contenerse y expresarse en un plásmido. Los HAC de 6M a 10M se construyen y se administran a células mediante procedimientos de administración convencionales (por ejemplo, liposomas, polímeros de amino policatiónicos, o vesículas). También pueden usarse señales de iniciación específicas para lograr traducción más eficiente de secuencias que codifican LTBP2. Tales señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En casos en los que las secuencias que codifican LTBP2, su codón de iniciación y secuencias en la dirección 5' se inserten en el vector de expresión apropiado, puede no necesitarse señales de control de la transcripción o traducción adicionales. Sin embargo, en casos en los que solo se inserta secuencia codificante, o un fragmento de la misma, deben proporcionarse señales de control de la traducción exógenas (que incluyen el codón de iniciación ATG). El codón de iniciación debe estar en el marco de lectura correcto para garantizar la traducción del inserto entero. Elementos de traducción y codones de iniciación exógenos pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos.

30 *Células huésped*

Una cepa de célula huésped puede elegirse para su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar LTBP2 expresada en el modo deseado. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glucosilación, fosforilación, lipidación y acilación. También puede usarse procesamiento postraduccional que escinde una forma "prepro" del polipéptido para facilitar la correcta inserción, plegamiento y/o función. Células huésped diferentes que tienen maquinaria celular específica y mecanismos característicos para actividades postraduccionales (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y WI38) están disponibles de la Colección americana de cultivos tipo (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) y pueden elegirse para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña.

40 Se prefiere expresión estable para producción de alto rendimiento a largo plazo de proteínas recombinantes. Por ejemplo, líneas celulares que expresan establemente LTBP2 pueden transformarse usando vectores de expresión que pueden contener orígenes de replicación virales y/o elementos de expresión endógenos y un gen del marcador de selección en el mismo o en un vector separado. Tras la introducción del vector, puede permitirse que las células se cultiven durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse a un medio selectivo. El fin del marcador de selección es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias de LTBP2 introducidas. Clones resistentes de células establemente transformadas pueden proliferar usando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula. Cualquier número de sistemas de selección puede usarse para recuperar líneas celulares transformadas. Éstos incluyen, pero no se limitan a, los genes timidina cinasa del virus del herpes simple [Logan, (1984)] y adenina fosforibosiltransferasa [Wigler, (1977)] que pueden emplearse en células *tk* o *aprt*, respectivamente. Por tanto, puede usarse resistencia antimetabolito, a antibióticos o herbicidas como base para la selección. Por ejemplo, *dhfr* confiere resistencia a metotrexato [Lowy, (1980)], *npt* confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418 [Wigler, (1980)], y *als* y *pat* confieren resistencia a clorsulfurona y fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente [Colbere-Garapin, 1981]. Se han descrito genes de selección adicionales. Por ejemplo, *trpB* permite que las células utilicen indol en lugar de triptófano, o *hisD* permite que las células utilicen histinol en lugar de histidina. Pueden usarse marcadores visibles tales como antocianinas, β -glucuronidasa y su sustrato GUS, y luciferasa y su sustrato luciferina, para identificar transformantes y para cuantificar la cantidad de expresión transitoria o estable de proteínas atribuibles a un sistema de vector específico.

Detección de la expresión de polipéptidos

Aunque la presencia de expresión de genes marcadores sugiere que un polinucleótido de LTBP2 también está presente, puede necesitar confirmarse su presencia y expresión. Por ejemplo, si una secuencia que codifica LTBP2 se inserta dentro de una secuencia de gen marcador, células transformadas que contienen secuencias que codifican LTBP2 pueden identificarse por la ausencia de función de genes marcadores. Alternativamente, un gen marcador puede colocarse en tándem con una secuencia que codifica LTBP2 bajo el control de un único promotor. La expresión del gen marcador en respuesta a inducción o selección normalmente indica expresión de polinucleótido de LTBP2.

Alternativamente, células huésped que contienen un polinucleótido de LTBP2 y que expresan LTBP2 pueden identificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hibridaciones de ADN-ADN o ADN-ARN y técnicas de bioensayo o inmunoensayo de proteínas que incluyen tecnologías basadas en membrana, disolución o chip para la detección y/o cuantificación de ácido nucleico o proteína. Por ejemplo, la presencia de una secuencia de polinucleótidos que codifica LTBP2 puede detectarse por hibridación de ADN-ADN o ADN-ARN o amplificación usando sondas o fragmentos o fragmentos de polinucleótidos que codifican LTBP2. Los ensayos basados en la amplificación de ácidos nucleicos implican el uso de oligonucleótidos seleccionados de secuencias que codifican LTBP2 para detectar transformantes que contienen un polinucleótido de LTBP2.

Se conocen en la técnica una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de LTBP2, usando tanto anticuerpos policlonales como monoclonales específicos para el polipéptido. Ejemplos incluyen enzimoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Puede usarse un inmunoensayo basado en monoclonal de dos sitios usando anticuerpos monoclonales reactivos con dos epítopes no interferentes en LTBP2, o puede emplearse un ensayo de unión competitiva.

Se conoce una amplia variedad de marcas y técnicas de conjugación por aquellos expertos en la materia y puede usarse en diversos ensayos de ácidos nucleicos y aminoácidos. Medios para producir hibridación marcada o sondas de PCR para detectar secuencias relacionados con polinucleótidos que codifican LTBP2 incluyen oligomarcado, traducción de mellas, marcado de los extremos o amplificación por PCR usando un nucleótido marcado. Alternativamente pueden clonarse secuencias que codifican LTBP2 en un vector para la producción de una sonda de ARNm. Tales vectores se conocen en la técnica, están comercialmente disponibles y pueden usarse para sintetizar sondas de ARN *in vitro* mediante adición de nucleótidos marcados y una ARN polimerasa apropiada tal como T7, T3 o SP6. Estos procedimientos pueden realizarse usando una variedad de kits comercialmente disponibles (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, y US Biochemical). Moléculas indicadoras o marcas adecuadas que pueden usarse para facilitar la detección incluyen radionúclidos, enzimas y agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos, además de sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares.

Expresión y purificación de polipéptidos

Células huésped transformadas con polinucleótidos de LTBP2 pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína del cultivo celular. El polipéptido producido por una célula transformada puede secretarse o estar contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Como se entenderá por aquellos expertos en la materia, vectores de expresión que contienen polinucleótidos de LTBP2 pueden diseñarse para contener secuencias señal que dirigen la secreción de LTBP2 soluble mediante una membrana de células procariontas o eucariotas o que dirige la inserción de membrana de LTBP2 unida a membrana.

Como se trata anteriormente, otras construcciones pueden usarse para unir una secuencia que codifica LTBP2 a una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio de polipéptido que facilitará la purificación de proteínas solubles. Tal purificación que facilita dominios incluye, pero no se limita a, péptidos quelantes metálicos tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, Wash.). La inclusión de secuencias de ligador escindibles tales como aquellas específicas para factor XA o enterocinasa (Invitrogen, San Diego, CA) entre el dominio de purificación y LTBP2 también puede usarse para facilitar la purificación. Un vector de expresión tal proporciona la expresión de una proteína de fusión que contiene LTBP2 y 6 residuos de histidina que preceden a una tiorredoxina o un sitio de escisión de enterocinasa. Los residuos de histidina facilitan la purificación por IMAC (cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados) Maddox, (1983)], mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar LTBP2 de la proteína de fusión [Porath, (1992)].

Síntesis química

Pueden sintetizarse secuencias que codifican LTBP2, por completo o en parte, usando procedimientos químicos muy conocidos en la técnica. Alternativamente, la propia LTBP2 puede producirse usando procedimientos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tales como por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida. La

síntesis de proteínas puede tanto realizarse usando técnicas manuales como por automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems 431A (Perkin Elmer). Opcionalmente, fragmentos de LTBP2 pueden sintetizarse por separado y combinarse usando procedimientos químicos para producir una molécula de longitud completa.

- 5 El péptido recientemente sintetizado puede purificarse sustancialmente por cromatografía líquida preparativa de alta resolución. La composición de una LTBP2 sintética puede confirmarse por análisis o secuenciación de aminoácidos. Adicionalmente, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos de LTBP2 puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinada usando procedimientos químicos con secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido de variante o una proteína de fusión.

10 *Producción de polipéptidos alterados*

Como se entenderá por aquellos expertos en la materia, puede ser ventajoso producir polinucleótidos de LTBP2 que poseen codones que no se producen naturalmente. Por ejemplo, pueden seleccionarse codones preferidos por un huésped procarionta o eucariota particular para aumentar la tasa de expresión de proteínas o para producir un transcrito de ARN que tiene propiedades deseables, tales como una semivida que es mayor que la de un transcrito generado a partir de la secuencia que se produce naturalmente.

- 15 Las secuencias de nucleótidos citadas en el presente documento pueden manipularse usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica para alterar polinucleótidos de LTBP2 para una variedad de motivos, que incluyen, pero no se limitan a, alteraciones que modifican la clonación, procesamiento y/o expresión del polipéptido o producto de ARNm. El barajado de ADN por fragmentación al azar y el reensamblaje por PCR de fragmentos de genes y oligonucleótidos sintéticos pueden usarse para manipular las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, puede usarse mutagénesis dirigida al sitio para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glucosilación, cambiar la preferencia de codones, producir variantes de corte y empalme, introducir mutaciones, etc.

20 *Análogos de LTBP2*

- 25 Una clase general de análogos de LTBP2 son variantes que tienen una secuencia de aminoácidos que es una mutación de la secuencia de aminoácidos desvelada en el presente documento. Otra clase general de análogos de LTBP2 se proporciona por anticuerpos antiidiotípicos, y fragmentos de los mismos, como se describe más adelante. Además, pueden usarse anticuerpos recombinantes que comprenden dominios variables antiidiotípicos como análogos (véase, por ejemplo, [Monfardini y col., (1996)]). Como los dominios variables de anticuerpos para LTBP2 antiidiotípicos imitan a LTBP2, estos dominios pueden proporcionar actividad enzimática de LTBP2. Los procedimientos de producción de anticuerpos catalíticos antiidiotípicos son conocidos para aquellos expertos en la materia [Joron y col., (1992), Friboulet y col. (1994), Avelle y col., (1998)].

- 30 Otro enfoque para identificar análogos de LTBP2 se proporciona por el uso de bibliotecas combinatorias. Los procedimientos para construir y cribar la expresión en fago y otras bibliotecas combinatorias se proporcionan, por ejemplo, por [Kay y col., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press 1996), documentos U.S. 5.783.384, U.S. 5.747.334 y U.S. 5.723.323].

35 *Anticuerpos*

Cualquier tipo de anticuerpo conocido en la técnica puede generarse para unirse específicamente a un epítipo de LTBP2.

- 40 "Anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye moléculas de inmunoglobulina intactas, además de fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂ y Fv, que pueden unir un epítipo de LTBP2. Normalmente se requieren al menos 6, 8, 10 ó 12 aminoácidos contiguos para formar un epítipo. Sin embargo, epítopes que implican aminoácidos no contiguos pueden requerir más, por ejemplo, al menos 15, 25 ó 50 aminoácidos. Un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo de LTBP2 puede usarse terapéuticamente, además de en ensayos inmunoquímicos, tales como transferencias Western, ELISA, radioinmunoensayos, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoprecipitaciones u otros ensayos inmunoquímicos conocidos en la técnica. Pueden usarse diversos inmunoensayos para identificar anticuerpos que tienen la especificidad deseada. Numerosos protocolos para unión competitiva o ensayos inmunoradiométricos son muy conocidos en la técnica. Tales inmunoensayos normalmente implican la medición de la formación de complejos entre un inmunógeno y un anticuerpo que se une específicamente al inmunógeno de LTBP2.

- 45 Normalmente, un anticuerpo que se une específicamente a LTBP2 proporciona una señal de detección al menos 5, 10 ó 20 veces superior a una señal de detección proporcionada con otras proteínas cuando se usa en un ensayo inmunoquímico. Preferentemente, los anticuerpos que se unen específicamente a LTBP2 no detectan otras proteínas en ensayos inmunoquímicos y pueden inmunoprecipitar LTBP2 en disolución.

LTBP2 puede usarse para inmunizar un mamífero, tal como un ratón, rata, conejo, cobaya, mono o ser humano, para producir anticuerpos policlonales. Si se desea, LTBP2 puede conjugarse con una proteína portadora, tal como albúmina de suero bovino, tiroglobulina y hemocianina de lapa californiana. Dependiendo de las especies de huésped pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvante de Freund, geles minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio) y sustancias tensioactivas (por ejemplo, lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol). Entre los adyuvantes usados en seres humanos, BCG (bacilos de *Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum* son especialmente útiles.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a LTBP2 usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo por líneas celulares continuas en cultivo. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridomas, la técnica de hibridomas de linfocitos B humanos y la técnica de hibridomas de EBV [Roberge, (1995)].

Además, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos", el corte y empalme de genes de anticuerpo de ratón para genes de anticuerpo humano para obtener una molécula con especificidad por antígeno y actividad biológica apropiadas. Los anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos también pueden "humanizarse" para prevenir que un paciente organice una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo cuando se usa terapéuticamente. Tales anticuerpos pueden ser suficientemente similares en secuencia a anticuerpos humanos que van a usarse directamente en terapia o pueden requerir alteración de algunos residuos clave. Las diferencias de secuencias entre anticuerpos de roedor y secuencias humanas pueden minimizarse reemplazando residuos que se diferencian de aquellos en las secuencias humanas por mutagénesis dirigida al sitio de residuos individuales o injertando regiones determinantes de la complementariedad enteras. Anticuerpos que se unen específicamente a LTBP2 pueden contener sitios de unión a antígeno que son tanto parcialmente como completamente humanizados, como se desvela en el documento U.S. 5.565.332.

Alternativamente, técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios pueden adaptarse usando procedimientos conocidos en la técnica para producir anticuerpos monocatenarios que se unen específicamente a LTBP2. Anticuerpos con especificidad relacionada, pero de distinta composición idiotípica, pueden generarse por barajado de cadenas de bibliotecas de inmunoglobulina combinatorias al azar. También pueden construirse anticuerpos monocatenarios usando un procedimiento de amplificación de ADN, tal como PCR, usando ADNc de hibridomas como molde. Los anticuerpos monocatenarios pueden ser mono- o biespecíficos, y pueden ser bivalentes o tetravalentes. Se enseña la construcción de anticuerpos monocatenarios biespecíficos tetravalentes. Una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo monocatenario puede construirse usando síntesis de nucleótidos manual o automatizada, clonarse en una construcción de expresión usando procedimientos de ADN recombinante convencionales e introducirse en una célula para expresar la secuencia codificante, como se describe más adelante. Alternativamente pueden producirse anticuerpos monocatenarios usando directamente, por ejemplo, tecnología de fagos filamentosos.

Los anticuerpos que se unen específicamente a LTBP2 también pueden producirse induciendo producción *in vivo* en la población de linfocitos o cribando bibliotecas de inmunoglobulina o paneles de reactivos de unión altamente específicos. Otros tipos de anticuerpos pueden construirse y usarse terapéuticamente en procedimientos de la invención. Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos quiméricos como se ha desvelado en el documento WO 93/03151. También pueden prepararse proteínas de unión que se derivan de inmunoglobulinas y que son multivalentes y multispecíficas, tales como los "diacuerpos" descritos en el documento WO 94/13804.

Los anticuerpos según la invención pueden purificarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos pueden purificarse por afinidad por pase sobre columna a la que se une LTBP2. Los anticuerpos unidos pueden entonces eluirse de la columna usando un tampón con una alta concentración de sales.

45 *Oligonucleótidos antisentido*

Los oligonucleótidos antisentido son secuencias de nucleótidos que son complementarias a una secuencia de ADN o ARN específica. Una vez introducidos en una célula, los nucleótidos complementarios se combinan con secuencias naturales producidas por la célula para formar complejos y bloquear tanto la transcripción como la traducción. Preferentemente, un oligonucleótido antisentido tiene al menos 11 nucleótidos de longitud, pero puede tener al menos 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ó 50 o más nucleótidos de longitud. También pueden usarse secuencias más largas. Las moléculas de oligonucleótido antisentido pueden proporcionarse en una construcción de ADN e introducirse en una célula como se ha descrito anteriormente para reducir el nivel de productos génicos de LTBP2 en la célula.

Los oligonucleótidos antisentido pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o una combinación de ambos. Los oligonucleótidos pueden sintetizarse manualmente o por un sintetizador automatizado, por enlace covalente del extremo 5' de un nucleótido con el extremo 3' de otro nucleótido con enlaces internucleotídicos de no fosfodiéster tales alquilfosfonatos, fosforotioatos, fosforoditioatos, alquil-fosfonotioatos, alquilfosfonatos, fosforamidatos, ésteres de

fosfato, carbamatos, acetamidato, ésteres carboximéticos, carbonatos y triésteres de fosfato.

Las modificaciones de la expresión génica de LTBP2 pueden obtenerse diseñando oligonucleótidos antisentido que formarán dúplex con el control, 5', o regiones reguladoras del gen LTBP2. Se prefieren oligonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la transcripción, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 del sitio de inicio. Similarmente, la inhibición puede lograrse usando metodología de apareamiento de bases de "hélices triples". El apareamiento de hélices triples es útil debido a que produce inhibición de la capacidad de la doble hélice para abrirse suficientemente para la unión de polimerasas, factores de transcripción o chaperonas. Los avances terapéuticos usando ADN de tríplex se han descrito en la bibliografía [Nicholls, (1993)]. Un oligonucleótido antisentido también puede diseñarse para bloquear la traducción de ARNm previniendo la unión del transcrito a ribosomas.

No se requiere complementariedad precisa para la formación satisfactoria de complejos entre un oligonucleótido antisentido y la secuencia complementaria de un polinucleótido de LTBP2. Los oligonucleótidos antisentido que comprenden, por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5 o más estiramientos de nucleótidos contiguos que son precisamente complementarios a un polinucleótido de LTBP2, cada uno separado por un estiramiento de nucleótidos contiguos que no son complementarios a nucleótidos de LTBP2 adyacentes, puede proporcionar suficiente especificidad que elige diana por ARNm de LTBP2. Preferentemente, cada estiramiento de nucleótidos contiguos complementarios tiene al menos 4, 5, 6, 7 u 8 o más nucleótidos de longitud. Las secuencias intervinientes no complementarias tienen preferentemente 1, 2, 3 ó 4 nucleótidos de longitud. Un experto en la materia puede usar fácilmente el punto de fusión calculado de un par antisentido-sentido para determinar el grado de desapareamiento que se tolerará entre un oligonucleótido antisentido particular y una secuencia de polinucleótidos de LTBP2 particular. Los oligonucleótidos antisentido pueden modificarse sin afectar su capacidad para hibridarse con un polinucleótido de LTBP2. Estas modificaciones pueden ser internas o en uno o ambos extremos de la molécula antisentido. Por ejemplo, pueden modificarse enlaces fosfato internucleosídicos añadiendo restos colestero o diamina con números variables de residuos de carbono entre los grupos amino y la ribosa terminal. También puede emplearse bases y/o azúcares modificados, tales como arabinosa en lugar de ribosa, o un oligonucleótido sustituido en 3', 5' en el que el grupo hidroxilo en 3' o el grupo fosfato en 5' están sustituidos, en un oligonucleótido antisentido modificado. Estos oligonucleótidos modificados pueden prepararse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica.

Ribozimas

Las ribozimas son moléculas de ARN con actividad catalítica [Uhlmann, (1987)]. Las ribozimas pueden usarse para inhibir la función génica escindiendo una secuencia de ARN, como se conoce en la técnica. El mecanismo de la acción de ribozimas implica hibridación específica de secuencias de la molécula de ribozima para ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Ejemplos incluyen moléculas de ribozima de motivo de cabeza de martillo manipuladas que pueden catalizar específicamente y eficientemente la escisión endonucleolítica de secuencias de nucleótidos específicas. La secuencia codificante de un polinucleótido de LTBP2 puede usarse para generar ribozimas que se unirán específicamente a ARNm transcrito de un polinucleótido de LTBP2. Procedimientos de diseño y construcción de ribozimas que pueden escindir otras moléculas de ARN en trans en un modo altamente específico de secuencia se han desarrollado y descrito en la materia. Por ejemplo, la actividad de escisión de ribozimas puede elegirse como diana para ARN específicos manipulando una región de "hibridación" discreta en la ribozima. La región de hibridación contiene una secuencia complementaria al ARN diana y así se hibrida específicamente con el ARN diana.

Sitios de escisión de ribozimas específicos dentro de una diana de ARN de LTBP2 pueden identificarse barriendo la molécula diana para sitios de escisión de ribozima que incluyen las siguientes secuencias: GUA, GUU y GUC. Una vez identificada, las secuencias de ARN cortas de entre 15 y 20 ribonucleótidos correspondientes a la región del ARN diana que contiene el sitio de escisión pueden evaluarse para rasgos estructurales secundarios que pueden hacer que la diana sea inoperable. La idoneidad de las dianas de ARN de LTBP2 candidatas también pueden evaluarse probando la accesibilidad a la hibridación con oligonucleótidos complementarios usando ensayos de protección de ribonucleasa. Las secuencias de nucleótidos mostradas en SEC ID N°: 1 y su complemento proporcionan fuentes de secuencias de la región de hibridación adecuadas. Pueden usarse secuencias complementarias más largas para aumentar la afinidad de la secuencia de hibridación por la diana. Las regiones de hibridación y escisión de la ribozima pueden relacionarse íntegramente de forma que tras la hibridación con el ARN diana mediante las regiones complementarias, la región catalítica de la ribozima pueda escindir la diana.

Las ribozimas pueden introducirse en células como parte de una construcción de ADN. Procedimientos mecánicos, tales como microinyección, transfección mediada por liposomas, electroporación o precipitación con fosfato de calcio, pueden usarse para introducir una construcción de ADN que contiene ribozimas en células en las que se desea reducir la expresión de LTBP2. Alternativamente, si se desea que las células retengan establemente la construcción de ADN, la construcción puede suministrarse en un plásmido y mantenerse como un elemento separado o integrado en el genoma de las células, como se conoce en la técnica. Una construcción de ADN que codifica ribozima puede incluir elementos reguladores de la transcripción, tales como un elemento promotor, un potenciador o elemento de UAS, y una señal terminadora de la transcripción, para controlar la transcripción de ribozimas en las células (documento U.S.

5.641.673). Las ribozimas también pueden manipularse para proporcionar un nivel de regulación adicional, de manera que la destrucción de ARNm solo se produzca cuando tanto una ribozima como un gen diana se inducen en las células.

Ensayo de LTBP2

- 5 La expresión de proteínas LTBP2 en tejidos, homogeneizados de tejido y fluidos corporales que incluyen plasma y suero puede medirse por estrategias basadas en anticuerpos, por ejemplo, por tecnología ELISA o transferencia Western / inmunofluorescencia. Un anticuerpo policlonal generado contra la LTBP2 de longitud completa se ha descrito en la bibliografía.

Cribado / Ensayos de cribado

10 Reguladores

Reguladores como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que afectan la actividad de LTBP2 *in vivo* y/o *in vitro*. Los reguladores pueden ser agonistas y antagonistas del polipéptido de LTBP2 y pueden ser compuestos que ejercen su efecto sobre la actividad de LTBP2 mediante la actividad enzimática, expresión, modificaciones postraduccionales o por otros medios. Los agonistas de LTBP2 son moléculas que, cuando se unen a LTBP2, aumentan o prolongan la actividad de LTBP2. Los agonistas de LTBP2 incluyen proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, moléculas pequeñas, o cualquier otra molécula que active LTBP2. Los antagonistas de LTBP2 son moléculas que, cuando se unen a LTBP2, disminuyen la cantidad o la duración de la actividad de LTBP2. Los antagonistas incluyen proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, anticuerpos, moléculas pequeñas, o cualquier otra molécula que disminuya la actividad de LTBP2.

- 20 El término “modular”, como aparece en el presente documento, se refiere a un cambio en la actividad del polipéptido de LTBP2. Por ejemplo, la modulación puede producir un aumento o una disminución en la actividad enzimática, características de unión, o cualquier otra propiedad biológica, funcional o inmunológica de LTBP2.

25 Como se usa en el presente documento, los términos “unión específica” o “que se une específicamente” se refieren a esa interacción entre una proteína o péptido y un agonista, un anticuerpo o un antagonista. La interacción depende de la presencia de una estructura particular de la proteína reconocida por la molécula de unión (es decir, el determinante antigénico o epítipo). Por ejemplo, si un anticuerpo es específico para el epítipo “A”, la presencia de un polipéptido que contiene el epítipo A, o la presencia de A sin marcar libre, en una reacción que contiene A marcado libre y el anticuerpo reducirá la cantidad de A marcada que se une al anticuerpo.

30 La invención proporciona procedimientos (también denominados en el presente documento “ensayos de cribado”) para identificar compuestos que pueden usarse para el tratamiento de enfermedades relacionadas con LTBP2. Los procedimientos conllevan la identificación de compuestos candidatos o de prueba o agentes (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otras moléculas) que se unen a LTBP2 y/o tienen un efecto estimulante o inhibitor sobre la actividad biológica de LTBP2 o su expresión y luego determinar cuál de estos compuestos tiene un efecto sobre síntomas o enfermedades relacionadas con LTBP2 en un ensayo *in vivo*.

35 Compuestos candidatos o de prueba o agentes que se unen a LTBP2 y/o tienen un efecto estimulante o inhibitor sobre la actividad o la expresión de LTBP2 se identifican tanto en ensayos que emplean células que expresan LTBP2 (ensayos basados en células) como en ensayos con LTBP2 aislada (ensayos libres de células). Los diversos ensayos pueden emplear una variedad de variantes de LTBP2 (por ejemplo, LTBP2 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de LTBP2, o una proteína de fusión que incluye toda o una parte de LTBP2). Además, LTBP2 puede derivarse de cualquier especie adecuada de mamífero (por ejemplo, LTBP2 humana, LTBP2 de rata o LTBP2 murina). El ensayo puede ser un ensayo de unión que conlleva la medición directa o indirecta de la unión de un compuesto de prueba o un ligando de LTBP2 conocido a LTBP2. El ensayo también puede ser un ensayo de actividad que conlleva la medición directa o indirecta de la actividad de LTBP2. El ensayo también puede ser un ensayo de expresión que conlleva la medición directa o indirecta de la expresión de ARNm de LTBP2 o proteína LTBP2. Los diversos ensayos de cribado se combinan con un ensayo *in vivo* que conlleva medir el efecto del compuesto de prueba en los síntomas de enfermedades relacionadas con LTBP2.

50 La presente invención incluye ensayos libres de células bioquímicos que permiten la identificación de inhibidores y agonistas de proteínas adecuados como estructuras de cabeza de serie para el desarrollo farmacológico de fármacos. Tales ensayos implican poner en contacto una forma de LTBP2 (por ejemplo, LTBP2 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de LTBP2, o una proteína de fusión que comprende toda o una parte de LTBP2) con un compuesto de prueba y determinar la capacidad del compuesto de prueba para actuar de antagonista (preferentemente) o agonista de la actividad enzimática de LTBP2.

Pueden usarse ensayos de disolución *in vitro* para identificar un sustrato o inhibidor de LTBP2. También pueden usarse sistemas en fase sólida para identificar un sustrato o inhibidor de un polipéptido de LTBP2. Por ejemplo, un polipéptido

de LTBP2 o proteína de fusión de LTBP2 puede inmovilizarse sobre la superficie de un chip receptor de un instrumento biosensor comercialmente disponible (BIAcore, Biacore AB; Uppsala, Suecia). El uso de este instrumento se desvela, por ejemplo, por [Karlsson, (1991), y Cunningham y Wells, (1993)].

5 En resumen, un polipéptido de LTBP2 o proteína de fusión se une covalentemente, usando química de aminos o de sulfhidrilo, a fibras de dextrano que están unidas a película de oro dentro de una celda de flujo. Una muestra de prueba se pasa entonces a través de la celda. Si un sustrato de LTBP2 o inhibidor está presente en la muestra, se unirá al polipéptido inmovilizado o proteína de fusión, causando un cambio en el índice de refracción del medio, que se detecta como un cambio en la resonancia de plasmones superficiales de la película de oro. Este sistema permite la determinación de constantes de asociación y disociación, a partir de las cuales puede calcularse la afinidad de unión, y 10 evaluación de la estequiometría de unión, además de los efectos cinéticos de la mutación de LTBP2. Este sistema también puede usarse para examinar interacciones anticuerpo-antígeno, y las interacciones de otros pares de complemento/anticomplemento.

En una realización, la invención proporciona ensayos para cribar compuestos candidatos o de prueba que se unen a o modulan la actividad de LTBP2. Tales ensayos pueden emplear LTBP2 de longitud completa, un fragmento biológicamente activo de LTBP2, o una proteína de fusión que incluye toda o una parte de LTBP2. Como se describe en mayor detalle más adelante, el compuesto de prueba puede obtenerse por cualquier medio adecuado, por ejemplo, a partir de bibliotecas de compuestos convencionales.

El determinar la capacidad del compuesto de prueba para modular la actividad de LTBP2 puede llevarse a cabo, por ejemplo, determinando la capacidad de LTBP2 para unirse a o interactuar con una molécula diana. La molécula diana puede ser una molécula con la que LTBP2 se une o interactúa en la naturaleza. La molécula diana puede ser un componente de una ruta de transducción de señales que facilita la transducción de una señal extracelular. La molécula de LTBP2 diana puede ser, por ejemplo, una segunda proteína intracelular que tiene actividad catalítica o una proteína que facilita la asociación de moléculas de señalización en la dirección 3' con LTBP2.

La determinación de la capacidad de LTBP2 para unirse a o interactuar con una molécula diana puede llevarse a cabo por uno de los procedimientos descritos anteriormente para determinar la unión directa. En una realización, el determinar la capacidad de un polipéptido de la invención para unirse a o interactuar con una molécula diana puede llevarse a cabo determinando la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana puede determinarse detectando la inducción de un segundo mensajero celular de la diana (por ejemplo, Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP_3 , etc.), detectando actividad catalítica / enzimática de la diana sobre un sustrato apropiado, detectando 30 la inducción de un gen indicador (por ejemplo, un elemento regulador que es sensible a un polipéptido de la invención operativamente ligado a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, luciferasa), o detectando una respuesta celular.

En diversas realizaciones de los procedimientos de ensayo anteriores de la presente invención puede desearse inmovilizar LTBP2 (o una molécula diana de LTBP2) para facilitar la separación de formas complejadas de sin complejar de una o ambas proteínas, además de acomodar la automatización del ensayo. La unión de un compuesto de prueba a LTBP2, o interacción de LTBP2 con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, puede llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los reactantes. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga. En una realización puede proporcionarse una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas de las proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) o proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa pueden adsorberse sobre perlas de glutatión Sepharose (Sigma Chemical; St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que luego se combinan con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y tanto la proteína diana no adsorbida o LTBP2, y la mezcla incubada en condiciones propicias para la formación de complejos (por ejemplo, a condiciones fisiológicas para sal y pH). Tras la incubación, las perlas o pocillos de la placa de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente sin unir y la formación de complejos se mide tanto directamente como indirectamente, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse de la matriz y el nivel de unión o actividad de LTBP2 puede determinarse usando técnicas convencionales.

Otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices también pueden usarse en los ensayos de cribado de la invención. Por ejemplo, tanto LTBP2 como su molécula diana pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. El polipéptido biotinilado de la invención o moléculas diana pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas muy conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, Ill.) e inmovilizarse en los pocillos de placas recubiertas de estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, anticuerpos reactivos con LTBP2 o moléculas diana, pero que no interfieren con la unión del polipéptido de la invención a su molécula diana, pueden derivatizarse a los pocillos de la placa, y la diana sin unir o polipéptido de la invención atrapaarse en los pocillos por conjugación de anticuerpo. Los procedimientos para detectar tales complejos, además de aquellos descritos anteriormente para los complejos inmovilizados en GST, incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos reactivos con LTBP2 o molécula diana, además de ensayos ligados

a enzima que se basan en detectar una actividad enzimática asociada a LTBP2 o molécula diana.

Otra técnica para el cribado de fármacos que puede usarse proporciona cribado de alto rendimiento de compuestos que tienen afinidad de unión adecuada a la proteína de interés como se describe en la solicitud publicada PCT WO84/03564. En este procedimiento, grandes números de pequeños compuestos de prueba diferentes se sintetizan sobre un sustrato sólido, tal como agujas de plástico o alguna otra superficie. Los compuestos de prueba se hacen reaccionar con LTBP2, o fragmentos de la misma, y se lavan. La LTBP2 sin unir se detecta entonces mediante procedimientos muy conocidos en la técnica. La LTBP2 purificada también puede recubrirse directamente sobre placas para su uso en las técnicas de cribado de fármacos anteriormente mencionadas. Alternativamente pueden usarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre un soporte sólido.

En otra realización pueden usarse ensayos de cribado de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizantes que pueden unirse específicamente a LTBP2 compiten con un compuesto de prueba para la unión de LTBP2. De este modo pueden usarse anticuerpos para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con LTBP2.

El ensayo de cribado también puede implicar monitorizar la expresión de LTBP2. Por ejemplo, reguladores de la expresión de LTBP2 pueden identificarse en un procedimiento en el que una célula se pone en contacto con un compuesto candidato y se determina la expresión de proteína LTBP2 o ARNm en la célula. El nivel de expresión de proteína LTBP2 o ARNm la presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión de proteína LTBP2 o ARNm en ausencia del compuesto candidato. El compuesto candidato puede entonces identificarse como un regulador de la expresión de LTBP2 basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de proteína LTBP2 o proteína de ARNm es mayor (mayor estadísticamente significativamente) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulante de proteína LTBP2 o expresión de ARNm. Alternativamente, cuando la expresión de proteína LTBP2 o ARNm es menor (estadísticamente significativamente menor) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de proteína LTBP2 o expresión de ARNm. El nivel de proteína LTBP2 o expresión de ARNm en las células puede determinarse mediante procedimientos descritos a continuación.

Ensayos de unión

Para ensayos de unión, el compuesto de prueba es preferentemente una molécula pequeña que se une a y ocupa el sitio activo del polipéptido de LTBP2, haciendo así el sitio de unión a ligando inaccesible al sustrato de forma que se prevenga la actividad biológica normal. Ejemplos de tales moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos. Los posibles ligandos que se unen a un polipéptido de la invención incluyen, pero no se limitan a, ligandos naturales de proteínas LTBP2 conocidas y análogos o derivados de los mismos.

En ensayos de unión, tanto el compuesto de prueba como el polipéptido de LTBP2 pueden comprender una marca detectable, tal como una marca fluorescente, radioisotópica, quimioluminiscente o enzimática, tal como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina o luciferasa. La detección de un compuesto de prueba que está unido a polipéptido de LTBP2 puede entonces llevarse a cabo, por ejemplo, por recuento directo de radioemisión, por recuento por centelleo, o determinando la conversión de un sustrato apropiado en un producto detectable. Alternativamente, la unión de un compuesto de prueba a un polipéptido de LTBP2 puede determinarse sin marcar ninguno de los interactuantes. Por ejemplo, puede usarse un microfisiómetro para detectar la unión de un compuesto de prueba con un polipéptido de LTBP2. Un microfisiómetro (por ejemplo, Cytosensor™) es un instrumento analítico que mide la tasa a la que una célula acidifica su entorno usando un sensor potenciométrico direccionable por la luz (LAPS). Los cambios en esta tasa de acidificación pueden usarse como indicador de la interacción entre un compuesto de prueba y LTBP2 [Haseloff, (1988)].

La determinación de la capacidad de un compuesto de prueba para unirse a LTBP2 también puede llevarse a cabo usando una tecnología tal como análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIA) [McConnell, (1992); Sjolander, (1991)]. BIA es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los interactuantes (por ejemplo, BIACore™). Los cambios en el fenómeno óptico resonancia de plasmones superficiales (SPR) pueden usarse como indicación de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

En otro aspecto más de la invención, un polipéptido similar a LTBP2 puede usarse como una "proteína de cebo" en un ensayo de dos híbridos o ensayo de tres híbridos [Szabo, (1995); documento U.S. 5.283.317] para identificar otras proteínas que se unen a o interaccionan con LTBP2 y modulan su actividad.

El sistema de dos híbridos se basa en la naturaleza modular de la mayoría de los factores de transcripción, que consisten en dominios de unión de ADN y de activación separables. Brevemente, el ensayo utiliza dos construcciones de ADN diferentes. Por ejemplo, en una construcción, el polinucleótido que codifica LTBP2 puede fusionarse con un polinucleótido que codifica el dominio de unión de ADN de un factor de transcripción conocido (por ejemplo, GAL-4). En la otra construcción, una secuencia de ADN que codifica una proteína sin identificar ("presa" o "muestra") puede

fusionarse con un polinucleótido que codifica el dominio de activación del factor de transcripción conocido. Si las proteínas “cebo” y “presa” pueden interactuar *in vivo* para formar un complejo dependiente de proteína, los dominios de unión de ADN y de activación del factor de transcripción se ponen en estrecha proximidad. Esta proximidad permite la transcripción de un gen indicador (por ejemplo, LacZ), que está operativamente ligado a un sitio regulador de la transcripción sensible al factor de transcripción. La expresión del gen indicador puede detectarse, y pueden aislarse colonias de células que contienen el factor de transcripción funcional y usarse para obtener la secuencia de ADN que codifica la proteína que interactúa con LTBP2.

Puede desearse inmovilizar tanto LTBP2 (o polinucleótido) como el compuesto de prueba para facilitar la separación de la forma unida de las formas sin unir de uno o ambos interactuantes, además de facilitar la automatización del ensayo.

Así, cualquier polipéptido similar a LTBP2 (o polinucleótido) o el compuesto de prueba puede unirse a un soporte sólido. Soportes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, portaobjetos de vidrio o de plástico, placas de cultivo de tejido, pocillos de microtitulación, tubos, chips de silicio o partículas tales como perlas (incluyendo, pero no se limitan a, perlas de látex, poliestireno o vidrio). Puede usarse cualquier procedimiento conocido en la técnica para unir el polipéptido similar a LTBP2 (o polinucleótido) o compuesto de prueba a un soporte sólido, que incluye el uso de enlaces covalentes y no covalentes, absorción pasiva, o pares de restos de unión unidos respectivamente al polipéptido (o polinucleótido) o compuesto de prueba y el soporte sólido. Los compuestos de prueba se unen preferentemente al soporte sólido en una matriz, de manera que pueda rastrearse la localización de los compuestos de prueba individuales. La unión de un compuesto de prueba a LTBP2 (o un polinucleótido que codifica LTBP2) puede llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los reactantes. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrífuga.

En una realización, LTBP2 es una proteína de fusión que comprende un dominio que permite la unión de LTBP2 a un soporte sólido. Por ejemplo, proteínas de fusión de glutatión-S-transferasa pueden adsorberse sobre perlas de glutatión Sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que luego se combinan con el compuesto de prueba o el compuesto de prueba y la LTBP2 no adsorbida; la mezcla se incuba entonces en condiciones apropiadas para la formación de complejos (por ejemplo, a condiciones fisiológicas para sal y pH). Tras la incubación, las perlas o pocillos de placas de microtitulación se lavan para eliminar cualquier componente sin unir. La unión de los interactuantes puede determinarse tanto directamente como indirectamente, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los complejos pueden disociarse del soporte sólido antes de determinar la unión.

En los ensayos de cribado de la invención también pueden usarse otras técnicas para inmovilizar proteínas o polinucleótidos sobre un soporte sólido. Por ejemplo, tanto LTBP2 (o un polinucleótido que codifica LTBP2) como un compuesto de prueba pueden inmovilizarse utilizando conjugación de biotina y estreptavidina. LTBP2 biotinilada (o un polinucleótido que codifica LTBP2 biotinilada) o compuestos de prueba pueden prepararse a partir de biotina-NHS (N-hidroxisuccinimida) usando técnicas muy conocidas en la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) e inmovilizarse en los pocillos de placas recubiertas de estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos que se unen específicamente a LTBP2, polinucleótido, o un compuesto de prueba, pero que no interfieren con un sitio de unión deseado, tal como el sitio activo de LTBP2, pueden derivatizarse a los pocillos de la placa. La diana sin unir o proteína puede atraparse en los pocillos por conjugación de anticuerpos.

Los procedimientos para detectar tales complejos, además de aquellos descritos anteriormente para los complejos inmovilizados de GST, incluyen inmunodetección de complejos usando anticuerpos que se unen específicamente a polipéptido de LTBP2 o compuesto de prueba, ensayos ligados a enzima que se basan en detectar una actividad del polipéptido de LTBP2, y electroforesis en gel de SDS bajo condiciones no reductoras.

El cribado para compuestos de prueba que se unen a un polipéptido de LTBP2 o polinucleótido también puede llevarse a cabo en una célula intacta. Cualquier célula que comprenda un polipéptido de LTBP2 o polinucleótido puede usarse en un sistema de ensayo basado en células. Un polinucleótido de LTBP2 puede producirse naturalmente en la célula o puede introducirse usando técnicas tales como aquellas descritas anteriormente. La unión del compuesto de prueba a LTBP2 o un polinucleótido que codifica LTBP2 se determina como se ha descrito anteriormente.

Ensayos funcionales

Los compuestos de prueba pueden probarse para la capacidad para aumentar o disminuir la actividad de LTBP2 de un polipéptido de LTBP2. La actividad de LTBP2 puede medirse, por ejemplo, usando procedimientos descritos en los ejemplos específicos, más adelante. La actividad de LTBP2 puede medirse después de poner en contacto tanto una LTBP2 purificada como una célula intacta con un compuesto de prueba. Un compuesto de prueba que disminuye la actividad de LTBP2 al menos aproximadamente el 10, preferentemente aproximadamente el 50, más preferentemente aproximadamente el 75, 90 o el 100% se identifica como un posible agente para disminuir la actividad de LTBP2. Un compuesto de prueba que aumenta la actividad de LTBP2 al menos aproximadamente el 10, preferentemente aproximadamente el 50, más preferentemente aproximadamente el 75, 90 o el 100% se identifica como un posible agente para aumentar la actividad de LTBP2.

Expresión génica

En otra realización se identifican compuestos de prueba que aumentan o disminuyen la expresión génica de LTBP2. Como se usa en el presente documento, el término “se correlaciona con la expresión de un polinucleótido” indica que la detección de la presencia de ácidos nucleicos, la misma secuencia de ácidos nucleicos o relacionada con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica LTBP2, por análisis Northern o PCR en tiempo real, es indicativa de la presencia de ácidos nucleicos que codifican LTBP2 en una muestra, y así se correlaciona con la expresión del transcrito del polinucleótido que codifica LTBP2. El término “micromatriz”, como se usa en el presente documento, se refiere a una matriz de distintos polinucleótidos o oligonucleótidos dispuestos en una matriz sobre un sustrato, tal como papel, nailon o cualquier otro tipo de membrana, filtro, chip, portaobjetos de vidrio, o cualquier otro soporte sólido adecuado. Un polinucleótido de LTBP2 se pone en contacto con un compuesto de prueba, y se determina la expresión de un ARN o producto de polipéptido del polinucleótido de LTBP2. El nivel de expresión de ARNm o polipéptido apropiado en presencia del compuesto de prueba se compara con el nivel de expresión de ARNm o polipéptido en ausencia del compuesto de prueba. El compuesto de prueba puede entonces identificarse como un regulador de la expresión basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de ARNm o polipéptido es mayor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como un estimulante o potenciador de la expresión del ARNm o polipéptido. Alternativamente, cuando la expresión del ARNm o polipéptido es menor en presencia del compuesto de prueba que en su ausencia, el compuesto de prueba se identifica como un inhibidor de la expresión del ARNm o polipéptido.

El nivel de expresión del ARNm de LTBP2 o polipéptido en las células puede determinarse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica para detectar ARNm o polipéptido. Pueden usarse procedimientos tanto cualitativos como cuantitativos. La presencia de productos de polipéptido del polinucleótido de LTBP2 puede determinarse, por ejemplo, usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen procedimientos inmunoquímicos tales como radioinmunoensayo, transferencia Western e inmunohistoquímica. Alternativamente, la síntesis de polipéptidos puede determinarse *in vivo*, en un cultivo celular, o en un sistema de traducción *in vitro* detectando la incorporación de aminoácidos marcados en LTBP2.

Tal cribado puede llevarse a cabo tanto en un sistema de ensayo sin células como en una célula intacta. Cualquier célula que exprese polinucleótido de LTBP2 puede usarse en un sistema de ensayo basado en células. El polinucleótido de LTBP2 puede producirse naturalmente en la célula o puede introducirse usando técnicas tales como aquellas descritas anteriormente. Puede usarse tanto un cultivo primario como una línea celular establecida.

Compuestos de prueba

Compuestos de prueba adecuados para su uso en los ensayos de cribado de la invención pueden obtenerse a partir de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, bibliotecas de compuestos convencionales. Los compuestos de prueba también pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en procedimientos de bibliotecas combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida paralela espacialmente direccionables o de fase en disolución; procedimientos de bibliotecas sintéticas que requieren deconvolución; el procedimiento de bibliotecas de “una perla un compuesto”; y procedimientos de bibliotecas sintéticas usando selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de bibliotecas biológicas se limita a bibliotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques se aplican a bibliotecas de péptidos, de oligómeros de no péptido o de moléculas pequeñas de compuestos [Lam, (1997)]. Ejemplos de procedimientos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la materia. Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución o sobre perlas, bacterias, esporas, plásmidos o fago.

Modelado de reguladores

El modelado informático y la búsqueda de tecnologías permiten la identificación de compuestos, o la mejora de compuestos ya identificados, que pueden modular la expresión o actividad de LTBP2. Habiendo identificado un compuesto o composición tal, se identifican los sitios activos o regiones. Tales sitios podrían normalmente ser el sitio activo enzimático, sitios de unión reguladores, o sitios de unión a ligando. El sitio activo puede identificarse usando procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, de las secuencias de aminoácidos de péptidos, de las secuencias de nucleótidos de ácidos nucleicos, o del estudio de complejos del compuesto o composición relevante con su ligando natural. En el último caso pueden usarse procedimientos químicos o de cristalografía de rayos X para encontrar el sitio activo encontrando en el factor en el que se encuentra el ligando complejoado.

A continuación se determina la estructura geométrica tridimensional del sitio activo. Esto puede hacerse mediante procedimientos conocidos, que incluyen cristalografía de rayos X, que puede determinar una estructura molecular completa. Por otra parte, puede usarse RMN en fase sólida o líquida para determinar ciertas distancias intramoleculares. Cualquier otro procedimiento experimental de determinación de estructura puede usarse para obtener estructuras geométricas parciales o completas. Las estructuras geométricas pueden medirse con un ligando complejoado, natural o artificial, que puede aumentar la precisión de la estructura del sitio activo determinada.

Si se determina una estructura incompleta o insuficientemente precisa, los procedimientos de modelado numérico basados en ordenador pueden usarse para completar la estructura o mejorar su precisión. Puede usarse cualquier procedimiento de modelado reconocido, que incluye modelos parametrizados específicos para biopolímeros particulares tales como proteínas o ácidos nucleicos, modelos dinámicos moleculares basados en movimientos moleculares informáticos, modelos de mecánica estadística basados en conjuntos térmicos, o modelos combinados. Para la mayoría de los tipos de modelos son necesarios campos de fuerzas moleculares convencionales que representan las fuerzas entre los átomos y grupos constituyentes, y pueden seleccionarse de campos de fuerza conocidos en la química física. Las estructuras experimentales incompletas o menos precisas pueden servir de limitaciones a las estructuras completas y más precisas calculadas por estos procedimientos de modelado.

Finalmente, habiendo determinado la estructura del sitio activo, tanto experimentalmente, por modelado como por una combinación, pueden identificarse compuestos moduladores candidatos buscando en bases de datos que contienen compuestos junto con información sobre su estructura molecular. Tal búsqueda busca compuestos que tienen estructuras que coinciden con la estructura del sitio activo determinada y que interactúan con los grupos que definen el sitio activo. Tal búsqueda puede ser manual, pero preferentemente está asistida por ordenador. Estos compuestos encontrados de esta búsqueda son posibles compuestos moduladores de LTBP2.

Alternativamente, estos procedimientos pueden usarse para identificar compuestos moduladores mejorados a partir de un compuesto modulador ya conocido o ligando. La composición del compuesto conocido puede modificarse y los efectos estructurales de modificación pueden determinarse usando los procedimientos experimentales y de modelado informático descritos anteriormente aplicados a la nueva composición. La estructura alterada se compara entonces con la estructura de sitio activo del compuesto para determinar si resulta un ajuste mejorado o interacción. De este modo, variaciones sistemáticas en la composición, tales como variando grupos laterales, pueden evaluarse rápidamente para obtener compuestos moduladores modificados o ligandos de especificidad o actividad mejorada.

Indicaciones terapéuticas y procedimientos

Se encontró por el presente solicitante que LTBP2 se expresa en diversos tejidos humanos.

Trastornos cardiovasculares

La LTBP2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos relacionados con cardiovascular: corazón, infarto de miocardio del corazón, aurícula del corazón (derecha), ventrículo del corazón (izquierdo), fibras de Purkinje, aorta, válvula de la aorta, arteria coronaria, arteria pulmonar, arteria carótida, vena, válvula pulmonar, vena (cava), células endoteliales de la arteria coronaria, células aórticas de músculo liso, células de músculo liso de la arteria pulmonar, células endoteliales aórticas, células HUVEC, células endoteliales de la arteria pulmonar, células endoteliales de la arteria ilíaca, glándula suprarrenal, tumor hepático, adiposo, riñón, tumor renal. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar enfermedades cardiovasculares. Adicionalmente, la actividad de LTBP2 humana puede modularse para tratar enfermedades cardiovasculares.

La LTBP2 humana se expresa altamente en tejidos adiposos. La expresión en adiposo demuestra que LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar enfermedades de dislipidemia como trastorno cardiovascular. Adicionalmente, la actividad de LTBP2 humana puede modularse para tratar, pero no se limita a, enfermedades de dislipidemia.

La LTBP2 humana se expresa altamente en tejidos de hígado: tumor de hígado. La expresión en tejidos de hígado demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar trastornos de dislipidemia como trastorno cardiovascular. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar, pero no se limita a, trastornos de dislipidemia.

La LTBP2 humana se expresa altamente en tejidos de riñón: riñón, tumor de riñón. La expresión en tejidos de riñón demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar trastornos de la tensión arterial como trastorno cardiovascular. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar, pero no se limita a, trastornos de la tensión arterial como hipertensión o hipotensión.

La LTBP2 humana se expresa altamente en glándula suprarrenal. La expresión en tejidos de la glándula suprarrenal demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar trastornos de la tensión arterial como trastorno cardiovascular. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar, pero no se limita a, trastornos de la tensión arterial como hipertensión o hipotensión.

La insuficiencia cardíaca se define como un estado patofisiológico en el que una anomalía de la función cardíaca es responsable del fallo del corazón para bombear la sangre a una tasa proporcional al requisito del tejido metabolizante. Incluye todas las formas de fallos de bombeo tales como alta salida y baja salida, agudo y crónico, derecho o izquierdo, sistólico o diastólico, independientes de la causa subyacente.

El infarto de miocardio (IM) se produce generalmente por una súbita disminución en la circulación sanguínea coronaria que sigue a una oclusión trombótica de una arteria coronaria previamente estrechada por arteriosclerosis. Se incluye profilaxis del IM (prevención primaria y secundaria), además del tratamiento agudo de IM y la prevención de complicaciones.

- 5 Las enfermedades isquémicas son afecciones en las que el flujo coronario se limita produciendo una perfusión que es inadecuada para cumplir el requisito miocárdico para oxígeno. Este grupo de enfermedades incluye angina estable, angina inestable e isquemia asintomática.

10 Las arritmias incluyen todas las formas de taquiarritmias auriculares y ventriculares, taquicardia auricular, aleteo auricular, fibrilación auricular, taquicardia por reentrada aurículo-ventricular, síndrome de preexcitación, taquicardia ventricular, aleteo ventricular, fibrilación ventricular, además de formas bradicárdicas de arritmias.

Las enfermedades vasculares hipertensoras incluyen hipertensión arterial primaria, además de todos los tipos de hipertensión arterial secundaria, renal, endocrina, neurogénica, otras. Los genes pueden usarse como dianas de fármaco para el tratamiento de hipertensión, además de para la prevención de todas las complicaciones que se producen a partir de enfermedades cardiovasculares.

- 15 Las enfermedades vasculares periféricas se definen como enfermedades vasculares en las que se reduce el flujo arterial y/o venoso produciendo un desequilibrio entre el suministro de sangre y la demanda de oxígeno del tejido. Incluye enfermedad oclusiva arterial periférica (EOAP) crónica, trombosis arterial aguda y embolia, trastornos vasculares inflamatorios, fenómeno de Raynaud y trastornos venosos.

20 La aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular en la que la pared del vaso es remodelada, comprometiendo la luz del vaso. El procedimiento de remodelado aterosclerótico implica la acumulación de células, tanto células de músculo liso como células inflamatorias de monocitos/macrófagos, en la íntima de la pared del vaso. Estas células captan lípido, probablemente de la circulación, para formar una lesión aterosclerótica madura. Aunque la formación de estas lesiones es un procedimiento crónico, que se produce durante décadas de una vida del ser humano adulto, la mayoría de la morbilidad asociada a aterosclerosis se produce cuando se rompe una lesión, liberando residuos trombogénicos que ocluyen rápidamente la arteria. Cuando se produce un evento agudo tal en la arteria coronaria, puede resultar infarto de miocardio, y en el peor caso, puede producir la muerte.

25 Puede considerarse que la formación de la lesión aterosclerótica se produce en cinco etapas que se solapan tales como migración, acumulación de lípidos, reclutamiento de células inflamatorias, proliferación de células de músculo liso vasculares y deposición de matriz extracelular. Puede mostrarse que cada uno de estos procesos se produce en el hombre y en modelos animales de aterosclerosis, pero no está clara la contribución relativa de cada uno a la patología y significancia clínica de la lesión.

Así, existe la necesidad de procedimientos y agentes terapéuticos para tratar patologías cardiovasculares tales como aterosclerosis y otras afecciones relacionadas con enfermedad de las arterias coronarias.

- 35 Las enfermedades cardiovasculares incluyen, pero no se limitan a, trastornos del corazón y el sistema vascular como insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, enfermedades isquémicas del corazón, todos los tipos de arritmias auriculares y ventriculares, enfermedades vasculares hipertensoras, enfermedades vasculares periféricas y aterosclerosis.

40 A altos o a bajos niveles de grasas en la circulación sanguínea, especialmente colesterol, puede producir problemas a largo plazo. El riesgo a desarrollar aterosclerosis y enfermedad de la arteria coronaria o arteria carótida (y así el riesgo de tener un infarto de miocardio o accidente cerebrovascular) aumenta con el nivel de colesterol total creciente. Sin embargo, niveles de colesterol extremadamente bajos pueden no ser sanos. Ejemplos de trastornos del metabolismo de los lípidos son hiperlipidemia (niveles anormalmente altos de grasas (colesterol, triglicéridos, o ambos) en sangre, puede producirse por historia familiar de hiperlipidemia, obesidad, una dieta cetógena, falta de ejercicio, consumo de alcohol de moderado a alto, tabaquismo, diabetes mal controlada y una glándula tiroidea hipoactiva), hiperlipidemias hereditarias (hiperlipoproteinemia tipo I (hyperquilomicronemia familiar), hiperlipoproteinemia tipo II (hipercolesterolemia familiar), hiperlipoproteinemia tipo III, hiperlipoproteinemia tipo IV, o hiperlipoproteinemia tipo V), hipolipo-proteinemia, lipodosis (producida por anomalías en las enzimas que metabolizan las grasas), enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann Pick, enfermedad de Fabry, enfermedad de Wolman, xantomatosis cerebrotendinosa, sitosterolemia, enfermedad de Refsum o enfermedad de Tay Sachs.

- 50 Los trastornos del riñón pueden conducir a hiper o hipotensión. Ejemplos de problemas del riñón que posiblemente conducen a hipertensión son estenosis de las arterias renales, pielonefritis, glomerulonefritis, tumores de riñón, enfermedad del riñón poliquístico, lesión al riñón, o radioterapia que afecta al riñón. La micción excesiva puede conducir a hipotensión.

Trastornos hematológicos

La LTBP2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos del sistema hematológico: células del estroma de médula ósea, trombocitos y leucocitos. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar enfermedades hematológicas. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar trastornos hematológicos.

- 5 Los trastornos hematológicos comprenden enfermedades de la sangre y todos sus constituyentes, además de enfermedades de órganos que participan en la generación o degradación de la sangre. Incluyen, pero no se limitan a, 1) Anemias, 2) Trastornos mieloproliferativos, 3) Trastornos hemorrágicos, 4) Leucopenia, 5) Trastornos eosinofílicos, 6) Leucemias, 7) Linfomas, 8) Discrasias de células plasmáticas, 9) Trastornos del bazo en el transcurso de trastornos hematológicos. Los trastornos según 1) incluyen, pero no se limitan a, anemias debidas a síntesis de hemo defectuosa o deficiente, eritropoyesis deficiente. Los trastornos según 2) incluyen, pero no se limitan a, policitemia vera, eritrocitosis asociada a tumores, mielofibrosis, trombocitemia. Los trastornos según 3) incluyen, pero no se limitan a, vasculitis, trombocitopenia, trombocitopenia inducida por heparina, púrpura trombocitopénica trombótica, síndrome urémico hemolítico, trastornos hereditarios y adquiridos de la función plaquetaria, trastornos hereditarios de la coagulación. Los trastornos según 4) incluyen, pero no se limitan a, neutropenia, linfocitopenia. Los trastornos según 5) incluyen, pero no se limitan a, hipereosinofilia, síndrome hipereosinofílico idiopático. Los trastornos según 6) incluyen, pero no se limitan a, leucemia mielode aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielocítica crónica, leucemia linfocítica crónica, síndrome mielodisplásico. Los trastornos según 7) incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Hodgkin, linfoma de no Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma cutáneo de linfocitos T por micosis fungoide. Los trastornos según 8) incluyen, pero no se limitan a, mieloma múltiple, macroglobulinemia, enfermedades de la cadena pesada. En extensión de la púrpura trombocitopénica idiopática precedente, también se consideran que son enfermedades hematológicas anemia por deficiencia de hierro, anemia megaloblástica (deficiencia de vitamina B12), anemia aplásica, talasemia, invasión de la médula ósea por linfomas malignos, invasión de la piel por linfomas malignos, síndrome urémico hemolítico, enfermedad de plaquetas gigantes.

Trastornos del cáncer

- 25 La LTBP2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos de cáncer: células HUVEC, tumor de tiroides, tumor de colon, tumor de íleon, tumor de recto, tumor de hígado, tumor de pulmón, tumor de útero, tumor de ovario, tumor de mama, tumor de riñón. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados y en particular la expresión diferencial entre tumor de tiroides de tejido enfermo y tiroides de tejido sano, entre tumor de pulmón de tejido enfermo y pulmón de tejido sano demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar cáncer. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar cáncer.

- Los trastornos del cáncer dentro del alcance de la invención comprenden cualquier enfermedad de un órgano o tejido en mamíferos caracterizado por multiplicación mal controlada o incontrolada de células normales o anormales en ese tejido y su efecto sobre el cuerpo en conjunto. Las enfermedades del cáncer dentro del alcance de la invención comprenden neoplasias benignas, displasias, hiperplasias, además de neoplasias que muestran crecimiento metastásico o cualquier otra transformación como, por ejemplo, leucoplaquias que frecuentemente preceden a brote de cáncer. Las células y tejidos son cancerosos cuando crecen más rápidamente que las células normales, desplazando o extendiéndose en el tejido sano de alrededor o cualquier otro tejido del cuerpo descrito como crecimiento metastásico, asumen formas y tamaños anormales, muestran cambios en su relación nucleocitoplasmática, policromasia nuclear, y finalmente pueden detenerse. Las células y tejidos cancerosos pueden afectar el cuerpo en conjunto cuando causan síndromes paraneoplásicos o si el cáncer se produce dentro de un órgano o tejido vital, la función normal se alterará o detendrá, con posibles resultados mortales. La participación definitiva de un órgano vital por cáncer, tanto primario como metastásico, puede conducir a la muerte del mamífero afectado. El cáncer tiende a diseminarse, y el grado de su diseminación está normalmente relacionado con las posibilidades de un individuo para sobrevivir a la enfermedad. Se dice generalmente que los cánceres están en uno de los tres estadios de crecimiento: temprano, o localizado, cuando un tumor está todavía confinado al tejido de origen, o sitio primario; extensión directa, en la que las células cancerosas del tumor han invadido tejido adyacente o se han extendido solo a ganglios linfáticos regionales; o metástasis, en la que las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo desde el sitio primario, mediante la sangre o sistemas linfáticos, y han establecido sitios de infección secundarios. Se dice que el cáncer es maligno debido a su tendencia a producir muerte si no se trata. Los tumores benignos normalmente no producen muerte, aunque pueden si interfieren con una función corporal normal debido a su localización, tamaño o efectos secundarios paraneoplásicos. De ahí que los tumores benignos también se clasifiquen en la definición de cáncer dentro del alcance de la invención. En general, las células cancerosas se dividen a una mayor tasa que las células normales, pero la distinción entre el crecimiento de tejidos cancerosos y normales no es tanto la rapidez de la división celular en el primero, sino la pérdida parcial o completa de la limitación del crecimiento en células cancerosas y su fallo en diferenciar en un tejido limitado útil del tipo que caracteriza el equilibrio funcional de crecimiento de tejido normal. Los tejidos con cáncer pueden expresar ciertos receptores moleculares y probablemente están influidos por la susceptibilidad e inmunidad del huésped y se sabe que ciertos cánceres de mama y próstata, por ejemplo, se consideran dependientes de hormonas específicas para su existencia. El término "cáncer" bajo el alcance de la invención no se limita a la simple neoplasia benigna, sino que comprende cualquier otra neoplasia benigna y maligna como 1) Carcinoma, 2) Sarcoma, 3)

Carcinosarcoma, 4) Cánceres de tejidos que forman la sangre, 5) Tumores de tejidos nerviosos que incluyen el cerebro, 6) Cáncer de células de la piel. El cáncer según 1) se produce en tejidos epiteliales, que cubren el cuerpo externo (la piel) y revisten membranas mucosas y las estructuras cavitarias internas de órganos, por ejemplo, tales como la mama, pulmón, los tubos respiratorio y gastrointestinal, las glándulas endocrinas y el aparato genitourinario. Los elementos ductales o glandulares pueden persistir en tumores epiteliales, como en adenocarcinomas, como, por ejemplo, adenocarcinoma de tiroides, adenocarcinoma gástrico, adenocarcinoma uterino. Los cánceres del epitelio de células del pavimento de la piel y de ciertas membranas mucosas, tales como, por ejemplo, cánceres de la lengua, labio, laringe, vejiga urinaria, cuello uterino o pene, pueden llamarse carcinoma de células epidermoides o escamosas de los tejidos respectivos y también están en el alcance de la definición de cáncer. El cáncer según 2) se desarrolla en tejidos conjuntivos, que incluyen tejidos fibrosos, tejidos adiposos (grasos), músculo, vasos sanguíneos, hueso y cartílago como, por ejemplo, sarcoma osteogénico; liposarcoma, fibrosarcoma, sarcoma sinovial. El cáncer según 3) es cáncer que se desarrolla en tanto tejido epitelial como conjuntivo. La enfermedad del cáncer dentro del alcance de esta definición puede ser primario o secundario, por lo que primario significa que el cáncer se originó en el tejido en el que se encontró en vez de establecerse como un sitio secundario mediante metástasis de otra lesión. Los cánceres y enfermedades tumorales dentro del alcance de esta definición pueden ser benignos o malignos y pueden afectar todas las estructuras anatómicas del cuerpo de un mamífero. Por ejemplo, pero no se limitan a, comprenden cánceres y enfermedades tumorales de I) la médula ósea y células derivadas de la médula ósea (leucemias), II) las glándulas endocrinas y exocrinas como, por ejemplo, tiroides, paratiroides, pituitaria, glándulas suprarrenales, glándulas salivares, páncreas, III) la mama, como, por ejemplo, tumores benignos o malignos en las glándulas mamarias de tanto un hombre como una mujer, los conductos mamarios, adenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma comedo, enfermedad de Paget del pezón, carcinoma inflamatorio de la mujer joven, IV) el pulmón, V) el estómago, VI) el hígado y el bazo, VII) el intestino delgado, VIII) el colon, IX) el hueso y sus tejidos de soporte y conjuntivos como tumor óseo maligno o benigno, por ejemplo, sarcoma osteogénico maligno, osteoma benigno, tumores de cartílago; como condrosarcoma maligno o condroma benigno; tumores de la médula ósea como mieloma maligno o granuloma eosinofílico benigno, además de tumores metastásicos de tejidos óseos en otras localizaciones del cuerpo; X) la boca, garganta, laringe y el esófago, XI) la vejiga urinaria y los órganos y estructuras internos y externos del aparato urogenital de hombre y mujer como ovarios, úteros, cuello del útero, testículos y glándula prostática, XII) la próstata, XIII) el páncreas, como carcinoma ductal del páncreas; XIV) el tejido linfático como linfomas u otros tumores de origen linfóide, XV) la piel, XVI) cánceres y enfermedades tumorales de todas las estructuras anatómicas que pertenecen a la respiración y a los aparatos respiratorios que incluyen los músculos torácicos y revestimientos, XVII) cáncer primario o secundario de los nódulos linfáticos, XVIII) la lengua y las estructuras óseas del paladar duro o senos nasales, XIX) la boca, mejillas, cuello y glándulas salivares, XX) los vasos sanguíneos incluyendo el corazón y sus revestimientos, XXI) los músculos lisos o esqueléticos y sus ligamentos y revestimientos, XXII) el sistema nervioso periférico, autónomo, central incluyendo el cerebelo, XXIII) , el tejido adiposo.

35 *Sistema endocrino y trastornos hormonales*

La LTBP2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos del sistema endocrinológico: glándula suprarrenal, tiroides, tumor de tiroides, páncreas. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar trastornos endocrinológicos. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar trastornos endocrinológicos.

40 El sistema endocrino consiste en un grupo de órganos cuya función principal es producir y secretar hormonas directamente a la circulación sanguínea. Los órganos principales del sistema endocrino son el hipotálamo, la glándula pituitaria, la glándula tiroides, las glándulas paratiroides, los islotes del páncreas, las glándulas suprarrenales, los testículos y los ovarios.

45 El hipotálamo secreta varias hormonas que estimulan la pituitaria: Algunas desencadenan la liberación de hormonas pituitarias; otras suprimen la liberación de hormonas pituitarias.

La glándula pituitaria coordina muchas funciones de las otras glándulas endocrinas, pero algunas hormonas pituitarias tienen efectos directos.

50 Las células secretoras de insulina del páncreas responden a glucosa y ácidos grasos. Las células paratiroides responden a calcio y fosfato. La médula suprarrenal (parte de la glándula suprarrenal) responde para dirigir la estimulación por el sistema nervioso parasimpático.

Cuando las glándulas endocrinas funcionan mal, la hormona en sangre puede llegar a ser anormalmente alta o baja, alterando las funciones del cuerpo. Muchos trastornos se producen por el mal funcionamiento del sistema endocrino u hormonas endocrinas. Ejemplos de tales trastornos se presentan a continuación.

55 La diabetes mellitus es un trastorno en el que los niveles de glucosa en sangre son anormalmente altos debido a que el cuerpo no libera o usa insulina adecuadamente.

Las personas con diabetes mellitus tipo I (diabetes dependiente de insulina) producen poca insulina o en absoluto producen insulina. En diabetes tipo I, más del 90 por ciento de las células productoras de insulina (células beta) del páncreas están permanentemente destruidas. La deficiencia de insulina resultante es grave, y para sobrevivir, una persona con diabetes tipo I debe inyectarse regularmente insulina.

- 5 En diabetes mellitus tipo II (diabetes no dependiente de insulina), el cuerpo desarrolla resistencia a efectos de la insulina, produciendo una deficiencia relativa de insulina.

El páncreas tiene dos funciones principales: secretar fluido que contiene enzimas digestivas al duodeno y secretar las hormonas insulina y glucagón. La pancreatitis crónica es una inflamación de larga duración del páncreas. Eventualmente, las células secretoras de insulina del páncreas pueden destruirse, conduciendo gradualmente a diabetes. Un insulinoma es un tipo raro de tumor pancreático que secreta insulina. Los síntomas de un insulinoma resultan de bajos niveles de glucosa en sangre. Un gastrinoma es un tumor pancreático que produce excesivos niveles de la hormona gastrina, que estimula al estómago para secretar ácido y enzimas, causando úlceras pépticas. El exceso de gastrina secretada por el gastrinoma produce síntomas; llamado el síndrome de Zollinger Ellison. Un glucagonoma es un tumor que produce la hormona glucagón, que eleva el nivel de glucosa en sangre y produce un sarpullido distintivo.

La diabetes insípida es un trastorno en el que insuficientes niveles de hormona antidiurética producen excesiva sed (polidipsia) y excesiva producción de orina muy diluida (poliuria). La diabetes insípida resulta de la producción disminuida de hormona antidiurética (vasopresina).

20 El cuerpo tiene dos glándulas suprarrenales. La médula de las glándulas suprarrenales secreta hormonas tales como adrenalina (epinefrina) que afectan la tensión arterial, frecuencia cardíaca, sudoración y otras actividades también reguladas por el sistema nervioso simpático. La corteza secreta muchas hormonas diferentes, que incluyen corticosteroides (cortisona como hormonas), andrógenos (hormonas masculinas), y mineralocorticoides, que controlan la tensión arterial y los niveles de sal y potasio en el cuerpo.

25 Una de las enfermedades caracterizadas por glándulas suprarrenales hipoactivas es la enfermedad de Addison (insuficiencia corticosuprarrenal).

Varios trastornos se caracterizan por glándulas suprarrenales hiperactivas. Las causas pueden ser cambios en las propias glándulas suprarrenales o hiperestimulación por la glándula pituitaria. Ejemplos de estas enfermedades se enumeran a continuación.

30 La sobreproducción de esteroides androgénicos (testosterona y hormonas similares, conduce a virilización), la sobreproducción de corticosteroides (las causas podrían ser tumores de la pituitaria o la glándula suprarrenal, produce síndrome de Cushing), síndrome de Nelson (desarrollado por personas a las que se les han extirpado ambas glándulas suprarrenales, caracterizado por un alargamiento de la glándula pituitaria), sobreproducción de aldosterona (hiperaldosteronismo), síndrome de Conn (hiperaldosteronismo producido por un tumor), feocromocitoma (un tumor que se origina a partir de las células cromafines de la glándula suprarrenal, causando sobreproducción de catecolaminas),

35 La tiroides es una glándula pequeña localizada debajo de la nuez. Secreta hormonas tiroideas, que controlan la velocidad metabólica. La glándula tiroides atrapa yodo y lo procesa en las hormonas tiroideas. El síndrome del enfermo eutiroideo se caracteriza por falta de conversión de la forma T4 de la hormona tiroidea en la forma T3. El hipertiroidismo (glándula tiroidea hiperactiva, producción de demasiada hormona) puede tener varias causas. La tiroiditis (un inflamación de la glándula tiroides) normalmente conduce a una fase de hipertiroidismo. La inflamación puede lesionar la glándula tiroides, de manera que en etapas posteriores la enfermedad se caracteriza por hipoactividad transitoria o permanente (hipotiroidismo). Los nódulos tiroideos tóxicos (adenomas) frecuentemente producen hormona tiroidea en grandes cantidades. El bocio multinodular tóxico (enfermedad de Plummer) es un trastorno en el que hay muchos nódulos. La enfermedad de Graves (bocio difuso tóxico) se cree que se produce por un anticuerpo que estimula la tiroides para producir demasiada hormona tiroidea. En bocio nodular tóxico, uno o más nódulos en la tiroides producen demasiada hormona tiroidea y no están bajo el control de la hormona estimulante tiroidea. El hipertiroidismo secundario puede producirse (raramente) por un tumor pituitario que secreta demasiada hormona estimulante tiroidea, por resistencia de la pituitaria a hormona tiroidea, que hace que la glándula pituitaria secrete demasiada hormona estimulante tiroidea, o por una mola hidatidiforme en mujeres. La crisis hipertiroidea es una hiperactividad extrema repentina de la glándula tiroidea, es una urgencia potencialmente mortal que requiere tratamiento rápido.

40 El hipotiroidismo es una afección en la que la glándula tiroides es hipoactiva y produce demasiada poca hormona tiroidea. El hipotiroidismo muy grave se llama mixedema. En tiroiditis de Hashimoto (tiroiditis autoinmune), la glándula tiroides se alarga frecuentemente, y el hipotiroidismo se produce debido a que las áreas de funcionamiento de la glándula se destruyen gradualmente. Causas más raras de hipotiroidismo incluyen algunos trastornos heredados que son producidos por anomalías de las enzimas en células tiroideas. En otros trastornos raros, tanto el hipotálamo como

55

la glándula pituitaria dejan de secretar suficiente hormona necesaria para estimular la función normal de la tiroides.

Otros ejemplos de tiroiditis son tiroiditis linfocítica silenciosa, tiroiditis de Hashimoto o tiroiditis granulomatosa subaguda.

El cáncer de tiroides es uno cualquiera de los cuatro tipos principales de tumor maligno de la tiroides: papilar, folicular, anaplásico o medular.

5 La pituitaria es una glándula del tamaño de un guisante que está asentada sobre una estructura ósea (silla turca) en la base del cerebro. La silla turca protege la pituitaria, pero deja muy poco espacio para la expansión. Si la pituitaria se alarga, tiende a empujar hacia arriba, presionando frecuentemente sobre las áreas del cerebro que llevan señales de los ojos, produciendo posiblemente cefaleas o vista defectuosa. La glándula pituitaria tiene dos partes distintas: los lóbulos anterior (frontal) y posterior (trasero). El lóbulo anterior produce (secreta) hormonas que por último lugar controlan la función de la glándula tiroides, glándulas suprarrenales y órganos reproductores (ovarios y testículos); producción de leche (lactancia) en las mamas; y crecimiento del cuerpo en general. También produce hormonas que hacen que la piel se oscurezca y que inhiban sensaciones de dolor. El lóbulo posterior produce hormonas que regulan el equilibrio del agua, estimulan la bajada de leche de las mamas en mujeres lactantes y estimulan contracciones del útero.

15 Ejemplos de trastornos de la glándula pituitaria son síndrome de la silla vacía; hipopituitarismo (un glándula pituitaria hipoactiva); acromegalia, que es crecimiento excesivo producido por la secreción excesiva de hormona de crecimiento, que es casi siempre producida por un tumor benigno de la pituitaria (adenoma); galactorrea, que es la producción de leche de la mama en hombres o en mujeres que no están dando de mamar, en ambos sexos, la causa más común de la galactorrea es un tumor que produce prolactina (prolactinoma) en la glándula pituitaria.

20 *Trastornos neurológicos*

La LTBP2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos de cerebro: ganglios de la raíz dorsal, ganglios de la raíz dorsal, cerebelo, lóbulo occipital y médula espinal. La expresión en tejidos de cerebro demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar enfermedades del sistema nervioso. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar enfermedades del sistema nervioso.

25 Los trastornos del SNC incluyen trastornos del sistema nervioso central, además de trastornos del sistema nervioso periférico. Los trastornos del SNC incluyen, pero no se limitan a, lesiones cerebrales, enfermedades cerebrovasculares y sus consecuencias, enfermedad de Parkinson, degeneración corticobasal, enfermedad de las neuronas motoras, demencia, que incluye ELA, esclerosis múltiple, lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular, posaccidente cerebrovascular, poslesión cerebral traumática y enfermedad cerebrovascular de vasos pequeños. También se consideran que son trastornos del SNC dentro del significado de la invención demencias, tales como enfermedad de Alzheimer, demencia vascular, demencia con cuerpos de Lewy, demencia frontotemporal y parkinsonismo ligada al cromosoma 17, demencias frontotemporales, que incluyen enfermedad de Pick, parálisis nuclear progresiva, degeneración corticobasal, enfermedad de Huntington, degeneración talámica, demencia de Creutzfeldt Jakob, demencia por VIH, esquizofrenia con demencia y psicosis de Korsakoff.

35 Similarmente, también se consideran que son trastornos del SNC trastornos cognitivos relacionados, tales como deterioro cognitivo leve, deterioro de la memoria asociado a la edad, disminución cognitiva relacionada con la edad, deterioro cognitivo vascular, trastornos por déficit de atención, trastornos por déficit de atención e hiperactividad, y trastornos de la memoria en niños con dificultades del aprendizaje.

40 El dolor, dentro del significado de la invención, también se considera que es un trastorno del SNC. El dolor puede asociarse a trastornos del SNC, tales como esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, ciática, síndrome de cirugía fallida de la espalda, lesión cerebral traumática, epilepsia, enfermedad de Parkinson, posaccidente cerebrovascular y lesiones vasculares en el cerebro y la médula espinal (por ejemplo, infarto, hemorragia, malformación vascular). El dolor neuropático no central incluye el asociado a dolor posmastectomía, sensación fantasma, distrofia simpática refleja (DSR), neuralgia del trigémino, radiculopatía, dolor posquirúrgico, dolor relacionado con VIH/SIDA, dolor por cáncer, neuropatías metabólicas (por ejemplo, neuropatía diabética, neuropatía vasculítica secundaria a enfermedad de tejido conjuntivo), polineuropatía paraneoplásica asociada, por ejemplo, a carcinoma de pulmón, o leucemia, o linfoma, o carcinoma de próstata, colon o estómago, neuralgia del trigémino, neuralgias craneales y neuralgia posherpética. El dolor asociado a lesión nerviosa periférica, dolor central (es decir, debido a isquemia cerebral) y diverso dolor crónico, es decir, lumbago, dolor de espalda (dolor de la espalda baja), dolor inflamatorio y/o reumático. También son trastornos del SNC dolor por cefalea (por ejemplo, migraña con aura, migraña sin aura, y otros trastornos de migraña), cefalea tipo tensión episódica y crónica, cefalea similar a tipo tensión, cefalea en brotes y hemicránea paroxística crónica. El dolor visceral tal como pancreatitis, cistitis intestinal, dismenorrea, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, cólico biliar, cólico ureteral, infarto de miocardio y síndromes de dolor de la cavidad pélvica, por ejemplo, vulvodinia, orquialgia, síndrome uretral y protatodinia también son trastornos del SNC. También se consideran que son un trastorno del sistema nervioso dolor agudo, por ejemplo, dolor posoperatorio y dolor después de traumatismo.

Trastornos urológicos

La LTBP2 humana se expresa altamente en los siguientes tejidos urológicos: ganglios de la raíz dorsal, próstata, vejiga, riñón, tumor de riñón. La expresión en los tejidos anteriormente mencionados demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar trastornos urológicos. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar trastornos urológicos.

La LTBP2 humana se expresa altamente en tejido de ganglio de la raíz dorsal. La expresión en ganglios de la raíz dorsal demuestra que la LTBP2 humana o ARNm puede utilizarse para diagnosticar incontinencia como trastorno urológico. Los ganglios de la raíz dorsal participan en la regulación neuronal del aparato urológico. Adicionalmente, la actividad de la LTBP2 humana puede modularse para tratar, pero no se limita a, incontinencia.

Los trastornos genitourológicos comprenden trastornos benignos y malignos de los órganos que constituyen el aparato genitourológico de mujeres y hombres, enfermedades renales como insuficiencia renal aguda o crónica, enfermedades renales inmunológicamente mediadas como rechazo de trasplante renal, nefritis lúpica, enfermedades renales de complejo inmune, glomerulopatías, nefritis, nefropatía tóxica, uropatías obstructivas como hiperplasia prostática benigna (HPB), síndrome de la vejiga neurogénica, incontinencia urinaria como incontinencia imperiosa, de esfuerzo o por rebosamiento, dolor pélvico y disfunción eréctil.

Aplicaciones

La presente invención proporciona LTBP2 para procedimientos profilácticos, terapéuticos y de diagnóstico para enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas.

El procedimiento regulador de la invención implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más de las actividades de LTBP2. Un agente que modula actividad puede ser un agente como se describe en el presente documento, tal como un ácido nucleico o una proteína, un ligando relacionado que se produce naturalmente del polipéptido, un péptido, un peptidomimético, o cualquier molécula pequeña. En una realización, el agente estimula una o más de las actividades biológicas de LTBP2. Ejemplos de tales agentes estimulantes incluyen la LTBP2 activa y moléculas de ácidos nucleicos que codifican una parte de LTBP2. En otra realización, el agente inhibe una o más de las actividades biológicas de LTBP2. Ejemplos de tales agentes inhibidores incluyen moléculas de ácidos nucleicos antisentido y anticuerpos. Estos procedimientos reguladores pueden realizarse *in vitro* (por ejemplo, cultivando la célula con el agente) o, alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, administrando el agente a un sujeto). Como tal, la presente invención proporciona procedimientos para tratar un individuo aquejado de una enfermedad o trastorno caracterizado por expresión o actividad no deseada de LTBP2 o una proteína en la ruta de señalización de LTBP2. En una realización, el procedimiento implica administrar un agente como cualquier agente identificado o que sea identificable por un ensayo de cribado como se describe en el presente documento, o combinación de tales agentes que modulan, por ejemplo, regulan por incremento o regulan por disminución, la expresión o actividad de LTBP2 o de cualquier proteína en la ruta de señalización de LTBP2. En otra realización, el procedimiento implica administrar un regulador de LTBP2 como terapia para compensar la expresión o actividad reducida o no deseablemente baja de LTBP2 o una proteína en la ruta de señalización de LTBP2.

Se desea la estimulación de actividad o expresión de LTBP2 en situaciones en las que la actividad enzimática o expresión sea anormalmente baja y en las que sea probable que elevada actividad tenga un efecto beneficioso. En cambio, la inhibición de la actividad enzimática o expresión de LTBP2 se desea en situaciones en las que la actividad o expresión de LTBP2 sea anormalmente alta y en la que sea probable que la disminución de su actividad tenga un efecto beneficioso.

La presente invención proporciona el uso de ARNm de LTBP2 como biomarcador para insuficiencia cardíaca congestiva.

La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos.

45 Composiciones farmacéuticas

La presente invención se refiere adicionalmente a novedosos agentes identificados por los ensayos de cribado anteriormente descritos y a usos de los mismos para los tratamientos como se describen en el presente documento.

Las moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos (también denominadas en el presente documento "compuestos activos") de la invención pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Tales composiciones normalmente comprenden la molécula de ácido nucleico, proteína o anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la

administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto en tanto que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

5 La invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un regulador de la expresión o actividad de LTBP2 (y/o un regulador de la actividad o expresión de una proteína en la ruta de señalización de LTBP2), además de procedimientos para preparar tales composiciones combinando uno o más de tales reguladores y un vehículo farmacéuticamente aceptable. También están dentro de la invención composiciones farmacéuticas que comprenden un regulador identificado usando los ensayos de cribado de la invención envasado con instrucciones para su uso. Para reguladores que son antagonistas de la actividad de LTBP2 o que reducen la expresión de LTBP2, las instrucciones especificarían el uso de la composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas. Para reguladores que son agonistas de la actividad de LTBP2 o aumentan la expresión de LTBP2, las instrucciones especificarían el uso de la composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas.

Un inhibidor de LTBP2 puede producirse usando procedimientos que son generalmente conocidos en la técnica. En particular, LTBP2 purificada puede usarse para producir anticuerpos o para cribar bibliotecas de agentes farmacéuticos para identificar aquellos que se unen específicamente a LTBP2. Los anticuerpos para LTBP2 también pueden generarse usando procedimientos que son muy conocidos en la técnica. Tales anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios, fragmentos Fab y fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab. Anticuerpos neutralizantes como aquellos que inhiben la formación de dímeros son especialmente preferidos para uso terapéutico.

En otra realización de la invención, los polinucleótidos que codifican LTBP2, o cualquier fragmento o complemento de los mismos, pueden usarse para fines terapéuticos. En un aspecto, el complemento del polinucleótido que codifica LTBP2 puede usarse en situaciones en las que se desearía bloquear la transcripción del ARNm. En particular, las células pueden transformarse con secuencias complementarias a polinucleótidos que codifican LTBP2. Así, pueden usarse moléculas o fragmentos complementarios para modular la actividad de LTBP2, o para lograr la regulación de la función génica. Tal tecnología es ahora muy conocida en la técnica, y pueden diseñarse oligonucleótidos sentido o antisentido o fragmentos más grandes a partir de diversas localizaciones a lo largo de las regiones codificantes o de control de secuencias que codifican LTBP2.

Pueden usarse vectores de expresión derivados de retrovirus, adenovirus o herpes, o virus de la variolovacuna, o de diversos plásmidos bacterianos, para la administración de secuencias de nucleótidos al órgano, tejido o población de células elegidos como diana. Pueden usarse procedimientos que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia para construir vectores que expresarán secuencia de ácidos nucleicos complementaria a los polinucleótidos del gen que codifica LTBP2. Estas técnicas se describen, por ejemplo, en [Scott y Smith (1990)].

Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos anteriormente puede aplicarse a cualquier sujeto en necesidad de tal terapia, que incluye, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos, y lo más preferentemente, seres humanos.

40 Una realización adicional de la invención se refiere a la administración de una composición farmacéutica que contiene LTBP2 conjuntamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para cualquiera de los efectos terapéuticos tratados anteriormente. Tales composiciones farmacéuticas puede consistir en LTBP2, anticuerpos para LTBP2, y miméticos, agonistas, antagonistas o inhibidores de LTBP2. Las composiciones pueden administrarse solas o en combinación con al menos otro agente, tal como un compuesto estabilizante, que puede administrarse en cualquier vehículo farmacéutico biocompatible estéril que incluye, pero no se limita a, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa y agua. Las composiciones pueden administrarse a un paciente solas, o en combinación con otros agentes, fármacos u hormonas.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para ser compatible con su vía de administración prevista. Ejemplos de vías de administración incluyen parenteral, por ejemplo, administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Disoluciones o suspensiones usadas para administración parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminetetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales de

múltiples dosis hechos de vidrio o plástico.

Composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones acuosas estériles (siendo solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa, vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EM™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el punto de que exista fácil jeringabilidad. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, un poliol farmacéuticamente aceptable como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede provocarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Pueden prepararse disoluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los procedimientos preferidos de preparación son secado a vacío y liofilización que da un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración de la misma.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Con el fin de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un vehículo fluido para su uso como enjuague bucal, en las que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se enjuaga y expectora o se traga.

Pueden incluirse aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de una naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente de disgregación tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un aromatizante tal como menta, salicilato de metilo, o aromatizante de naranja.

Para administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de un spray de aerosol de un recipiente presurizado o dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosa o transdérmicos. Para administración transmucosa o transdérmica se usan penetrantes apropiados a la barrera que va a atravesarse en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede llevarse a cabo mediante el uso de sprays nasales o supositorios. Para administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables tales como etilenoacetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas elegidos como diana para células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también pueden usarse como vehículos farmacéuticamente aceptables. Éstos pueden prepararse según procedimientos conocidos para aquellos expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en el documento U.S. 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma unitaria de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que va a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la invención están dictadas por y son directamente dependientes de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que va a lograrse, y las limitaciones inherentes en la materia de la combinación de un compuesto activo tal para el tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un recipiente, envase o dispensador junto con instrucciones para administración. Para composiciones farmacéuticas que incluyen un antagonista de la actividad de LTBP2, un compuesto que reduce la expresión de LTBP2 o un compuesto que reduce la expresión o actividad de una proteína en la ruta de señalización de LTBP2 o cualquier combinación de los mismos, las instrucciones para administración especificarán el uso de la composición para enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas. Para composiciones farmacéuticas que incluyen un agonista de la actividad de LTBP2, un compuesto que aumenta la expresión de LTBP2, o un compuesto que aumenta la expresión o actividad de una proteína en la ruta de señalización de LTBP2 o cualquier combinación de los mismos, las instrucciones para administración especificarán el uso de la composición para enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas.

Diagnóstico

Una realización de la invención describe LTBP2 como biomarcador para uso diagnóstico.

El uso de LTBP2 como biomarcador en diagnóstico se basa en la comparación del nivel de LTBP2 en una muestra biológica de un mamífero enfermo con el nivel de LTBP2 en una muestra de control de un mamífero sano o normal. Si el nivel de LTBP2 en el mamífero enfermo se diferencia del nivel de LTBP2 en un mamífero normal o sano, entonces el mamífero enfermo se diagnostica con una enfermedad asociada a un nivel de LTBP2 alterado. Además, el comparar niveles de LTBP2 de una muestra biológica de un mamífero enfermo con niveles de LTBP2 de muestras de control de mamíferos con una enfermedad asociada a LTBP2 ya diagnosticada con diferentes etapas o gravedad de dicha enfermedad permite el diagnóstico de una enfermedad asociada a LTBP2 de dicho primer mamífero enfermo y especificar la gravedad de la enfermedad asociada a LTBP2. La muestra biológica se toma de tejido o fluido corporal análogo al de la muestra de control.

Se establecen valores normales o patrón para la expresión de LTBP2 usando muestras de control de sujetos mamíferos sanos o enfermos. Una muestra de control puede obtenerse recogiendo fluidos corporales separados o combinados o extractos celulares tomados de sujetos mamíferos normales, preferentemente humanos, alcanzando números relevantes estadísticos. Para obtener el nivel de LTBP2 normal o patrón de las muestras de control, las muestras se sometieron a procedimientos de detección adecuados para detectar polipéptido, polinucleótido o actividad de LTBP2. La determinación del nivel de LTBP2 en un mamífero sometido a diagnóstico se realiza análogamente recogiendo una muestra biológica de dicho mamífero. Cantidades de niveles de LTBP2 en muestras biológicas de un mamífero sometido a diagnóstico se comparan con los valores patrón o normales medidos de una muestra de control. La desviación entre el valor patrón (determinado de muestra de control) y el valor objeto (determinado de muestra biológica) establece los parámetros para diagnosticar enfermedad. La cuantificación absoluta de niveles de LTBP2 medidos a partir de muestras biológicas o de control puede lograrse comparando aquellos valores con valores obtenidos de un experimento en el que se usa una cantidad conocida de un polipéptido sustancialmente purificado.

Los anticuerpos que se unen específicamente a LTBP2 pueden usarse para el diagnóstico de trastornos caracterizados por la expresión del biomarcador LTBP2, o en ensayos de diagnóstico para monitorizar pacientes que están tratándose consiguiendo orientación para terapia para una enfermedad tal. Un tratamiento tal incluye medicación adecuada para tratar una enfermedad tal, y tratamiento con polipéptidos o polinucleótidos de LTBP2, o agonistas, antagonistas e inhibidores de LTBP2. Anticuerpos útiles para fines de diagnóstico pueden prepararse del mismo modo que aquellos descritos anteriormente para terapéuticos. Los ensayos de diagnóstico para LTBP2 incluyen procedimientos que utilizan el anticuerpo y una marca para detectar LTBP2 en fluidos del cuerpo humano o en extractos de células o tejidos. Los anticuerpos pueden usarse con o sin modificación, y pueden marcarse por enlace covalente o no covalente con una molécula indicadora. Una amplia variedad de moléculas indicadoras, varias de las cuales se describen anteriormente, se conocen en la técnica y pueden usarse.

Una variedad de protocolos para medir LTBP2, que incluyen ELISA, RIA, tecnología de guía de onda plana y FACS, se conocen en la técnica y proporcionan una base para diagnosticar niveles alterados o anormales de la expresión de LTBP2. Los bioensayos de tecnología de guía de onda plana se diseñan para realizar ensayos de hibridación de ácidos nucleicos multiplexados, reacciones de inmunoafinidad y ensayos basados en receptores con alta sensibilidad y selectividad. Los elementos de reconocimiento específicos para los análisis de interés se unen sobre la superficie en

pequeños puntos discretos; la transferencia de los elementos de reconocimiento sobre la superficie se realiza usando una tecnología de aplicación de puntos adecuada que requiere solo minúsculas cantidades de elementos de reconocimiento. Una disposición tal de diferentes elementos de reconocimiento en un formato de matriz permite la detección y cuantificación simultánea de cientos a miles de diferentes analitos por muestra, incluyendo duplicados.

5 Las reacciones sobre micromatrices normalmente siguen un esquema típico:

Los elementos de reconocimiento (por ejemplo, oligonucleótidos, ADNc o anticuerpos) se aplican en puntos sobre la superficie de guía de onda plana químicamente modificada con diámetros de punto típicos de 100 - 200 μm . Los restantes sitios de unión libres sobre una superficie están siendo posteriormente bloqueados para reducir o eliminar la unión no específica. En una siguiente etapa, la muestra (por ejemplo, ADNc fluorescentemente marcado o complejo de analito pre-incubado / anticuerpo fluorescentemente marcado) se transfiere sobre la superficie para incubación. El tiempo de incubación en el que se produce un reconocimiento selectivo y unión entre elementos de reconocimiento y moléculas diana correspondientes (por ejemplo, hibridación de ADN - ADN o interacción antígeno - anticuerpo) depende de la afinidad entre los analitos y los elementos de reconocimiento inmovilizados. Los puntos fluorescentes resultantes pueden entonces detectarse durante la ultralectura.

10 Debido a la obtención de imágenes lateralmente resueltas de las señales de fluorescencia de las manchas individuales por una cámara de CCD, simultáneamente puede cuantificarse una gran variedad de diferentes analitos, que normalmente requieren volúmenes de muestra en el intervalo de 15 μl . La calibración y los puntos de referencia permiten la precisa cuantificación de analitos usando solo un chip y permiten el establecimiento de respuesta a dosis y de actividad dependiente del tiempo [Pawlak (2002), Duveneck (2002)].

15 Valores normales o patrón para la expresión de LTBP2 se establecen usando muestras de control de sujetos mamíferos sanos o enfermos. Una muestra de control puede obtenerse recogiendo fluidos corporales separados o combinados o extractos celulares tomados de sujetos mamíferos normales, preferentemente humanos, alcanzando números relevantes estadísticos. Para obtener valores normales o patrón, las muestras de control se combinan con un anticuerpo para LTBP2 en condiciones adecuadas para la formación de complejos. La cantidad de formación de complejos patrón puede cuantificarse por diversos procedimientos, preferentemente por medios fotométricos. La determinación del nivel de LTBP2 en un mamífero sometido a diagnóstico se realiza análogamente recogiendo una muestra biológica de dicho mamífero, combinando dicha muestra con un anticuerpo para LTBP2 y determinando la formación de complejos. Las cantidades de LTBP2 expresadas en muestras biológicas de un mamífero sometido a diagnóstico se comparan con los valores patrón o normales medidos de una muestra de control. La desviación entre el valor patrón (determinado de muestra de control) y el valor objeto (determinado de muestra biológica) establece los parámetros para diagnosticar enfermedad. La cuantificación absoluta de niveles de LTBP2 medidos a partir de muestras biológicas o de control puede lograrse comparando aquellos valores con valores obtenidos de un experimento en el que se usa una cantidad conocida de un polipéptido sustancialmente purificado.

20 En otra realización de la invención, los polinucleótidos que codifican LTBP2 pueden usarse para fines de diagnóstico. Los polinucleótidos que pueden usarse incluyen secuencias de oligonucleótidos, ARN complementario y moléculas de ADN, y PNA. Los polinucleótidos pueden usarse para detectar y cuantificar la expresión génica en muestras de control y biológicas en las que la expresión del biomarcador LTBP2 puede correlacionarse con enfermedad. El ensayo de diagnóstico puede usarse para distinguir entre ausencia, presencia y exceso de expresión de LTBP2, y para monitorizar la regulación de niveles de LTBP2 durante la intervención terapéutica.

25 Las secuencias de polinucleótidos que codifican LTBP2 pueden usarse para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas asociadas a expresión de LTBP2. Las secuencias de polinucleótidos que codifican LTBP2 puede usarse en análisis Southern, Northern o de transferencia por puntos, u otras tecnologías basadas en membrana; en tecnologías de PCR; en varilla de medición, aguja y ensayos de ELISA; bDNA (tecnología de ADN ramificado) y tecnología de guías de onda plana; y en micromatrices que utilizan una muestra biológica de mamíferos enfermos para detectar la expresión de LTBP2 alterada. Tales procedimientos cualitativos o cuantitativos son muy conocidos en la técnica.

30 En un aspecto particular, las secuencias de nucleótidos que codifican LTBP2 pueden ser útiles en ensayos que detectan la presencia de trastornos asociados, particularmente aquellos mencionados anteriormente. Las secuencias de nucleótidos que codifican LTBP2 pueden marcarse mediante procedimientos convencionales y añadirse a una muestra biológica de mamíferos enfermos en condiciones adecuadas para la formación de complejos de hibridación. Después de un periodo de incubación adecuado, la muestra se lava y la señal se cuantifica y se compara con un valor patrón. Si la cantidad de señal en la muestra de paciente está alterada de la de una muestra de control comparable, las secuencias de nucleótidos se han hibridado con secuencias de nucleótidos en la muestra, y la presencia de niveles alterados de secuencias de nucleótidos que codifican LTBP2 en la muestra indica la presencia del trastorno asociado. Tales ensayos también pueden usarse para evaluar la eficacia de una pauta de tratamiento terapéutico particular en estudios animales, en ensayos clínicos, o en monitorizar el tratamiento de un paciente individual.

Con el fin de proporcionar una base para el diagnóstico de enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas asociadas a expresión de LTBP2, se establece un perfil normal o patrón para la expresión. Esto puede llevarse a cabo combinando fluidos corporales o extractos celulares tomados de sujetos normales, tanto animales como humanos, con una secuencia, o un fragmento de la misma, que codifica LTBP2, en condiciones adecuadas para hibridación o amplificación. La cuantificación de niveles de LTBP2 medida a partir de muestras biológicas o de control puede lograrse comparando aquellos valores con valores obtenidos de un experimento en el que se usa una cantidad conocida de un polinucleótido sustancialmente purificado. Valor patrón obtenidos de muestras normales pueden compararse con valores obtenidos de muestras de pacientes que son sintomáticos para un trastorno. La desviación de valores patrón se usa para establecer la presencia de un trastorno.

Biomarcador

Uso de LTBP2 como biomarcador

Un experto habitual en la materia conoce varios procedimientos y dispositivos para la detección y análisis de los marcadores de la presente invención. Con respecto a polipéptidos o proteínas en muestras de prueba de pacientes, frecuentemente se usan dispositivos y procedimientos de inmunoensayo. Estos dispositivos y procedimientos pueden utilizar moléculas marcadas en diversos formatos de ensayo de sándwich, competitivos o no competitivos, para generar una señal que está relacionada con la presencia o cantidad de un analito de interés. Adicionalmente, ciertos procedimientos y dispositivos, tales como biosensores e inmunoensayos ópticos, pueden emplearse para determinar la presencia o cantidad de analitos sin la necesidad de una molécula marcada.

Preferentemente, los marcadores se analizan usando un inmunoensayo, aunque otros procedimientos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia (por ejemplo, la medición de niveles de ARN marcador). La presencia o cantidad de un marcador se determina generalmente usando anticuerpos específicos para cada marcador y detectando unión específica. Puede utilizarse cualquier inmunoensayo adecuado, por ejemplo, inmunoensayos ligados a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayos de unión competitiva, tecnología de guía de onda plana, y similares. La unión inmunológica específica del anticuerpo al marcador puede detectarse directamente o indirectamente. Marcas directas incluyen marcas fluorescentes o luminiscentes, metales, colorantes, radionúclidos y similares, unidos al anticuerpo. Las marcas indirectas incluyen diversas enzimas muy conocidas en la técnica, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y similares. Para un ejemplo de cómo este procedimiento se lleva a cabo en una máquina puede usarse el dispositivo de RAMP Biomedical llamado Clinical Reader sup™, que usa el procedimiento de marca fluorescente, aunque el experto conocerá muchas máquinas diferentes y protocolos manuales para realizar el mismo ensayo. Se aplica sangre completa diluida al pocillo de muestra. Los glóbulos rojos son retenidos en la almohadilla de muestra, y el plasma separado migra a lo largo de la tira. Partículas de látex teñidas de fluorescente se unen al analito y se inmovilizan en la zona de detección. Partículas adicionales se inmovilizan en la zona de control interno. La fluorescencia de las zonas de detección y control interno se miden en el Reader sup™ de RAMP Clinical, y la relación entre estos valores se calcula. Esta relación se usa para determinar la concentración de analito por interpolación de una curva patrón específica del lote suministrada por el fabricante en cada kit de prueba para cada ensayo.

El uso de anticuerpos inmovilizados específicos para los marcadores también se contempla por la presente invención y es muy conocido por un experto habitual en la materia. Los anticuerpos podrían inmovilizarse sobre una variedad de soportes sólidos, tales como partículas de matriz magnética o cromatográfica, la superficie de un sitio de ensayo (tal como pocillos de microtitulación), trozos de un material de sustrato sólido (tal como plástico, nailon, papel), y similares. Una tira de ensayo podría prepararse recubriendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre soporte sólido. Esta tira podría entonces sumergirse en la muestra de prueba y luego procesarse rápidamente mediante lavados y etapas de detección para generar una señal medible, tal como un punto coloreado.

El análisis de una pluralidad de marcadores puede llevarse a cabo por separado o simultáneamente con una muestra de prueba. Varios marcadores pueden combinarse en una prueba para el eficiente procesamiento de múltiples muestras. Además, un experto en la materia reconocería el valor de probar múltiples muestras (por ejemplo, en momentos de tiempo sucesivos) del mismo individuo. Tal prueba de muestras en serie permitirá la identificación de cambios en niveles de marcador con el tiempo. El aumento o disminución en niveles de marcador, además de la ausencia de cambio en niveles de marcador, proporcionaría información útil sobre el estado de enfermedad que incluye, pero no se limita a, identificar el momento aproximado de la aparición del evento, la presencia y cantidad de tejido salvable, la idoneidad de terapias de fármaco, la eficacia de diversas terapias, identificación de la gravedad del evento, identificación de la gravedad de la enfermedad e identificación del desenlace del paciente, que incluye riesgo de futuros eventos.

Un ensayo que consiste en una combinación de los marcadores referenciados en la presente invención puede construirse para proporcionar información relevante relacionada con diagnóstico diferencial. Un panel tal puede construirse usando 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, o más o marcadores individuales. El análisis de un único

marcador o subconjuntos de marcadores que comprenden un mayor panel de marcadores podría llevarse a cabo por procedimientos descritos dentro de la presente invención para optimizar la sensibilidad o especificidad clínica en diversos entornos clínicos.

5 El análisis de marcadores también podría llevarse a cabo en una variedad de formatos físicos. Por ejemplo, el uso de placas de microtitulación o automatización podría usarse para facilitar el procesamiento de grandes números de muestras de prueba. Alternativamente, podrían desarrollarse formatos de muestras individuales para facilitar el tratamiento y diagnóstico inmediato de un modo preciso, por ejemplo, en entornos de transporte ambulatorio o de sala de urgencias. Formatos físicos particularmente útiles comprenden superficies que tienen una pluralidad de localizaciones direccionables discretas para la detección de una pluralidad de diferentes analitos. Tales formatos incluyen micromatrices de proteínas, o "chips de proteínas" y dispositivos capilares.

15 Los marcadores cardíacos sirven de función importante en la detección temprana y monitorización de enfermedad cardiovascular. Los marcadores de enfermedad son normalmente sustancias encontradas en una muestra corporal que pueden medirse fácilmente. La cantidad medida puede correlacionarse con patofisiología de enfermedad subyacente, presencia o ausencia de un evento cardíaco actual o inminente, probabilidad de un evento cardíaco en el futuro. En pacientes que reciben tratamiento para su afección, la cantidad medida también se correlacionará con sensibilidad a terapia. Los marcadores pueden incluir niveles elevados de tensión arterial, colesterol, azúcar en sangre, homocisteína y proteína C reactiva (CRP). Sin embargo, los presentes marcadores, incluso en combinación con otras mediciones o factores de riesgo, no identifican adecuadamente pacientes en riesgo, con exactitud detectan eventos (es decir, infartos de miocardio), o se correlacionan con terapia. Por ejemplo, la mitad de los pacientes no tienen elevado colesterol en suero u otros factores de riesgo tradicionales.

20 El uso de marcadores en el diagnóstico de afecciones cardíacas se describe en, por ejemplo, Alpert y col. (2000); Newby y col. (2001); de Lemos y col.(2002); Boersma y col. (2002); Christenson y col. (2001).

Biomarcador cardiovascular

BNP (como ejemplo de biomarcadores cardiovasculares)

25 El péptido natriurético tipo B (BNP), también llamado péptido natriurético tipo cerebro, es un péptido de 4 kDa de 32 aminoácidos que participa en el sistema de natriuresis para regular la tensión arterial y el equilibrio de fluidos. El precursor para BNP se sintetiza como una molécula de 108 aminoácidos, denominada "pre pro BNP", que se procesa proteolíticamente en un péptido del extremo N de 76 aminoácidos (aminoácidos 1-76), denominado "NT pro BNP", y la hormona madura de 32 aminoácidos, denominada BNP o BNP 32 (aminoácidos 77-108). Se ha sugerido que cada una de estas especies --NT pro-BNP, BNP-32 y pre pro BNP-- puede circular en plasma humano. Las 2 formas, pre pro BNP y NT pro BNP, y péptidos que se derivan de BNP, pre pro BNP y NT pro BNP y que están presentes en la sangre como resultado de la proteólisis de BNP, NT pro BNP y pre pro BNP, se describen conjuntamente como marcadores relacionados con o asociados a BNP. La degradación proteolítica de BNP y de péptidos relacionados con BNP también se ha descrito en la bibliografía y estos fragmentos proteolíticos también están englobados por el término "péptidos relacionados con BNP". Los péptidos relacionados con BNP y BNP se encuentran predominantemente en los gránulos secretorios de los ventrículos cardíacos, y son liberados del corazón en respuesta a tanto expansión del volumen ventricular como sobrecarga de presión. Las elevaciones de BNP están asociadas a elevadas presiones de enclavamiento auriculares y pulmonares, reducida función sistólica y diastólica ventricular, hipertrofia ventricular izquierda e infarto de miocardio [Sagnella, (1998)]. Además, hay numerosos informes de elevada concentración de BNP asociada a insuficiencia cardíaca congestiva e insuficiencia renal. Aunque es probable que los péptidos relacionados con BNP y BNP no sean específicos para ACS, pueden ser marcadores sensibles de ACS debido a que pueden indicar no solo lesión celular debida a isquemia, sino también una perturbación del sistema natriurético asociada a ACS. El término "BNP" como se usa en el presente documento se refiere a la propia molécula de BNP madura de 32 aminoácidos. Sin embargo, como reconocerá el experto, otros marcadores relacionados con BNP también pueden servir de indicadores de diagnóstico o pronóstico en pacientes con ACS. Por ejemplo, BNP se sintetiza como una molécula pre pro-BNP de 108 aminoácidos que se procesa proteolíticamente en una molécula de "NT pro BNP" de 76 aminoácidos y de BNP de 32 aminoácidos. Debido a su relación con BNP, la concentración de la molécula de NT pro-BNP también puede proporcionar información de diagnóstico o pronóstico en pacientes. El término "marcador relacionado con BNP o péptido relacionado con BNP" se refiere a cualquier polipéptido que se origine a partir de la molécula de pre pro-BNP, distinto de la propia molécula de BNP de 32 aminoácidos. Así, un marcador relacionado con o asociados a BNP incluye la molécula de NT pro-BNP, el dominio pro, un fragmento de BNP que es más pequeño que la secuencia entera de 32 aminoácidos, un fragmento de pre pro-BNP distinto de BNP y un fragmento del dominio pro.

Clases de biomarcadores

55 LTBP2 podría usarse como biomarcador para enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en diferentes clases:

Biomarcador de enfermedad: un biomarcador que se refiere a un desenlace clínico o medida de enfermedad.

Biomarcador de eficacia: un biomarcador que refleja el efecto beneficioso de un tratamiento dado.

Biomarcador de estadificación: un biomarcador que distingue entre diferentes etapas de un trastorno crónico.

5 Biomarcador sustituto: un biomarcador que se considera un sustituto válido para una medida de desenlace clínico.

Biomarcador de toxicidad: un biomarcador que informa de un efecto toxicológico de un fármaco en un sistema *in vitro* o *in vivo*.

Biomarcador de mecanismo: un biomarcador que informa de un efecto aguas abajo de un fármaco.

Biomarcador diana: un biomarcador que informa de la interacción del fármaco con su diana.

10 Una realización de la descripción es un procedimiento de uso de LTBP2 como biomarcador para una enfermedad que comprende:

(a) obtener una muestra biológica de un mamífero,

(b) medir el nivel de LTBP2 en la muestra biológica,

(c) obtener una muestra de control de un mamífero,

15 (d) medir el nivel de LTBP2 en la muestra de control,

(e) comparar el nivel de LTBP2 en la muestra biológica con el nivel de LTBP2 en una muestra de control, y

(f) diagnosticar una enfermedad basada en el nivel de LTBP2 de la muestra biológica en comparación con la muestra de control.

20 La muestra biológica en la etapa (a) de los procedimientos es en una realización preferida una muestra biológica que comprende un grupo de muestras que consiste en una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de tejido, una muestra de mucosa oral, una muestra de saliva, una muestra de fluido intersticial o una muestra de orina. La muestra de sangre es, por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de sangre fraccionada, una muestra de plaquetas, una muestra de neutrófilos, una muestra de leucocitos, una muestra de glóbulos blancos, una muestra de monocitos, una muestra de glóbulos rojos, una muestra de granulocitos y una
25 muestra de eritrocitos. Una muestra de tejido es, por ejemplo, una muestra recogida de músculo, adiposo, corazón o piel.

30 En una realización preferida, LTBP2 se usa como biomarcador que diagnostica una enfermedad que está asociada a niveles de LTBP2 alterados. Otra realización preferida, LTBP2 se usa como biomarcador para identificar un riesgo individual de desarrollar una enfermedad, o para predecir un desenlace adverso en un paciente diagnosticado con una enfermedad.

35 El uso de LTBP2 como biomarcador de enfermedad en diagnóstico se basa en la comparación del nivel de LTBP2 en una muestra biológica de un mamífero enfermo con el nivel de LTBP2 en una muestra de control de un mamífero sano o normal o un grupo de mamíferos sanos o normales. Si el nivel de LTBP2 en el mamífero enfermo se diferencia del nivel de LTBP2 en un mamífero normal o sano, entonces el mamífero enfermo se diagnostica con una enfermedad asociada a nivel de LTBP2 alterado.

Además, usando LTBP2 como biomarcador de estadificación, los niveles de LTBP2 de un mamífero enfermo se comparan con niveles de LTBP2 de un mamífero con una enfermedad asociada a LTBP2 ya diagnosticada con diferentes estados de gravedad de dicha enfermedad, permite el diagnóstico de dicho primer mamífero enfermo especificando la gravedad de la enfermedad asociada a LTBP2.

40 Una muestra de control puede ser una muestra tomada de un mamífero. Una muestra de control puede ser una muestra previamente tomada de un mamífero, ya que un nivel de LTBP2 en una muestra de control puede ser un nivel de LTBP2 predeterminado medido en una muestra previamente tomada. El nivel de LTBP2 en una muestra de control o en una muestra biológica puede determinarse, por ejemplo, como un valor relativo y como un valor absoluto. Un nivel de LTBP2 previamente medido de una muestra de control puede guardarse, por ejemplo, en una base de datos, en una
45 publicación de internet, en una forma electrónicamente accesible, en una publicación. Comparando el nivel de LTBP2 de una muestra biológica con una muestra de control pueden compararse valores relativos o valores cuantificados absolutos.

Otra realización es un procedimiento de uso de LTBP2 como biomarcador para guiar una terapia de una enfermedad

que comprende:

- (a) obtener un nivel inicial de LTBP2 en muestra biológica de un mamífero enfermo,
- (b) administrar al mamífero enfermo un tratamiento para la enfermedad,
- (c) obtener una o más muestras biológicas posteriores del mamífero enfermo
- 5 (d) medir el nivel de LTBP2 en la una o más muestras biológicas posteriores,
- (e) comparar el nivel de LTBP2 en la una o más muestras biológicas posteriores con la muestra inicial, y
- (f) determinar si dosificaciones elevadas, tratamientos adicionales o alternativos son necesarios o no basándose en niveles de LTBP2 obtenidos de una o más muestras biológicas posteriores con respecto al nivel de LTBP2 inicial.

10 En una realización preferida, LTBP2 se usa como biomarcador para guiar una terapia en una enfermedad que está asociada a niveles de LTBP2 alterados.

El uso de LTBP2 como biomarcador del criterio de valoración de enfermedad, eficacia o sustituto en diagnóstico se basa en la comparación del nivel de LTBP2 en una muestra biológica de un mamífero enfermo antes del tratamiento (el nivel de muestra inicial) con el nivel de LTBP2 en muestras posteriores de dicho mamífero que recibe un tratamiento para la enfermedad. Si el nivel de LTBP2 en la muestra inicial se diferencia del nivel de LTBP2 en las posteriores muestras, entonces la terapia puede considerarse satisfactoria. Si el nivel de LTBP2 en la muestra inicial no se diferencia o se diferencia solo ligeramente del nivel de LTBP2 en las posteriores muestras, entonces la terapia puede considerarse no satisfactoria. Si la terapia se considera no satisfactoria, pueden considerarse elevadas dosificaciones de la misma terapia, repetición de la misma terapia o un tratamiento alternativo que sea diferente de la primera terapia.

20 La muestra biológica en la etapa (a) de los procedimientos es en una realización preferida una muestra biológica que comprende un grupo de muestras que consiste en una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de suero, una muestra de tejido, una muestra de mucosa oral, una muestra de saliva, una muestra de fluido intersticial o una muestra de orina. La muestra de sangre es, por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de sangre fraccionada, una muestra de plaquetas, una muestra de neutrófilos, una muestra de leucocitos, una muestra de glóbulos blancos, una muestra de monocitos, una muestra de glóbulos rojos, una muestra de granulocitos y una muestra de eritrocitos. Una muestra de tejido es, por ejemplo, una muestra recogida de músculo, adiposo, corazón o piel.

En una realización preferida, el nivel de LTBP2 se determina determinando el nivel de polinucleótido de LTBP2.

En otra realización preferida, el nivel de LTBP2 se determina determinando el nivel de polipéptido de LTBP2.

30 En otra realización preferida, el nivel de LTBP2 se determina determinando el nivel de actividad de LTBP2.

En una realización preferida, la enfermedad asociada a LTBP2 comprende un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, enfermedades respiratorias, enfermedades gastroenterológicas y enfermedades urológicas. En una realización más preferida, la enfermedad cardiovascular asociada a LTBP2 comprende un grupo de enfermedades que consiste en insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión pulmonar, disfunción ventricular izquierda y disfunción ventricular derecha, infarto de miocardio, oclusión coronaria, enfermedad, enfermedad cardíaca isquémica, trastorno por hipertrofia cardíaca, trastornos por fibrosis cardíaca.

En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ser humano.

40 En una realización preferida de la invención, el nivel de LTBP2 de la muestra biológica es elevado en comparación con la muestra de control.

Otra realización de la presente invención prefiere el uso de LTBP2 en combinación con el uso de uno o más biomarcadores, más preferentemente con biomarcadores usados en el diagnóstico de enfermedades asociadas a LTBP2.

45 En una realización preferida de la invención, el uso de LTBP2 se combina con el uso de uno o más biomarcadores que comprenden un grupo de biomarcadores que consiste en CRTAC, PRSS23, FN1, TGFB2, NPR3, CTGF, BNP, ANP, troponina, CRP, mioglobina, CK-MB y metabolitos.

En otra realización preferida, el uso de LTBP2 se combina con el uso de uno o más biomarcadores clínicos que comprenden un grupo de biomarcadores que consiste en tensión arterial, frecuencia cardíaca, tensión arterial pulmonar

o resistencia vascular sistémica.

En otra realización preferida, el uso de LTBP2 se combina con el uso de uno o más procedimientos de obtención de imágenes de diagnóstico que comprenden un grupo de procedimientos que consiste en TEP (tomografía de emisión de positrones), TC (tomografía computerizada), ultrasónico, SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único), ecocardiografía o cardiografía por impedancia.

En otra realización preferida, el uso de LTBP2 se combina con el uso de uno o más procedimientos de obtención de imágenes de diagnóstico que comprenden un grupo de procedimientos que consiste en TEP (tomografía de emisión de positrones), TC (tomografía computerizada), ultrasónico, SPECT (tomografía computerizada por emisión de fotón único), ecocardiografía, cardiografía por impedancia, tensión arterial, frecuencia cardíaca, tensión arterial pulmonar, resistencia vascular sistémica, CRTAC, PRSS23, FN1, TGFB2, NPR3, CTGF, BNP, ANP, troponina, CRP, mioglobina, CK-MB y metabolitos.

En otra realización preferida es un kit para identificar un riesgo individual de desarrollar una enfermedad, para predecir una enfermedad o un desenlace adverso en un paciente diagnosticado con una enfermedad, o para guiar una terapia en un paciente con una enfermedad, comprendiendo el kit uno o más anticuerpos que se unen específicamente a LTBP2, medios de detección, uno o más recipientes para recoger y o contener la muestra biológica, y una instrucción para su uso.

Otra realización preferida es un kit para identificar un riesgo individual para desarrollar una enfermedad, para predecir una enfermedad o un desenlace adverso en un paciente diagnosticado con una enfermedad, o para guiar una terapia en un paciente con una enfermedad, comprendiendo el kit una o más sondas o cebadores para detectar ARNm de LTBP2, medios de detección, uno o más recipientes para recoger y o contener la muestra biológica, y una instrucción para su uso.

Otra realización preferida es un kit para identificar un riesgo individual para desarrollar una enfermedad, para predecir una enfermedad o un desenlace adverso en un paciente diagnosticado con una enfermedad, o para guiar una terapia en un paciente con una enfermedad, comprendiendo el kit uno o más sustratos para detectar actividad de LTBP2, medios de detección, uno o más recipientes para recoger y o contener la muestra biológica, y una instrucción para su uso.

Determinación de una dosis terapéuticamente eficaz

La determinación de una dosis terapéuticamente eficaz está perfectamente dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia. Una dosis terapéuticamente eficaz se refiere a esa cantidad de principio activo que aumenta o disminuye la actividad de LTBP2 con respecto a la actividad de LTBP2 que se produce en ausencia de la dosis terapéuticamente eficaz. Para cualquier compuesto, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente tanto en ensayos de cultivo celular como en modelos animales, normalmente ratones, conejos; perros, o cerdos. El modelo animal también puede usarse para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Tal información pueden entonces usarse para determinar dosis útiles y vías para administración en seres humanos.

La eficacia y toxicidad terapéutica, por ejemplo, DE_{50} (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población) y la DL_{50} (la dosis letal para el 50% de la población) puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales. La relación de dosis de efectos tóxicos con respecto a terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación, DL_{50}/DE_{50} . Se prefieren composiciones farmacéuticas que presenten grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celular y estudios animales se usan en la formulación de un intervalo de dosificación para uso humano. La dosificación contenida en tales composiciones está preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluye la DE_{50} con poca o ninguna toxicidad. La dosificación varía dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada, sensibilidad del paciente y la vía de administración. La dosificación exacta se determinará por el médico, en vista de factores relacionados con el sujeto que requiere tratamiento. La dosificación y administración se ajustan para proporcionar niveles suficientes del principio activo o para mantener el efecto deseado. Factores que puede tenerse en cuenta incluyen la gravedad del estado de enfermedad, salud general del sujeto, edad, peso y sexo del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación (combinaciones) de fármaco, sensibilidades a la reacción y tolerancia/respuesta a terapia. Las composiciones farmacéuticas de acción prolongada pueden administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y tasa de eliminación de la formulación particular.

Las cantidades de dosificación normal pueden variar de 0,1 microgramos a 100.000 microgramos, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. La orientación en cuanto a dosificaciones y procedimientos particulares de administración se proporciona en la bibliografía y generalmente está disponible para médicos en la materia. Aquellos expertos en la materia emplearán formulaciones diferentes para nucleótidos que para

proteínas o sus inhibidores. Similarmente, la administración de polinucleótidos o polipéptidos será específica para células particulares, condiciones, localizaciones, etc. Si el reactivo es un anticuerpo monocatenario, los polinucleótidos que codifican el anticuerpo pueden construirse e introducirse en una célula tanto *ex vivo* como *in vivo* usando técnicas bien establecidas que incluyen, pero no se limitan a, transferencia de ADN mediada por polimerización de transferrina, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular mediada por liposomas, transporte intracelular de perlas de látex recubiertas por ADN, fusión de protoplastos, infección viral, electroporación, "pistola de genes" y transfección mediada por DEAE o fosfato de calcio.

Si el producto de expresión es ARNm, el reactivo es preferentemente un oligonucleótido antisentido o una ribozima. Los polinucleótidos que expresan oligonucleótidos o ribozimas antisentido pueden introducirse en células mediante una variedad de procedimientos, como se ha descrito anteriormente. Preferentemente, un reactivo reduce la expresión del gen LTBP2 o la actividad de LTBP2 al menos aproximadamente el 10, preferentemente aproximadamente el 50, más preferentemente aproximadamente el 75, 90 o el 100% con respecto a la ausencia del reactivo. La eficacia del mecanismo elegido para reducir el nivel de expresión del gen LTBP2 o la actividad de LTBP2 puede evaluarse usando procedimientos muy conocidos en la técnica, tales como hibridación de sondas de nucleótido con ARNm específico de LTBP2, RT-PCR cuantitativa, detección inmunológica de LTBP2, o medición de la actividad de LTBP2.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, cualquiera de las composiciones farmacéuticas de la invención puede administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos apropiados. La selección de los agentes apropiados para su uso en terapia de combinación puede hacerse por un experto habitual en la materia, según principios farmacéuticos convencionales. La combinación de agentes terapéuticos puede actuar sinérgicamente para efectuar el tratamiento o la prevención de los diversos trastornos descritos anteriormente. Usando este enfoque, uno puede ser capaz de alcanzar eficacia terapéutica con menores dosificaciones de cada agente, reduciendo así las posibilidades de efectos secundarios adversos. Cualquiera de los procedimientos terapéuticos descritos anteriormente puede aplicarse a cualquier sujeto en necesidad de tal terapia, que incluye, por ejemplo, mamíferos tales como perros, gatos, vacas, caballos, conejos, monos, y lo más preferentemente, seres humanos.

Moléculas de ácidos nucleicos de la invención son aquellas moléculas de ácidos nucleicos que están contenidas en un grupo de moléculas de ácidos nucleicos que consiste en (i) moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 o SEC ID N°: 4, (ii) moléculas de ácidos nucleicos que comprenden la secuencia de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, (iii) moléculas de ácidos nucleicos que tienen la secuencia de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 2, (iv) moléculas de ácidos nucleicos cuya hebra complementaria se hibrida bajo condiciones rigurosas con una molécula de ácido nucleico de (i), (ii) o (iii), (v) moléculas de ácidos nucleicos cuya secuencia se diferencia de la secuencia de una molécula de ácido nucleico de (iii) debido a la degeneración del código genético, (vi) moléculas de ácidos nucleicos que tienen una identidad de secuencias de al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o el 99%; y (vii) en las que el polipéptido codificado por dichas moléculas de ácidos nucleicos de (i)-(vi) tiene actividad de LTBP2.

Los polipéptidos de la invención son aquellos polipéptidos que están contenidos en un grupo de polipéptidos que consiste en (i) polipéptidos que tienen la secuencia de SEC ID N°: 3 ó 4, (ii) polipéptidos que comprenden la secuencia de SEC ID N°: 3 ó 4, (iii) polipéptidos codificados por moléculas de ácidos nucleicos de la invención y (iv) polipéptidos que muestran al menos el 99%, 98%, 95%, 90% o el 80% de identidad con un polipéptido de (i), (ii) o (iii).

Se describe un procedimiento de cribado de agentes terapéuticos útil en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende las etapas de (i) poner en contacto un compuesto de prueba con un polipéptido de LTBP2, (ii) detectar la unión de dicho compuesto de prueba a dicho polipéptido de LTBP2. Por ejemplo, compuestos que se unen al polipéptido de LTBP2 son posibles agentes terapéuticos identificados para una enfermedad tal.

Se describe un procedimiento de cribado de agentes terapéuticos útil en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende las etapas de (i) determinar la actividad de un polipéptido de LTBP2 a una cierta concentración de un compuesto de prueba o en ausencia de dicho compuesto de prueba, (ii) determinar la actividad de dicho polipéptido a una concentración diferente de dicho compuesto de prueba. Por ejemplo, compuestos que conducen a una diferencia en la actividad del polipéptido de LTBP2 en (i) y (ii) son posibles agentes terapéuticos identificados para una enfermedad tal.

Se describe un procedimiento de cribado de agentes terapéuticos útil en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende las etapas de (i) determinar la actividad de un polipéptido de LTBP2 a una cierta concentración de un compuesto de prueba, (ii) determinar la actividad de un polipéptido de LTBP2 en presencia de un

compuesto conocido por ser un regulador de un polipéptido de LTBP2. Por ejemplo, compuestos que muestran efectos similares sobre la actividad del polipéptido de LTBP2 en (i) con respecto a compuestos usados en (ii) son posibles agentes terapéuticos identificados para una enfermedad tal.

5 Se describen procedimientos de lo que antecede, en los que la etapa de poner en contacto es en, o sobre, la superficie de una célula.

Se describen procedimientos de lo que antecede, en los que la célula está *in vitro*.

Se describen procedimientos de lo que antecede, en los que la etapa de poner en contacto es en un sistema sin células.

Se describen procedimientos de lo que antecede, en los que el polipéptido se acopla a una marca detectable.

10 Se describen procedimientos de lo que antecede, en los que el compuesto se acopla a una marca detectable.

Se describen procedimientos de lo que antecede, en los que el compuesto de prueba desplaza un ligando que se une primero al polipéptido.

Se describen procedimientos de lo que antecede, en los que el polipéptido está unido a un soporte sólido.

Se describen procedimientos de lo que antecede, en los que el compuesto está unido a un soporte sólido.

15 Se describe un procedimiento de cribado de agentes terapéuticos útil en el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende las etapas de (i) poner en contacto un compuesto de prueba con un polinucleótido de LTBP2, (ii) detectar la unión de dicho compuesto de prueba a dicho polinucleótido de LTBP2. Los compuestos que, por
20 ejemplo, se unen al polinucleótido de LTBP2 son posibles agentes terapéuticos para el tratamiento de tales enfermedades.

Se describe el procedimiento de lo que antecede, en el que la molécula de ácido nucleico es ARN.

Se describe un procedimiento de lo que antecede, en el que la etapa de puesta en contacto es en o sobre la superficie de una célula.

25 Se describe un procedimiento de lo que antecede, en el que la etapa de puesta en contacto es en un sistema sin células.

Se describe un procedimiento de lo que antecede, en el que el polinucleótido se acopla a una marca detectable.

Se describe un procedimiento de lo que antecede, en el que el compuesto de prueba se acopla a una marca detectable.

30 Se describe un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende las etapas de (i) determinar la cantidad de un polinucleótido de LTBP2 en una muestra tomada de dicho mamífero, (ii) determinar la cantidad de polinucleótido de LTBP2 en mamífero sano y/o enfermo. Una enfermedad se diagnostica, por ejemplo, si
35 hay una similitud sustancial en la cantidad de polinucleótido de LTBP2 en dicho mamífero de prueba con respecto a un mamífero enfermo.

40 Se describe una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende un agente terapéutico que se une a un polipéptido de LTBP2.

Se describe una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende un agente terapéutico que regula la actividad de un polipéptido de LTBP2.

45 Se describe una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende un agente terapéutico que regula la actividad de un polipéptido de LTBP2, en la que dicho agente terapéutico es (i) una

molécula pequeña, (ii) una molécula de ARN, (iii) un oligonucleótido antisentido, (iv) un polipéptido, (v) un anticuerpo, o (vi) una ribozima.

5 Se describe una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende un polinucleótido de LTBP2.

10 Se describe una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende un polipéptido de LTBP2.

Se describe el uso de reguladores de una LTBP2 para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero.

15 Se describe un procedimiento para la preparación de una composición farmacéutica útil para el tratamiento de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero que comprende las etapas de (i) identificar un regulador de LTBP2, (ii) determinar si dicho regulador mejora o no los síntomas de una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas en un mamífero; y (iii) combinar de dicho regulador con un vehículo farmacéutico aceptable.

20 Se describe el uso de un regulador de LTBP2 para la regulación de actividad de LTBP2 en un mamífero que tiene una enfermedad comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas.

Los usos, procedimientos o composiciones descritos son útiles para cada enfermedad individual comprendida en un grupo de enfermedades que consiste en enfermedades cardiovasculares, enfermedades hematológicas, enfermedades neurológicas, cáncer, enfermedades endocrinológicas y enfermedades urológicas.

30 Los ejemplos dados a continuación se proporcionan para ilustrar la invención objeto. Estos ejemplos se proporcionan a modo de ilustración.

Ejemplos

Ejemplo 1: Búsqueda de secuencias homólogas en bases de datos de secuencia públicas

35 El grado de homología puede calcularse fácilmente mediante procedimientos conocidos. Procedimientos preferidos para determinar la homología se diseñan para dar la mayor coincidencia entre las secuencias probadas. Los procedimientos para determinar homología se codifican en programas informáticos públicamente disponibles tales como BestFit, BLASTP, BLASTN y FASTA. Los programas BLAST están públicamente disponibles de NCBI y otras fuentes en internet.

40 Para LTBP2 se identificaron los siguientes resultados para secuencias conocidas usando el algoritmo BLAST [Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ; Nucleic Acids Res 1997 Sep 1; 25(17): 3389-402] y el siguiente conjunto de parámetros: matriz = BLOSUM62 y filtro de baja complejidad. Se buscó en las siguientes bases de datos: NCBI (base de datos no redundante) y base de datos de patentes DERWENT (Geneseq).

Se encontraron los siguientes resultados:

45 >dbj|DD288037.1| GENES ENDOTELIALES LINFÁTICOS, Longitud = 7017, Puntuación = 1,391e+04 bits (7017), Esperado = 0,0, Identicidades = 7017/7017 (100%)

>gb|S82451.1| Proteína 2 de unión a factor de crecimiento beta transformante latente [línea celular de fibroblastos humanos CC102, ARNm, 7017 nt], Longitud = 7017, Puntuación = 1,391e+04 bits (7017), Esperado = 0,0, Identicidades = 7017/7017 (100%)

50 >ref|NM_000428.2| Proteína 2 de unión a factor de crecimiento beta transformante latente de Homo sapiens (LTBP2), ARNm, Longitud = 8568, Puntuación = 1,384e+04 bits (6982), Esperado = 0,0, Identicidades = 6982/6982 (100%)

>dbj|DD018049.1| Un marcador de insuficiencia cardíaca y su uso, Longitud = 8657, Puntuación = 1,376e+04 bits (6940), Esperado = 0,0, Identidades = 6967/6972 (99%), Huecos = 3/6972 (0%)

>emb|CQ874661.1| Secuencia 21 de la patente WO2004075835, Longitud = 7000, Puntuación = 1,369e+04 bits (6906), Esperado = 0,0, Identidades = 6954/6966 (99%), Huecos = 3/6966 (0%)

5 >emb|Z37976.1|HSLTBP2MR ARNm de H. sapiens para proteína de unión a factor de crecimiento beta transformante latente (LTBP-2), Longitud = 7000, Puntuación = 1,369e+04 bits (6906), Esperado = 0,0, Identidades = 6954/6966 (99%), Huecos = 3/6966 (0%)

10 >gb|BC078659.1| Proteína 2 de unión a factor de crecimiento beta transformante latente de Homo sapiens, ARNm (clon de ADNc MGC:87426 IMAGEN:30343778), CD completas, Longitud = 6901, Puntuación = 1,361e+04 bits (6867), Esperado = 0,0, Identidades = 6897/6905 (99%), Huecos = 4/6905 (0%)

>dbj|AB209865.1| Proteína de variante de la proteína 2 de unión a factor de crecimiento beta transformante latente de Homo sapiens, Longitud = 7803, Puntuación = 1,232e+04 bits (6216), Esperado = 0,0, Identidades = 6228/6232 (99%)

Ejemplo 2: Perfilado de expresión

15 Se aisló ARN celular total de células por uno de dos procedimientos convencionales: 1) centrifugación en gradiente de densidad de isocianato de guanidina/cloruro de cesio [Kellogg, (1990)]; o con el protocolo Tri-reagent según las especificaciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio). El ARN total preparado por el protocolo Tri-reagent se trató con DNAsa I para eliminar contaminación de ADN genómico.

20 Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de LTBP2, ARN total de cada fuente de célula o tejido se transcribió primero de forma inversa. 85 µg de ARN total se transcribieron de forma inversa usando 1 µmol de cebadores hexámeros al azar, 0,5 mM cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Qiagen, Hilden, Alemania), 3000 U de RnaseQut (Invitrogen, Groningen, Los Países Bajos) en un volumen final de 680 µl. El tampón de síntesis de la primera hebra y la transcriptasa inversa Omniscript (2 u/µl) fueron de (Qiagen, Hilden, Alemania). La reacción se incubó a 37 °C durante 90 minutos y se enfrió sobre hielo. El volumen se ajustó a 6800 µl con agua, dando una concentración final de 12,5 ng/µl de ARN de partida.

30 Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de LTBP2 en células y tejidos se usó el sistema de detección de secuencias 7900HT de Applied Bioscience según las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se configuraron para cuantificar LTBP2 y los genes de mantenimiento HPRT (hipoxantina fosforibosiltransferasa), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), β-actina, y otros. Se diseñaron cebadores directos e inversos y sondas para LTBP2 usando el software ABI Primer Express™ de Applied Bioscience y se sintetizaron por Eurogentec (Bélgica). La secuencia del cebador directo de LTBP2 fue: Cebador1 (SEC ID N°: 8). La secuencia del cebador inverso de LTBP2 fue Cebador2 (SEC ID N°: 10). La Sonda1 (SEC ID N°: 9), marcada con FAM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) como colorante indicador y TAMRA (carboxitetrametilrodamina) como extintor, se usa como sonda para LTBP2. Los siguientes reactivos se prepararon en un total de 20 µl : 1x qPCR-MasterMix (Eurogentec; Bélgica) y Sonda1 (SEC ID N°: 9), los cebadores directos e inversos de LTBP2 cada uno a 200 nM, sonda marcada con FAM/TAMRA de LTBP2 200 nM y 5 µl de ADNc de molde. Los parámetros del ciclo térmico fueron 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de fusión a 95 °C durante 15 s e hibridación/extensión a 60 °C durante 1 min.

Cálculo de valores de CU corregidos

40 El valor de CU (ciclo umbral) se calcula como se describe en la sección "Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos". El valor de CU (factor para corrección del ciclo umbral) se calcula del siguiente modo:

1. Se configuraron reacciones de PCR para cuantificar los genes de mantenimiento (HKG) para cada muestra de ADNc.

45 2. Los valores de CU_{HKG} (ciclo umbral para gen de mantenimiento) se calcularon como se describe en la sección "Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos"..

3. Se calculan los valores medios de CU_{HKG} (valor medio de CU de todos los HKG probados en un ADNc) de todos los HKG para cada ADNc (n = número de HKG):

$$\text{Valor medio de } CU_{HKG-n} = (\text{Valor de } CU_{HKG1} + \text{Valor de } CU_{HKG2} + \dots + \text{Valor de } CU_{HKG-n}) / n$$

4. Valor medio de CU_{panel} (valor medio de CU de todos los HKG en todos los ADNc probados) =

50 $(\text{Valor medio de } CU_{HKG1} + \text{Valor medio de } CU_{HKG2} + \dots + \text{Valor medio de } CU_{HKG-y}) / y$

(y = número de ADNc)

5. CU_{ADNc-n} (factor de corrección para ADNc n) = Valor medio de CU_{panel} - Valor medio de CU_{HKG-n}

6. CU_{ADNc-n} (valor de CU del gen probado para el ADNc n) + CF_{ADNc-n} (factor de corrección para ADNc n) = $CT_{cor-ADNc-n}$ (valor de CU corregido para un gen en ADNc n)

5 *Cálculo de expresión relativa*

Definición: mayor $CU_{cor-ADNc-n} \neq 40$ se define como $CU_{cor-ADNc}$ [alto]

Expresión relativa = $2^{(CU_{cor-ADNc[alto]} - CU_{cor-ADNc-n})}$

Tejidos

La expresión de LTBP2 se investigó en los tejidos en la Tabla 1.

10 *Perfil de expresión*

Los resultados de la cuantificación de ARNm (perfilado de expresión) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Expresión relativa de LTBP2 en diversos tejidos humanos.

Tejido	Expresión relativa
linfocitos T CD4+ de sangre periférica	2
monocitos	20
monocitos infectados por el VIH-1	20
corazón fetal	193
corazón	8306
corazón	6252
corazón	6517
infarto de miocardio de corazón	1924
infarto de miocardio de corazón	2106
pericardio	399
aurícula del corazón (derecha)	1160
aurícula del corazón (derecha)	350
aurícula del corazón (izquierda)	290
aurícula del corazón (izquierda)	635
ventrículo del corazón (izquierdo)	1370
ventrículo del corazón (izquierdo)	1235
ventrículo del corazón (derecho)	29
ventrículo del corazón (derecho)	365
punta del corazón	118
fibras de Purkinje	1209
septo interventricular	265

ES 2 443 042 T3

(continuación)

Tejido	Expresión relativa
aorta fetal	352
aorta	2385
aorta	832
aorta	549
arco aórtico	976
válvula de la aorta	3902
arteria	108
arteria coronaria	12766
arteria coronaria	2721
arteria pulmonar	2557
arteria carótida	1563
arteria mesentérica	176
arteria radial	143
vena	3281
válvula pulmonar	3848
vena (safena magna)	52
vena (cava)	1261
células endoteliales de la arteria coronaria	3040
células primarias de músculo liso de la arteria coronaria	1144
células de músculo liso aórtico	4360
células de músculo liso de la arteria pulmonar	3822
células endoteliales aórticas	5595
células HUVEC	5078
células endoteliales de la arteria pulmonar	2684
células endoteliales de la arteria ilíaca	3956
piel	340
glándula suprarrenal	976
tiroides	56267
tumor tiroideo	1951
páncreas	1510

ES 2 443 042 T3

(continuación)

Tejido	Expresión relativa
esófago	1160
tumor de esófago	347
estómago	261
tumor de estómago	1053
colon	27
tumor de colon	1563
intestino delgado	61
íleon	1675
tumor de íleon	181
inflamación crónica del íleon	56
células Caco-2	33
recto	220
tumor de recto	338
hígado fetal	33
hígado	26
hígado	0
hígado	3
cirrosis hepática	474
tumor de hígado	193
células HuH-7	15
leucocitos (sangre periférica)	177
Jurkat (linfocitos T)	3
Raji (linfocitos B)	0
médula ósea	54
HL-60 (células promieloblasto)	1
THP-1 (monocitos de sangre periférica)	3
CD56+ de sangre periférica (linfocitos citolíticos espontáneos)	27
eritrocitos	0

ES 2 443 042 T3

(continuación)

Tejido	Expresión relativa
nodo linfático	102
timo	51
trombocitos	120
células del estroma de médula ósea	3956
células CD71+ de médula ósea	7
células CD33+ de médula ósea	3
células CD34+ de médula ósea	38
células CD15+ de médula ósea	39
células CD71+ de sangre del cordón umbilical	12
células CD34+ de sangre del cordón umbilical	16
neutrófilos de sangre del cordón umbilical	27
linfocitos T CD8+ de sangre periférica	37
monocitos CD14+ de sangre periférica	2
linfocitos B CD19+ de sangre periférica	46
neutrófilos de sangre periférica	25
bazo	31
músculo esquelético	187
cartílago	1563
adiposo	4040
adiposo	576
adiposo	1017
adiposo fetal	1409
cerebro	755
cerebelo	982
corteza cerebral	50
lóbulo frontal	996
lóbulo occipital	1938
lóbulo parietal	94
lóbulo temporal	25
sustancia negra	7

(continuación)

Tejido	Expresión relativa
caudado	24
hipocampo	14
tálamo	0
tálamo posteroventral	218
tálamo dorsomedial	55
hipotálamo	147
ganglios de la raíz dorsal	76863
médula espinal	288
médula espinal (asta ventral)	74
médula espinal (asta dorsal)	104
células H4 de tumor de la glía	24
retina	141
pulmón fetal	1342
células IMR-90 de fibroblastos de pulmón fetal	2180
células MRC-5 de fibroblastos de pulmón fetal	1031
pulmón	19349
pulmón	21921
tumor de pulmón	12944
EPOC de pulmón	1305
tráquea	340
bronquios primarios	580
bronquios secundarios	744
células bronquiales de músculo liso	1795
células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas	292
células epiteliales de las vías respiratorias pequeñas	338

Ejemplo 3: Análisis antisentido

- 5 El conocimiento de la correcta secuencia de ADNc completa que codifica LTBP2 permite su uso como herramienta para tecnología antisentido en la investigación de la función génica. Oligonucleótidos, ADNc o fragmentos genómicos que comprenden la hebra no codificante de un polinucleótido que codifica LTBP2 se usan tanto *in vitro* como *in vivo* para inhibir la traducción del ARNm. Tal tecnología es ahora muy conocida en la técnica, y pueden diseñarse moléculas antisentido en diversas localizaciones a lo largo de las secuencias de nucleótidos. Por tratamiento de células o animales de prueba completos con tales secuencias antisentido, el gen de interés se apaga eficazmente.
- 10 Frecuentemente, la función del gen se determina observando el comportamiento al nivel intracelular, celular, de tejido u organismo (por ejemplo, letalidad, pérdida de función diferenciada, cambios en morfología, etc.).

Además de usar secuencias construidas para interrumpir la transcripción de un marco de lectura abierto particular, se obtienen modificaciones de la expresión génica diseñando secuencias antisentido para regiones de intrón, elementos promotores/potenciadores, o incluso para genes reguladores de acción en trans.

Ejemplo 4: Expresión de LTBP2

5 La expresión de LTBP2 se lleva a cabo subclonando el ADNc en vectores de expresión apropiados y transfectando los vectores en huéspedes de expresión tales como, por ejemplo, *E. coli*. En un caso particular, el vector se manipula de forma que contenga un promotor para β -galactosidasa, en la dirección 5' del sitio de clonación, seguido de la secuencia que contiene la metionina del extremo amino y los siete residuos posteriores de β -galactosidasa. Inmediatamente siguiendo a estos ocho residuos está un promotor de bacteriófago manipulado útil para cebado y transcripción artificial
10 y para proporcionar varios sitios de restricción de endonucleasa únicos para la clonación.

La inducción de la cepa bacteriana transflectada aislada con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) usando procedimientos convencionales produce una proteína de fusión correspondiente a los siete primeros residuos de β -galactosidasa, aproximadamente 15 residuos de "ligador", y el péptido codificado dentro del ADNc. Como los insertos del clon de ADNc se generan por un procedimiento esencialmente al azar, hay una probabilidad del 33% de que el
15 ADNc incluido se encuentre en el correcto marco de lectura para la apropiada traducción. Si el ADNc no está en el marco de lectura adecuado, se obtiene por delección o inserción del número apropiado de bases usando procedimientos muy conocidos que incluyen mutagénesis *in vitro*, digestión con exonucleasa III o nucleasa de frijol mungo, o la inclusión de un oligonucleótido ligador de longitud apropiada.

El ADNc de LTBP2 se traslada a otros vectores conocidos por ser útiles para la expresión de proteínas en huéspedes
20 específicos. Cebadores de oligonucleótidos que contienen sitios de clonación, además de un segmento de ADN (aproximadamente 25 bases) suficiente para hibridarse con estiramientos en ambos extremos del ADNc diana, se sintetizan químicamente mediante procedimientos convencionales. Estos cebadores se usan entonces para amplificar el segmento de gen deseado por PCR. El segmento de gen resultante se digiere con enzimas de restricción apropiadas bajo condiciones estándar y se aísla por electroforesis en gel. Alternativamente, segmentos de genes similares se
25 producen por digestión del ADNc con enzimas de restricción apropiadas. Usando cebadores apropiados, los segmentos de secuencia codificante de más de un gen se ligan juntos y se clonan en vectores apropiados. Es posible optimizar la expresión por construcción de tales secuencias quiméricas.

Huéspedes de expresión adecuados para tales moléculas quiméricas incluyen, pero no se limitan a, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO) y 293 humanas, células de insecto tales como células Sf9, células de levadura tales como *Saccharomyces cerevisiae* y células bacterianas tales como *E. coli*. Para cada uno de estos sistemas de células, un vector de expresión útil también incluye un origen de replicación para permitir la propagación en bacterias, y un marcador de selección tal como el gen de resistencia al antibiótico β -lactamasa para permitir la selección de plásmidos en bacterias. Además, el vector puede incluir un segundo marcador de selección tal como el gen neomicina fosfotransferasa para permitir la selección en células huésped eucariotas transflectadas.
30 Vectores para su uso en huéspedes de expresión eucariotas requieren elementos de procesamiento de ARN tales como secuencias de poliadenilación de 3' si tales no son parte del ADNc de interés.

Adicionalmente, el vector contiene promotores o potenciadores que aumentan la expresión génica. Tales promotores son específicos para huésped e incluyen MMTV, SV40, y promotores de metalotioneína para células CHO; promotores trp, lac, tac y T7 para huéspedes bacterianos; y promotores factor alfa, alcohol oxidasa y PGH para levadura. Los potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous, se usan en células huésped de mamífero. Una vez se obtienen cultivos homogéneos de células recombinantes mediante procedimientos de cultivo convencionales, grandes cantidades de LTBP2 recombinantemente producido se recuperan del medio acondicionado y se analizan usando procedimientos cromatográficos conocidos en la técnica. Por ejemplo, LTBP2 puede clonarse en el vector de expresión pcDNA3, como se ejemplifica en el presente documento. Este producto puede usarse para transformar, por ejemplo, HEK293 o COS por metodología convencional en la materia.
40 Específicamente, por ejemplo, usando transferencia génica mediada por Lipofectamine (nº de catálogo de Gibco BRL 18324-020).

Ejemplo 5: Aislamiento de LTBP2 recombinante

LTBP2 se expresa como una proteína quimérica con uno o más dominios de polipéptido adicionales añadidos para facilitar la purificación de proteínas. Tales dominios que facilitan la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos quelantes de metal tales como módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados [Appa Rao, (1997)] y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad de FLAGS (Inmunex Corp., Seattle, Washington). La inclusión de una secuencia de ligador escindible tal como factor Xa o enterocinasa (Invitrogen, Groningen, Los Países Bajos) entre el dominio de purificación y la secuencia de LTBP2 es útil para facilitar
55 la expresión de LTBP2.

El siguiente ejemplo proporciona un procedimiento para purificar LTBP2.

LTBP2 se genera usando el sistema de expresión de baculovirus BAC-TO-BAC (GIBCO BRL) basado en la infección por el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) de células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (células Sf9).

- 5 Las proteínas que codifican ADNc se clonaron en tanto el plásmido donante pFASTBAC1 como pFASTBAC-HT que contienen un elemento de transposición mini-Tn7. El plásmido recombinante se transforma en células competentes DH10BAC que contienen el báculo parental bMON14272 (ADN infeccioso de AcNPV) y un plásmido auxiliar. El elemento de mini-Tn7 en el pFASTBAC donante puede transponerse al sitio de unión de attTn7 en el báculo introduciendo así el gen en el genoma viral. Las colonias que contienen báculos recombinantes se identifican por alteración del gen *lacZ*. La construcción de báculos pueden entonces aislarse e infectarse en células de insecto (células Sf9) produciendo la producción de partículas de baculovirus recombinantes infecciosas y expresión de tanto enzima recombinante sin fusionar (pFastbac1) como proteína de fusión de LTBP2-His (pFastbacHT).

- 15 Las células se recogen y los extractos se preparan 24, 48 y 72 horas después de la transfección. La expresión de LTBP2 se confirma por tinción con Coomassie después de la electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) y transferencia Western sobre una membrana de PVDF de un SDS-PAGE sin teñir. La proteína de fusión de proteína-His se detecta debido a la interacción entre el conjugado de Ni-NTA HRP y la marca His que está fusionada con LTBP2.

Ejemplo 6: Producción de anticuerpos específicos para LTBP2

- 20 Se utilizan dos enfoques para producir anticuerpos para LTBP2, y cada enfoque es útil para generar tanto anticuerpos policlonales como monoclonales. En un enfoque, proteína desnaturalizada de la separación de HPLC de fase inversa se obtiene en cantidades de hasta 75 mg. Esta proteína desnaturalizada se usa para inmunizar ratones o conejos usando protocolos convencionales; aproximadamente 100 µg son adecuados para la inmunización de un ratón, mientras que podría usarse hasta 1 mg para inmunizar un conejo. Para identificar hibridomas de ratón, la proteína desnaturalizada se radioyoda y usa para cribar posibles hibridomas de linfocitos B murinos para aquellos que producen anticuerpo. Este procedimiento requiere solo pequeñas cantidades de proteína, tal que 20 mg es suficiente para el marcado y cribado de varios miles de clones.

- 25 En el segundo enfoque, la secuencia de aminoácidos de un dominio de LTBP2 apropiado, como se deduce de la traducción del ADNc, se analiza para determinar regiones de alta antigenicidad. Los oligopéptidos que comprenden regiones hidrófilas apropiadas se sintetizan y se usan en protocolos de inmunización adecuados para producir anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos óptimas para inmunización están normalmente en el extremo C, el extremo N y aquellas regiones hidrófilas intervinientes del polipéptido que es probable que se expongan al entorno externo cuando la proteína está en su conformación natural.

- 35 Normalmente, péptidos seleccionados, aproximadamente 15 residuos de longitud, se sintetizan usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems modelo 431 A usando química de fmoc y se acoplan a hemocianina de lapa californiana (KLH; Sigma, St. Louis, MO) mediante reacción con éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, MBS. Si fuera necesario, una cisteína se introduce en el extremo N del péptido para permitir el acoplamiento a KLH. Se inmunizan conejos con el complejo de péptido-KLH en adyuvante completo de Freund. Los antiseros resultantes se prueban para actividad antipéptido uniendo el péptido a plástico, bloqueando con 1% de albúmina de suero bovino, haciendo reaccionar con antisero, lavando y haciendo reaccionar con IgG de cabra anti-conejo específica purificada por afinidad marcada (radiactiva o fluorescente).

- 40 Se preparan hibridomas y se criban usando técnicas convencionales. Los hibridomas de interés se detectan por cribado con LTBP2 marcada para identificar aquellas fusiones que producen el anticuerpo monoclonal con la especificidad deseada. En un protocolo típico, pocillos de placas (FAST; Becton-Dickinson, Palo Alto, CA) se cubren durante la incubación con anticuerpos de conejo anti-ratón específicos purificados por afinidad (o 1 g de anti-especie adecuada) a 10 mg/ml. Los pocillos recubiertos se bloquean con 1% de albúmina de suero bovino (BSA), se lavan y se incuban con sobrenadantes de hibridomas. Después de lavar los pocillos se incuban con LTBP2 marcada a 1 mg/ml. Los sobrenadantes con anticuerpos específicos se unen más a LTBP2 marcada que es detectable en el fondo. Entonces, los anticuerpos específicos productores de clones se expanden y se someten a dos ciclos de clonación a dilución limitante. Los hibridomas clonados se inyectan en ratones tratados con pristano para producir ascitis, y el anticuerpo monoclonal se purifica a partir de fluido ascítico de ratón por cromatografía de afinidad sobre proteína A. Los anticuerpos monoclonales con afinidades de al menos $10^8 M^{-1}$, preferentemente 10^9 a $10^{10} M^{-1}$ o más fuerte, se preparan normalmente mediante procedimientos convencionales.

Ejemplo 7: Prueba de diagnóstico usando anticuerpos específicos para LTBP2

- 55 Anticuerpos para LTBP2 particulares son útiles para investigar la transducción de señales y el diagnóstico de afecciones infecciosas o hereditarias que se caracterizan por diferencias en la cantidad o distribución de LTBP2 o

productos aguas debajo de una cascada de señalización activa.

Las pruebas de diagnóstico para LTBP2 incluyen procedimientos que utilizan anticuerpo y una marca para detectar LTBP2 en fluidos del cuerpo humano, membranas, células, tejidos o extractos de tales. Los polipéptidos y anticuerpos de la presente invención se usan con o sin modificación. Frecuentemente, los polipéptidos y anticuerpos se marcan uniéndolos, tanto covalentemente como no covalentemente, con una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia variedad de marcas y técnicas de conjugación y se ha informado ampliamente en tanto la bibliografía científica como de patente. Marcas adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, agentes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, agentes cromogénicos, partículas magnéticas y similares.

5
10 En la técnica se conocen una variedad de protocolos para medir LTBP2 soluble o unida a membrana, usando tanto anticuerpos policlonales como monoclonales específicos para la proteína. Ejemplos incluyen enzimoanálisis de adsorción (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS). Se prefiere un inmunoensayo basado en monoclonal de dos sitios que utiliza anticuerpos monoclonales reactivos para dos epítopes no interferentes sobre LTBP2, pero puede emplearse un ensayo de unión competitiva.

15 **Ejemplo 8:** Purificación de LTBP2 nativa usando anticuerpos específicos

Se purifica LTBP2 nativa o recombinante por cromatografía de inmutafinidad usando anticuerpos específicos para LTBP2. En general, se construye una columna de inmutafinidad acoplado covalentemente el anticuerpo anti-TRH a una resina cromatográfica activada.

20 Se preparan inmunoglobulinas policlonales a partir de sueros inmunes tanto mediante precipitación con sulfato de amonio como por purificación sobre proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway N.J.). Asimismo, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de fluido ascítico de ratón por precipitación con sulfato de amonio o cromatografía sobre proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como Sepharose activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava según las instrucciones del fabricante.

25 Tales columnas de inmutafinidad se utilizan en la purificación de LTBP2 preparando una fracción de células que contienen LTBP2 en forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de células completas o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial (con o sin adición de detergente) o por otros procedimientos muy conocidos en la técnica. Alternativamente, la LTBP2 soluble que contiene una secuencia señal se secreta en cantidad útil en el medio en que las células se cultivan.

30 Una preparación que contiene LTBP2 soluble se pasa sobre la columna de inmutafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorbancia preferencial de LTBP2 (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). Entonces, la columna se eluye en condiciones que alteran la unión anticuerpo/proteína (por ejemplo, un tampón de pH 2-3 o una alta concentración de un caótropro tal como urea o ión tiocianato), y se recoge LTBP2.

35 **Ejemplo 9:** Cribado de fármacos

La presente invención es particularmente útil para cribar compuestos terapéuticos usando LTBP2 o fragmentos de la misma en cualquiera de una variedad de técnicas de cribado de fármacos.

El siguiente ejemplo proporciona un sistema para medir el cribado de fármacos de LTBP2.

40 La proteína de fusión de proteína-His recombinante puede purificarse a partir del lisado en bruto por cromatografía de afinidad por metal usando Ni-NTA agarosa. Esto permite la retención específica del material recombinante (ya que éste se fusiona con la marca de His), mientras que las proteínas de insecto endógenas se eliminan por lavado. Entonces, el material recombinante se eluye por competición con imidazol.

45 La expresión de proteínas LTBP2 en tejidos, homogenizados de tejido y fluidos corporales que incluyen plasma y suero puede medirse por estrategias basadas en anticuerpo, por ejemplo, por tecnología de ELISA o transferencia Western / inmunofluorescencia. Un anticuerpo policlonal generado contra la LTBP2 de longitud completa se ha descrito en la bibliografía [Vehvilainen y col. (2003)].

Ejemplo 10: Diseño racional de fármacos

50 El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés o de moléculas pequeñas con las que interaccionan, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se usa para fabricar fármacos que son formas más activas o estables del polipéptido o que potencian o

interfieren con la función de un polipéptido *in vivo*.

En un enfoque, la estructura tridimensional de una proteína de interés, o de un complejo de proteína-inhibidor, se determina por cristalografía de rayos X, por modelado informático o, lo más normalmente, por una combinación de los dos enfoques. Tanto la forma como las cargas del polipéptido deben determinarse para esclarecer la estructura y para determinar sitio(s) activo(s) de la molécula. Menos frecuentemente se obtiene información útil referente a la estructura de un polipéptido modelando basándose en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos se usa información estructural relevante para diseñar inhibidores eficaces. Ejemplos útiles de diseño racional de fármacos incluyen moléculas que tienen actividad o estabilidad mejorada, o que actúan de inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos.

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado por ensayo funcional, como se ha descrito anteriormente, y luego resolver su estructura cristalina. Este enfoque, en principio, da un núcleo de fármaco en el que se basa el posterior diseño de fármacos. Es posible evitar completamente la cristalografía de proteínas generando anticuerpos antiidiotípicos (antiids) para un anticuerpo farmacológicamente activo funcional. Como imagen especular de una imagen especular se espera que el sitio de unión de los antiids sea un análogo del receptor original. El antiid se usa entonces para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos químicamente o biológicamente producidos. Los péptidos aislados actúan entonces de núcleo de fármaco.

Debido a la presente invención se proporciona suficiente cantidad de polipéptido para realizar tales estudios analíticos como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos de LTBP2 proporcionada en el presente documento proporciona orientación a aquellos que emplean técnicas de modelado informático en lugar de o además de cristalografía de rayos X.

Ejemplo 11: Identificación de otros miembros del complejo de transducción de señales

LTBP2 marcada es útil como reactivo para la purificación de moléculas con las que interacciona. En una realización de purificación por afinidad, LTBP2 se acopla covalentemente a una columna de cromatografía. El extracto sin células derivado de células sinoviales o células diana putativas se pasa por la columna, y moléculas con afinidad apropiada se unen a LTBP2. El complejo de LTBP2 se recupera de la columna, y el ligando de unión a LTBP2 se disocia y se somete a secuenciación de proteínas del extremo N. La información de secuencia de aminoácidos se usa entonces para identificar la molécula capturada o para diseñar sondas de oligonucleótidos degeneradas para clonar el gen relevante a partir de una biblioteca de ADNc apropiada.

En un procedimiento alternativo, los anticuerpos se producen contra LTBP2, específicamente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se criban para identificar aquellos que inhiben la unión de LTBP2 marcada. Estos anticuerpos monoclonales se usan entonces terapéuticamente.

Ejemplo 12: Uso y administración de anticuerpos, inhibidores o antagonistas

Anticuerpos, inhibidores o antagonistas de LTBP2 u otros tratamientos y compuestos que son limitadores de la transducción de señales (LST) proporcionan diferentes efectos cuando se administran terapéuticamente. Los LST se formulan en un medio de vehículo acuoso farmacéuticamente aceptable inerte no tóxico, preferentemente a un pH de aproximadamente 5 a 8, más preferentemente 6 a 8, aunque el pH puede variar según las características del anticuerpo, inhibidor o antagonista que se formule y la afección que vaya a tratarse. Las características de LST incluyen solubilidad de la molécula, su semivida y antigenicidad/inmunogenicidad. Estas y otras características ayudan en la definición de un vehículo eficaz. Se prefieren proteínas humanas nativas como LST, pero moléculas orgánicas o sintéticas resultantes de cribados de fármacos son igualmente eficaces en situaciones particulares.

Los LST se administran por vías conocidas de administración que incluyen, pero no se limitan a, cremas y geles tópicos; espray y aerosol transmucosa; parche y venda transdérmica; formulaciones inyectables, intravenosas y de lavado; y líquidos y píldoras administrados por vía oral formulados particularmente para resistir el ácido y las enzimas del estómago. La formulación particular, dosificación exacta y vía de administración se determina por el médico adjunto y varía según cada situación específica.

Tales determinaciones se hacen considerando múltiples variables tales como la afección que va a tratarse, el LST que va a administrarse y el perfil farmacocinético de un LST particular. Factores adicionales que se tienen en cuenta incluyen gravedad del estado de enfermedad, edad del paciente, peso, sexo y dieta, tiempo y frecuencia de administración de LST, combinación posible con otros fármacos, sensibilidades de reacción y tolerancia/respuesta a terapia. Las formulaciones de LST de acción prolongada podrían administrarse cada 3 a 4 días, cada semana, o una vez cada dos semanas dependiendo de la semivida y tasa de eliminación del LST particular.

Cantidades de dosificación normales varían de 0,1 a 10⁵ µg, hasta una dosis total de aproximadamente 1 g, dependiendo de la vía de administración. Orientación en cuanto a dosificaciones particulares y procedimientos de administración se proporciona en la bibliografía; véanse las patentes de EE.UU. nº 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212.

Aquellos expertos en la materia emplean diferentes formulaciones para diferentes LST. La administración a células tales como células nerviosas necesita administración de un modo diferente al de otras células tales como células endoteliales vasculares.

- 5 Se contempla que la transducción de señales anormal, traumatismo o enfermedades que desencadenan actividad de LTBP2 son tratables con LST. Estas afecciones o enfermedades se diagnostican específicamente por las pruebas tratadas anteriormente, y tales pruebas deben realizarse en casos de sospecha de infecciones virales, bacterianas o fúngicas, respuestas alérgicas, lesión mecánica asociada a traumatismo, enfermedades hereditarias, linfoma o carcinoma, u otras afecciones que activan los genes de tejidos linfoides o neuronales.

Ejemplo 13: Producción de animales transgénicos no humanos

- 10 Los sistemas de modelo animal que elucidan las funciones fisiológicas y de comportamiento de la LTBP2 se producen creando animales transgénicos no humanos en los que la actividad de la LTBP2 sea tanto elevada como disminuida, o la secuencia de aminoácidos de la LTBP2 expresada esté alterada, mediante una variedad de técnicas. Ejemplos de estas técnicas incluyen, pero no se limitan a: 1) Inserción de versiones normales o mutantes de ADN que codifican una LTBP2, por microinyección, electroporación, transfección retroviral u otros medios muy conocidos para aquellos
15 expertos en la materia, en embriones apropiadamente fecundados con el fin de producir un animal transgénico o 2) recombinación homóloga de versiones mutantes o normales, humanas o animales, de estos genes con el sitio del gen nativo en animales transgénicos para alterar la regulación de la expresión o la estructura de estas secuencias de LTBP2. La técnica de recombinación homóloga es muy conocida en la técnica. Sustituye el gen nativo con el gen insertado y de ahí que sea útil para producir un animal que no puede expresar LTBP2 nativas, pero expresa, por
20 ejemplo, una LTBP2 mutante insertada, que ha sustituido la LTBP2 nativa en el genoma del animal por recombinación, produciendo expresión por disminución del transportador. La microinyección añade genes al genoma, pero no los elimina, y la técnica es útil para producir un animal que expresa su propia LTBP2 y LTBP2 añadida, produciendo expresión en exceso de la LTBP2.

- 25 Un medio disponible para producir un animal transgénico, con un ratón como ejemplo, es del siguiente modo: ratones hembra se aparean, y los óvulos fecundados resultantes se diseccionan de sus oviductos. Los óvulos se almacenan en un medio apropiado tal como medio de cloruro de cesio M2. El ADN o ADNc que codifica LTBP2 se purifica a partir de un vector mediante procedimientos muy conocidos para el experto en la materia. Los promotores inducibles pueden fusionarse con la región codificante del ADN para proporcionar un medio experimental para regular la expresión del transgén. Alternativamente o además, elementos reguladores específicos de tejido pueden fusionarse con la región
30 codificante para permitir la expresión específica de tejido del transgén. El ADN, en una disolución apropiadamente tamponada, se pone en una aguja de microinyección (que puede prepararse a partir de tubo capilar usando un tensor de tubos) y el óvulo a inyectar se pone en un portaobjetos en depresión. La aguja se inserta en el pronúcleo del óvulo, y se inyecta la disolución de ADN. El óvulo inyectado se transfiere entonces dentro del oviducto de un ratón pseudopreñado que es un ratón estimulado con las hormonas apropiadas con el fin de mantener el falso embarazo,
35 avanzando al útero, se implanta y se desarrolla a término. Como se observa anteriormente, la microinyección no es el único procedimiento para insertar ADN en el óvulo, pero se usa aquí solo para fines a modo de ejemplo.

Ejemplo 14: Uso de LTBP2 como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica en enfermedad cardiovascular (DOCA)

El modelo de rata hipertensa por sal DOCA es un modelo bien establecido de hipertrofia ventricular izquierda.

- 40 Ratas Sprague-Dawley macho uninefrectomizadas que pesaban 300-350 g se administraron con 1% de NaCl en agua potable e inyecciones subcutáneas de acetato de desoxicorticosterona (DOCA, 30 mg/kg una vez a la semana) durante cuatro semanas. Ratas sin tratar sin uninefrectomía sirvieron de ratas de control.

- Después de cuatro semanas, las ratas con sal DOCA mostraron un aumento significativo en la masa ventricular izquierda corregida con la longitud de la tibia (sal DOCA: 25,87 ± 0,84 mg/mm frente a control: 21,03 ± 0,60 mg/mm). En este momento de tiempo se tomaron muestras del corazón y de plasma en Li-heparina para el análisis de
45 expresión.

Se aisló ARN celular total con el protocolo Trizol-Reagent según las especificaciones del fabricante (Invitrogen; EE.UU.). El ARN total preparado por el protocolo Trizol-Reagent se trató con DNAsa I para eliminar contaminación de ADN genómico.

- 50 Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de LTBP2, ARN total de cada muestra se transcribió primero de forma inversa. 1 µg de ARN total se transcribió de forma inversa usando el sistema de transcripción inversa ImProm-II (Promega, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. El volumen final se ajustó a 200 µl con agua.

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de LTBP2 se usó el sistema de detección de secuencias ABI 7900HT de Applied Bioscience según las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se configuraron para cuantificar LTBP2 y el gen de mantenimiento L32. Se diseñaron cebadores directos e inversos y las

sondas para LTBP2 usando el software ABI Primer Express™ de Applied Bioscience y se sintetizaron por Eurogentec (Bélgica). La secuencia del cebador directo de LTBP2 fue: Cebador1 (SEC ID N°: 5). La secuencia del cebador inverso de LTBP2 fue Cebador2 (SEC ID N°: 7). La Sonda1 (SEC ID N°: 6), marcada con FAM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) como colorante indicador y TAMRA (carboxitetrametilrodamina) como extintor, se usa como sonda para LTBP2. Los siguientes reactivos se prepararon en un total de 20 µl : 1x qPCR-MasterMix (Eurogentec; Bélgica) y Sonda1 (SEC ID N°: 6), los cebadores directos e inversos de LTBP2 cada uno a 200 nM, sonda marcada con FAM/TAMRA de LTBP2 200 nM y 5 µl de ADNc de molde. Los parámetros del ciclo térmico fueron 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de fusión a 95 °C durante 15 s e hibridación/extensión a 60 °C durante 1 min.

5

10 Cálculo de expresión relativa

El valor de CU (ciclo umbral) se calcula como se describe en la sección "Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos".

$$\text{delta CU} = \text{CTLTBP2} - \text{CUI32}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-(15-\text{deltaCU})}$$

15 Los resultados del perfil de cuantificación de ARNm (perfilado de expresión) se muestran en la Figura 11.

Ejemplo 14: Uso de LTBP2 como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica en enfermedad cardiovascular (oclusión)

En el modelo de infarto de miocardio crónico en rata [Pfeffer y col., (1979)] se realiza ligación de la arteria coronaria izquierda bajo anestesia de isoflurano. Tras una toracotomía izquierda en el cuarto espacio intercostal, el pericardio se abre y el corazón se exterioriza brevemente. La arteria coronaria izquierda (LAD) se liga crónicamente. En animales con operación de referencia la LAD permanece abierta. El pecho se cierra y los animales se desenganchan del ventilador y se colocan en jaulas con acceso libre a alimento y agua. Una semana después de la oclusión de LAD se inicia la administración de compuestos de prueba. Se analizan tejido de corazón y muestras de plasma 9 semanas después de la inducción del infarto hacia marcadores de plasma y perfiles de expresión.

20

25 Se aisló ARN celular total con el protocolo Trizol-Reagent según las especificaciones del fabricante (Invitrogen; EE.UU.). El ARN total preparado por el protocolo Trizol-Reagent se trató con DNAsa I para eliminar contaminación de ADN genómico.

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de LTBP2, el ARN total de cada muestra se transcribió primero de forma inversa. 1 µg de ARN total se transcribió de forma inversa usando el sistema de transcripción inversa ImProm-II (Promega, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. El volumen final se ajustó a 200 µl con agua.

30

Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de LTBP2 se usó el sistema de detección de secuencias ABI 7900HT de Applied Bioscience según las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se configuraron para cuantificar LTBP2 y el gen de mantenimiento L32. Se diseñaron cebadores directos e inversos y las sondas para LTBP2 usando el software ABI Primer Express™ de Applied Bioscience y se sintetizaron por Eurogentec (Bélgica). La secuencia del cebador directo de LTBP2 fue: Cebador1 (SEC ID N°: 5). La secuencia del cebador inverso de LTBP2 fue Cebador2 (SEC ID N°: 7). La Sonda1 (SEC ID N°: 6), marcada con FAM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) como colorante indicador y TAMRA (carboxitetrametilrodamina) como extintor, se usa como sonda para LTBP2. Los siguientes reactivos se prepararon en un total de 20 µl : 1x qPCR-MasterMix (Eurogentec; Bélgica) y Sonda1 (SEC ID N°: 6), los cebadores directos e inversos de LTBP2 cada uno a 200 nM, sonda marcada con FAM/TAMRA de LTBP2 200 nM y 5 µl de ADNc de molde. Los parámetros del ciclo térmico fueron 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de fusión a 95 °C durante 15 s e hibridación/extensión a 60 °C durante 1 min.

35

40

Cálculo de expresión relativa

El valor de CU (ciclo umbral) se calcula como se describe en la sección "Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos".

45

$$\text{delta CU} = \text{CTLTBP2} - \text{CUI32}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-(15-\text{deltaCU})}$$

Los resultados del perfil de cuantificación de ARNm (perfilado de expresión) se muestran en la Figura 12.

Ejemplo 15: Uso de LTBP2 como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica en enfermedad cardiovascular (monocrotalina)

50

Ratas Sprague-Dawley macho adultas que pesaban 250 a 300 g se administraron con una única inyección subcutánea de tanto 60 mg/kg de monocrotalina como vehículo.

5 La rata tratada con monocrotalina (MCT) es un modelo animal ampliamente usado para hipertensión arterial pulmonar. Después de la inyección subcutánea, el alcaloide de pirrolizidina MCT se activa por el hígado al pirrol de MCT tóxico, que produce lesión endotelial en la vasculatura pulmonar en el plazo de algunos días con posterior remodelado de arterias pulmonares pequeñas (muscularización *de novo* e hipertrofia de la media). En el presente estudio, MCT indujo hipertensión pulmonar progresiva grave en todos los animales.

10 Cuatro semanas después de una única inyección de MCT, las ratas mostraron tensión sistólica ventricular derecha tres veces elevada (MCT de placebo: $77,62 \pm 4,17$ mm de Hg frente a control: $26,4 \pm 1,12$ mm de Hg; media \pm eem), acompañado de una reducción de la tensión arterial sistémica, índice cardíaco, oxigenación arterial y saturación de oxígeno venosa central. Según estos resultados, se observó una impresionante hipertrofia cardíaca derecha (MCT placebo de relación de ventrículo derecho/ventrículo izquierdo + septo: $0,62 \pm 0,03$ frente a control: $0,26 \pm 0,01$).

Se tomaron muestras del corazón y de plasma en Li-Heparina para el análisis de expresión cuatro semanas después de la inyección de MCT.

15 Se aisló ARN celular total con el protocolo Trizol-Reagent según las especificaciones del fabricante (Invitrogen; EE.UU.). El ARN total preparado por el protocolo Trizol-Reagent se trató con DNAsa I para eliminar contaminación de ADN genómico.

20 Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de LTBP2, ARN total de cada muestra se transcribió primero de forma inversa. 1 μ g de ARN total se transcribió de forma inversa usando el sistema de transcripción inversa ImProm-II (Promega, USA) según el protocolo del fabricante. El volumen final se ajustó a 200 μ l con agua.

25 Para la cuantificación relativa de la distribución de ARNm de LTBP2 se usó el sistema de detección de secuencias ABI 7900HT de Applied Bioscience según las especificaciones y protocolos del fabricante. Las reacciones de PCR se configuraron para cuantificar LTBP2 y el gen de mantenimiento L32. Se diseñaron cebadores directos e inversos y las sondas para LTBP2 usando el software ABI Primer Express™ de Applied Bioscience y se sintetizaron por Eurogentec (Bélgica). La secuencia del cebador directo de LTBP2 fue: Cebador1 (SEC ID N°: 5). La secuencia del cebador inverso de LTBP2 fue Cebador2 (SEC ID N°: 7). La Sonda1 (SEC ID N°: 6), marcada con FAM (éster succinimidílico de carboxifluoresceína) como colorante indicador y TAMRA (carboxitetrametilrodamina) como extintor, se usa como sonda para LTBP2. Los siguientes reactivos se prepararon en un total de 20 μ l : 1x qPCR-MasterMix (Eurogentec; Bélgica) y Sonda1 (SEC ID N°: 6), los cebadores directos e inversos de LTBP2 cada uno a 200 nM, sonda marcada con FAM/TAMRA de LTBP2 200 nM y 5 μ l de ADNc de molde. Los parámetros del ciclo térmico fueron 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de fusión a 95 °C durante 15 s e hibridación/extensión a 60 °C durante 1 min.

Cálculo de expresión relativa

35 El valor de CU (ciclo umbral) se calcula como se describe en la sección "Determinación cuantitativa de ácidos nucleicos".

$$\text{delta CU} = \text{CTLTBP2} - \text{CUI32}$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-(15-\text{deltaCU})}$$

Los resultados del perfil de cuantificación de ARNm (perfilado de expresión) se muestran en la Figura 13.

Ejemplo 16: Experimentos en micromatriz

40 Se extrajo ARN total de tejido cardíaco y se purificó usando una columna de resina de afinidad (RNeasy; Qiagen, Hilden, Alemania), se cuantificó mediante espectrofotometría (absorbancia 260 nm) y la calidad del ARN se evaluó por separación electroforética microfluidica con un bionanalizador (Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.). El ARN total purificado (1 μ g) se convirtió en ADNc usando el kit de síntesis de ADNc Superscript Choice (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), incorporando un cebador de T7-(dT)24. Entonces se purificó ADNc bicatenario por columna de resina de afinidad (Clean up Kit, Qiagen, Hilden, Alemania) con extracción con etanol. Se usó ADNc purificado como molde para la reacción de transcripción *in vitro* para la síntesis de ARNc biotinilado usando un kit de marcado de la transcripción de ARN de alto rendimiento Enzo BioArray (Affymetrix, Santa Clara, CA) y se purificó adicionalmente usando una columna de resina de afinidad (Clean up Kit, Qiagen, Hilden, Alemania). Después de la purificación, el ARNc *in vitro* se fragmentó en tampón que contenía magnesio a 95 °C durante 35 min. El ARNc fragmentado se hibridó sobre la matriz Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0. Brevemente, 15 μ g de ARNc fragmentado se añadieron junto con ARNc de control (BioB, BioC y BioD), ADN de esperma de arenque (10 mg/ml), 10% de DMSO y BSA acetilada (50 mg/ml) al tampón de hibridación. La mezcla de hibridación se calentó a 99 °C durante 5 min, se incubó a 45 °C durante

5 min, se centrifugó durante 5 min a 13.000 rpm y se inyectó en la micromatriz. Después de la hibridación a 45 °C durante 16 h girando a 60 rpm, la matriz se lavó y se tiñó con protocolos de Affymetrix Fluidics- Amplificación de anticuerpos para dianas eucariotas, y se barrió usando un escáner de micromatrices de Affymetrix (sistema GeneChip Scanner 3000 7G) a 570 nm.

5 **Ejemplo 17:** Datos de expresión de micromatrices de corazón humano de pacientes con CHF con los dispositivos de asistencia ventricular izquierda

La implantación de dispositivos de asistencia ventricular izquierda (DAVI) es frecuentemente el único medio posible de ayuda a pacientes con insuficiencia cardíaca terminal en la forma de puente para el trasplante (véase [Clegg y col. (2005)] para una revisión). Al igual que el corazón, el DAVI es una bomba. Un extremo se conecta al ventrículo izquierdo – que es la cámara del corazón que bombea sangre fuera de los pulmones y al cuerpo. El otro extremo se conecta a la aorta, la principal arteria del cuerpo. Un tubo pasa del dispositivo a través de la piel. El exterior del tubo está cubierto de un material especial para ayudar en la curación y permite que la piel vuelva a crecer. El DAVI se implanta durante cirugía a corazón abierto. Informes recientes demuestran que la ayuda de DAVI puede asociarse a remodelación adaptiva del miocardio ventricular, que incluye masa del VI, espesor de pared y diámetro de miocitos, cambios en las relaciones de presión-volumen del VI e inversión de la dilatación de la cavidad del VI reducida [Li y col. (2001)].

Se recogieron muestras de miocardio del ventrículo izquierdo durante la cirugía cardíaca de 32 pacientes con insuficiencia cardíaca en el momento del trasplante cardíaco o inserción de un dispositivo de asistencia mecánica. Se diseñan especímenes de miocardio correspondientes como muestras de pre- y post-DAVI. Todos los procedimientos que implican el uso de tejido humano fueron autorizados por el comité de ética médica del Centro de Corazón y Diabetes de Renania del Norte-Westfalia, Bad Oeynhausen, Alemania. Se obtuvo el consentimiento de los pacientes antes de la recogida de tejido. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se pulverizaron usando pistilo y mortero. El ARN total se aisló según procedimientos convencionales.

Ejemplo 18: Análisis de datos de experimentos en micromatrices

25 Los análisis de datos sin procesar y el escalado se realizaron en el software Microarray Suite 5.0 (Affymetrix), y la normalización y análisis adicionales en expressionist Pro 3.0 (Genedata). Los resultados para matrices HG-U133 Plus 2.0 se sometieron a escalado global con una intensidad diana de 100.

Se calcularon logaritmos en base 2 para todos los valores de expresión y se tomaron para el posterior análisis estadístico. Para analizar la expresión diferencial entre los dos grupos, corazones que no fallaban (N) y corazones pre-operación (P), se aplicó una prueba de Student bilateral a los valores de expresión bajo la suposición de varianzas iguales. Se tomó un valor de la p resultante de menos de o igual a 0,05 como indicador para expresión diferencial significativa.

Referencias

- EP 1 069 188
- 35 EP 1 275 733
- EP 1 308 459
- EP 1 560 025
- EP 1 612 281
- U.S. 4.522.811
- 40 U.S. 5.057.414
- U.S. 5.283.317
- U.S. 5.565.332
- U.S. 5.723.323.
- U.S. 5.747.334
- 45 U.S. 5.783.384
- U.S. 5.885.814

- U.S. 5.985.629
 WO 84/03564
 WO 93/03151
 WO 94/13804
 5 WO 00/47750
 WO 02/06492
 WO 02/26958
 WO 02/47670
 WO 03/051370
 10 WO 02/081745
 WO 2004075835
 WO 02068579
 Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ; *Nucleic Acids Res* 1997 Sep 1; 25(17): 3389-402
 15 Appa Rao y col., 1997, *Protein Expr Purif* Nov, 11 (2): 201-8
 Alpert, J. S., y col. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2000; 36:959-69
 Avalle y col., *Ann. N Y Acad.Sci.* 864:118 (1998)).
 Barnes, 2000, *Chest*, 117:10S14S
 Barrett y col., (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (Academic Press Inc. 1998).
 20 Barrett (Ed.), *Methods in Enzymology, Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases* (Academic Press Inc. 1994)
 Boersma, E., y col. *Lancet* 2002; 359:189-98
 Botstein y col., 1980, *Am J Hum Genet.* 32: 314-31
 Clegg y col. 2005, *Health Technol Assess.* Nov; 9(45):1-148
 25 Colbere-Garapin y col., 1981, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14
 Christenson, R. H. y col., *Clin. Chem.* 2001; 47:464-470
 Cunningham y Wells, *J. Mol. Biol.* 234:554 (1993).
 DesGroseillers y col. (2001), *DNA Cell Biol.* Aug;20(8):493-8.
 de Lemos, J. A., y col. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2002; 40:238-44
 30 Duveneck G.L. y col., *Analytica Chimica Acta* 469 (2002), 49-61.
 Engelhard y col., 1994, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227
 Friboulet y col., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47:229 (1994)
 Gergen y Weiss, 1992, *Am Rev Respir Dis* 146:823-824
 Gibson y col., 1996, *Genome Research* 6: 995-1001
 35 Haseloff y col., 1988, *Nature* 334, 585-591
 Heid y col., 1996, *Genome Research* 6: 986-994

- Holland y col., 1991, PNAS 88: 7276-7280
- Ifon y col. 2005, Cancer Cell Int. Jun 22;5:19.
- Jeffreys y col., 1985, Nature 316: 76-9
- Johnson y col., 1989, Endoc. Rev. 10, 317-331
- 5 Joron y col., Ann. N Y Acad. Sci. 672:216 (1992)
- Karlsson, Immunol. Methods 145:229 (1991)
- Kellogg y col., 1990, Anal. Biochem. 189:202-208
- Lam , 1997, Anticancer Drug Res. 12(3):145-67
- Li y col. 2001, Circulation. Sep 4;104(10):1147-52
- 10 Livak y col., 1995 , PCR Methods and Applications 357-362
- Logan, Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81, 3655-3659
- Lowy y col., 1980, Cell 22, 817-23
- Maddox y col., 1983, J. Exp. Med. 158, 1211-1216
- Monfardini y col., Proc. Assoc. Am. Physicians 108:420 (1996)
- 15 McConnell y col., 1992, Science 257, 1906-1912
- Nicholls y col., 1993, J. Immunol. Meth. 165, 81-91
- Newby, L. K., y col. Circulation 2001:103; 1832-7
- Pawlak M. y col., Proteomics 2(4) (2002), 383-393
- Pentecost y col. 2005, Mol Cell Endocrinol. Jun 30;238(1-2):9-25.
- 20 Piatak y col., 1993, BioTechniques 14:70-81
- Piatak y col., 1993, Science 259:1749-1754
- Porath y col., 1992, Prot. Exp. Purif. 3, 263-281
- Pfeffer y col., Circ Res. 1979 Apr;44(4):503-12.
- Roberge y col., 1995, Science 269, 202-204
- 25 Sagnella, G. A., Clinical Science 95:519-529, 1998
- Scott y Smith (1990) Science 249:386-390
- Sjolander, Urbaniczky, 1991, Anal. Chem. 63, 2338-2345
- Szabo y col., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5, 699-705
- Thomas, 1980, Proc. Nat. Acad. Sci., 77:5201-5205
- 30 Uhlmann y col., 1987, Tetrahedron. Lett. 215, 3539-3542
- Weber y col., 1990, Genomics 7: 524-30
- Wigler y col., 1977, Cell 11, 223-32
- Wigler y col., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 3567-70
- Oklu R, Hesketh R., 2000, Biochem J. Dec 15;352 Pt 3:601-10.
- 35 Saharinen J, Keski-Oja J. 2000, Mol Biol Cell. Aug;11(8):2691-704

ES 2 443 042 T3

Vehvilainen P, Hyytiainen M, Keski-Oja, 2003, J Biol Chem. Jul 4;278(27):24705-13.

Hyytiainen M, Keski-Oja J. R 2003, J Cell Biol. Dec 22;163(6):1363-74.

Shiple J, Mecham RP, Maus E, Bonadio J, Rosenbloom J, McCarthy RT, Baumann ML, Frankfater C, Segade F, Shapiro SD, 2000, Mol Cell Biol. Jul;20(13):4879-87.

5 Sinha S, Heagerty AM, Shuttleworth CA, Kieley CM., 2002, Cardiovasc Res. Mar;53(4):971-83. Watkins SJ, Jonker L, Arthur HM., 2006, Cardiovasc Res. Feb 1;69(2):432-9.

10

15

20

25

30

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer HealthCare AG

<120> LTBP2 como biomarcador, diana terapéutica y diagnóstica

5

<130> BHC 06 1 149

<160> 10

10

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 7017

<212> ADN

15

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 443 042 T3

cctcgtcccc	tctccggtaa	tgagggggct	gagctgtccc	tccgaggagg	gggcctggtg	60
tggataaaag	agacgaaaaa	gccgggggag	gtttccaaaa	ataaaaccgt	ccgggtcccc	120
ttcagacggc	tgcaggcaca	gggaggaggc	gcgaaggtgc	agcagccgtg	cgagcccagc	180
tggagtagga	gcgcggactc	gaggctcggg	gcgcgcagcc	ctcgttccgc	cgagagccgg	240
gcccccagtc	ggccgcttca	gggcccccta	gactcagaga	agctggccgc	cgggcggggc	300
cgggagaaca	gccccggggc	gtccagcgtg	ccgaccacaa	agctcttcgc	ggtgcccgcg	360
cgcaccactc	tccagccgcc	ccgcgccatg	aggccgcgga	ccaaagcccg	cagcccgggg	420
cgcgccctgc	ggaacccctg	gagaggcttc	ctgccgctca	ccctggctct	cttcgtgggc	480
gcggtcatg	cccaaaggga	ccccgtaggg	agatacgagc	cggctggttg	agacgcgaat	540
cgactgcggc	gccctggggg	cagctacccg	gcagcggctg	cagccaaggt	gtacagctctg	600
ttccgggagc	aggacgcgcc	tgtcggggc	ttgcagcccg	tggagcgggc	ccagccgggc	660
tgggggagcc	ccaggaggcc	caccgaggcg	gaggccagga	ggccgtcccg	cgcgcagcag	720
tcgcgcgctg	tccagccacc	tgcgcagacc	cggagaagca	ctcccctggg	ccagcagcaa	780
ccagcaccce	ggaccggggc	cgcgcgggct	ctcccacgcc	tggggacccc	acagcggctct	840
ggggctgcgc	ccccaacccc	gccgcgaggg	cggctcacgg	ggaggaacgt	ctgcggggga	900
cagtgtctgcc	caggatggac	aacagcaaac	agcaccaccc	actgtatcaa	accggtttgc	960
gagccgccgt	gccagaaccg	gggtccctgc	agccgcccgc	agctctgtgt	ctgcccctct	1020
ggtttccgtg	gagcccgtcg	cgaggaggtc	attcccgatg	aggaatttga	cccccagaac	1080
tccaggcttg	cacctcgacg	ctgggcccag	cgttcaccca	acctcgcgag	gagcagtgcg	1140
gctggagagg	gcaccttggc	cagagcacag	ccgccagcac	cacagtgcgc	gcccgcacca	1200
cagtgccac	cagctgggac	cctgagtggc	ctcagccaga	cccacccttc	ccagcagcac	1260
gtggggtgt	cccgcactgt	ccgaottcac	ccgactgcca	cggccagtag	ccagctctct	1320
tccaacgccc	tgccccggg	accaggcctt	gagcagagag	atggcaccca	acaggcggta	1380
cctctggagc	accctcabc	cccctggggg	ctgaacctca	cggagaaaat	caagaagatc	1440
aagatcgtct	tcactcccac	catctgcaag	cagacctgtg	cccgtggaca	ctgtgccaac	1500
agctgtgaga	ggggcgacac	caccaccctg	tacagccagg	gcggccatgg	gcacgatccc	1560
aagtctggct	tccgcatcta	tttctgccag	atcccctgcc	tgaacggagg	ccgctgcatc	1620
ggcagggacg	aatgctggtg	ccccgccaac	tccaccggga	agttctgcca	cctgcctatc	1680
ccgacgcccg	acagggagcc	tccagggagg	gggtcccgcc	ccagggcctt	gctggaagcc	1740
ccactgaagc	agtccacttt	cacactgccg	ctctccaacc	agctggcctc	cgtgaacccc	1800
tccctggtga	agggtcacat	tcaccacca	cccgaggcct	cagtgccagat	ccaccaggtg	1860
gcccaggtgc	ggggcggggg	ggaggaggcc	ctagtggaga	acagcgtgga	gaccagaccc	1920
ccgcctggc	tgcctgccag	cctgggccac	agcctctggg	acagcaacaa	catcccctgct	1980
cggctctggag	agccccctcg	gccactgccc	ccagcagcac	ccaggcctcg	aggactgctg	2040

ES 2 443 042 T3

ggccgggtgtt	acctgaacac	tgtgaacgga	cagtgtgcca	accctctgct	ggagctgact	2100
accaggagg	actgctgtgg	cagtgtggga	gccttctggg	gggtgacttt	gtgtgcccc	2160
tgcccacca	gaccagcctc	cccgtgat	gagaatggcc	agctggagtg	tcctcagggg	2220
tacaagagac	tgaacctcac	tcactgcca	gatatcaacg	agtgcctgac	cctgggctcg	2280
tgcaaggacg	cggagtgtgt	gaataccagg	ggcagctacc	tgtgcacatg	cagacctggc	2340
ctcatgctgg	atccatcgcg	gagccgctgt	gtgtcggaca	aggcaatctc	catgctgcag	2400
ggactgtgct	accggtcgct	ggggcccggc	acctgcaccc	tgcttttggc	ccagcggatc	2460
accaagcaga	tatgctgtcg	cagccgcgtg	ggcaaagcat	ggggcagcga	gtgtgagaaa	2520
tgccctctgc	ctggcacaga	ggcctcaga	gagatctgcc	ctgccggcca	cggctacacc	2580
tacgcagctg	ccgacatccg	cctgtccatg	aggaaagccg	aggaggagga	actggcaagg	2640
cccccaaggg	agcaagggca	gaggagcagc	ggggcactgc	ccgggccagc	agagaggcag	2700
ccctccggg	tcgtcacgga	cacctggctt	gaggccggga	ccatccctga	caagggtgac	2760
tctcaggctg	gccaggctac	gaccagtgtc	actcatgcac	ctgcctgggt	cacagggaat	2820
gccacaaccc	caccaatgcc	tgaacagggg	attgcagaga	tacaggaaga	acaagtgacc	2880
ccctccaccg	atgtgtggt	gacctgagc	accccaggca	ttgacagatg	cgctgctgga	2940
gccaccaacg	tctgtggccc	tggaaactgc	gtgaacctcc	ccgatggata	cagatgtgtc	3000
tcgagccctg	gctaccagct	gcaccccagc	caggcctact	gcacagatga	caacgagtgt	3060
ctgaggggacc	cctgcaaggg	aaaagggcgc	tgcatcaacc	gcgtggggtc	ctactcctgc	3120
ttctgctacc	ctggctacac	tctggccacc	tcaggggcga	ccagggagtg	tcaagatata	3180
aatgagtgtg	agcagccagg	gggtgtgcagc	ggggggcagt	gcaccaacac	cgagggctcg	3240
taccactgcg	agtgtgatca	gggctacatc	atggtcagga	aaggacactg	ccaagatata	3300
aacgaatgcc	gtcaccocgg	tacctgccct	gatgggagat	gcgtcaattc	ccctggctcc	3360
tacacttgtc	tggcctgtga	ggagggtcac	cggggccaga	gtgggagctg	tgtagatgtg	3420
aatgagtgtc	tgactcccgg	ggctctgtcc	catggaaagt	gcaccaacct	agaaggctcc	3480
ttcagatgct	cttgtgagca	gggctatgag	gtcacctcag	atgagaaggg	ctgccaagat	3540
gtggatgagt	gtgccagccg	ggcctcatgc	cccacaggcc	tctgcctcaa	cacggagggc	3600
tccttcgctc	gctctgcctg	tgagaacggg	tactgggtga	atgaagacgg	cactgcctgt	3660
gaagacctag	atgagtgtgc	cttcccggga	gtctgcccct	ccggagtctg	caccaacacg	3720
gctggctcct	tctcctgcaa	ggactgcgat	gggggctacc	ggcccagccc	cctgggtgac	3780
tcctgtgaag	atgtggatga	atgtgaagac	ccccagagca	gtgcctcggg	agggcagtg	3840
aagaacactg	tgggctecta	ccagtgcctc	tgtcccagg	gcttccagct	ggccaatggc	3900
accgtgtgtg	aggatgtgaa	tgagtgcctg	ggggaggagc	actgcgcacc	ccacggcgag	3960
tgctcaaca	gccacgggtc	ttctctctgt	ctgtgcgcgc	ctggctctgt	cagcgcagag	4020
gggggaccca	gctgccagga	tgtggacgag	tgtgccacca	cagaccctg	tgtgggaggg	4080
cactgtgtca	acaccgaggg	ctccttcaac	tgtctatgtg	agactggctt	ccagccctcc	4140
ccagagagtg	gagagtgtgt	ggatattgac	gagtgtgagg	actatggaga	cccgggtgtg	4200
ggcacctgga	agtggtgaaa	cagccctggc	tcctaccgct	gtgttctggg	ctgcccagct	4260
ggcttccaca	tggccccgaa	cggagactgc	attgacatag	acgagtgcgc	caacgacacc	4320
atgtgtggca	gccacggctt	ctgtgacaac	actgatggct	ccttccgctg	cctctgtgac	4380
cagggcttcg	agatctctcc	ctcaggctgg	gactgtgtgg	atgtgaacga	gtgtgagctt	4440
atgctggcgg	tatgtggggc	cgcgctctgt	gagaactgtg	agggctcctt	cctgtgcctc	4500
tgtgccagtg	acctggagga	gtacgatgcc	caggaggggc	actgcgccc	acggggggct	4560
ggaggtcaga	gtatgtctga	ggcccacag	ggggaccatg	ccccggcccc	caccgcgatg	4620
gactgctact	ccgggcagaa	ggccatgccc	ccctgctcca	gtgtcctggg	ccggaacacc	4680
acacaggctg	aatgctgctg	caccagggc	gctagctggg	gagatgcctg	tgacctctgc	4740
ccgtctgagg	actcagctga	attcagcgag	atctgcctca	gtggaaaagg	ctacattcct	4800
gtggaaggag	cctggacgtt	tggacagacc	atgtacacag	atgcggatga	gtgtgtgata	4860
ttcgggctcg	gtctctgccc	gaacggccgg	tgcttcaaca	ccgtgcctgg	ttatgtctgc	4920
ctgtgcaatc	ccggcttcca	ctacgatgct	tcccacaaga	agtggtgagga	tcacgatgag	4980
tgccaggacc	tggcctgtga	gaatggcgag	tcgtcaaca	cggagggctc	cttccactgc	5040
ttctgcagcc	ccccgctcac	cctggacctc	agccagcagc	gctgcctgaa	cagcaccagc	5100
agcaggagg	acctccctga	ccacgacatc	cacatggaca	tctgctggaa	aaaagtccac	5160

ES 2 443 042 T3

```

aatgatgtgt gcagcgaacc cctgcgtggg caccgcacca cctacacgga atgctgctgc 5220
caggacggcg aggctggag ccagcagtggt gctctgtgtc ccccgaggag ctctgaggtc 5280
tatgctcage tgtgcaacgt ggctcgatt gaggcagagc gggaggccgg ggtccacttc 5340
cggccaggct atgagtatgg ccccgggccc gatgacctgc actacagcat ctatggccca 5400
gatggggccc ccttctacaa ctacctgggc cccgaggaca ccgtccctga gctgccttc 5460
cccaacacag cgggtcactc agcggaccgc acaccatcc ttgagtctcc tttgcagccc 5520
tcagaactcc agccccacta cgtggccagc catccagagc ccccagccgg ctctgaaggg 5580
cttcaggcgg aggagtgcgg catcctgaac ggctgtgaga atggccgctg tgtgcgctg 5640
cgggagggct acacctgtga ctgttttgag ggcttccagc tggatgcggc ccacatggcc 5700
tgcgtagatg tgaatgagtg tgatgacttg aacgggcctg ctgtgctctg tgtccatggt 5760
tactgcgaga acacagaggg ctctaccgc tgccactgct ccccgggata tgtggctgag 5820
gcaggggccc cccactgcac tgccaaggag tagcagtcag gggtcagtggt ggcaactacc 5880
tggaaatggc ctccagtcac aggcaggggc cttgaggatg atttcctagc tgggaagaca 5940
ccgtgacatc aggccagagg tttccaatca gccttgccct ctttcatctc tcccagctta 6000
gcctctggct gtaagcttcg gtcattgcct ccattgccct gcttggtcga agcaccacca 6060
atcgctttaa tgcttcagcc accgcatgag gccctgtcca ccaccttcc tggccttgc 6120
atgggatgct taccaaagga tggccctcat ccacctccc aagctgtgcg agcatgcaag 6180
gccccatgga ctcacactgc agacaccctc ttccagccac aatccaccat catcctgacg 6240
atccccaac tgggacagag gctacatctg cctaggggag gtcctcaga atctgtggag 6300
caagaaagga tttggggaag cttggggact gactccagag cccctccta agaaccatca 6360
ccaccactca gccaatctgt tctgggccct gattttgcca cacctccatc ctgtagccca 6420
ttctctgacc ccaaggagtg gcagaagatc cttcactca gagaagcaag gctgatatta 6480
gcttgttgaa tgtaagagac acaaatgaag aagaacaaag agcctgagaa agcagcaaga 6540
ggacatgatg aaaaatacgt ggagttagtg agaaagggga gccaaaggctt tatacgtcta 6600
aagaaaatat tcagtagctg aatccgccc gtgatagcct gtgggcacca gcagcaaggg 6660
ctgccatggg atacagcacc catctacaaa gacctctatt acataaacac tgcttcttac 6720
aggaaacaaa cctctcttg gatctccttt tgtgaaaacc agtttgatgt gctaaaagta 6780
aaaagtctat tttccagtg ggtctgttc agaagcagcc agatttccaa tgttgtttt 6840
cccctcact cagaaacccc tgcccttcc cttcagaaaa cgatggcagg cattcctctg 6900
agtttacaag cagagactca ctccaacca aactagctgg gagttcagaa ccatgggtgga 6960
ataaagaaat gtgcatctgg tccaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaa 7017

```

<210> 2

<211> 6442

5

<212> ADN

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

ES 2 443 042 T3

agaggteccct agacgggaag gggcacgccg ccaggcgggga ctgtggagct aacgatggag 60
 agcacctccc tgcgaggtct ccggtgccc aagctctgca gccactctgg cgccatgagg 120
 gcgccgacca ccgtccgctg ctccggacgc atccaaaggg cgcgttggag gggcttcctg 180
 ccacttgctc tggctctctt gatggggaca agtcatgccc aaagggattc cgtggggaga 240
 tacgaaccag ctagccggga tgccaatcgg ttgtggcgcc ccgtgggcaa ccaccccgca 300
 gcggctgcag ccaaggtgta cagtctgttc cgagagcccg acgcgcccgt ccccggtctg 360
 tcgccctctg agtggaatca gccgggccag gggatccctg ggaggctcgc agagggccgag 420
 gccaggagac cgtcccagc ccagcagctg cgtcgagtcc agtcacctgt ccagactcgg 480
 agaagcaatc cccgaggcca gcagccacca gcagcccgga ccgcacattc cgtcgtgcgc 540
 ctggcgacc ctcagcgacc cgcggctgca cgcggagggc ggctcaccgg gagaaatgtc 600
 tcggggggac agtgctgcc tggatggacg acatcgaaca gcaccaacca ctgtatcaaa 660
 cctgtgtgtc agcctccctg tcagaaccgg ggctcctgca gccggcccca gctctgcatc 720
 tgccgttctg gcttccgtgg ggcacgctgc gaggaggtca tccctgagga ggagtttgac 780
 cctcagaatg ccaggcctgt gccagacgc tcagtggagg gagcacctgg ccctcacagg 840
 agcagcgagg ccagaggaag tctagtgacc agaatacagc cgctgctacc accactacca 900

ES 2 443 042 T3

ccacctccat ctaggacct cagccagacc cgtcccctgc agcagcatgc aggactgtcc 960
 agaacagttc gtcgttatcc ggccactggt accaatggcc aactgatgtc caacgctctg 1020
 ccttcaggac caggacctga gctgagagac agcagccaac aggcagcaca catgaacct 1080
 ctctcacacc cctgggggct gaacctcacc gagaaaatca agaagattaa ggtcgtcttc 1140
 actcccacca tctgcaagca gacctgtgcc cggggccgct gtgccaacac gtgtgagaag 1200
 ggtgacacca ccacctgta cagttagggc ggccatgggc atgaccccaa gtctggcttc 1260
 cgtatctatt tctgcaaat cccctgctgt aatggaggcc gctgcatggc cggggacgag 1320
 tgctgggtgc cagccaactc tacagggaag ttctgccatc tgctgtccc acagccagac 1380
 agggagcctc caggacgagg ctcccagcac agagcctgc tggaggggcc attgaagcaa 1440
 tccaccttca cgtgcccctc ctccaaccag ctggcctctg tgaacccctc gctgggtgaa 1500
 gtacaaatgc agcaccgccc tgaggcctcc gtgcagatcc accagggtgc cgggtccgg 1560
 ggtgaggtgg acctgtgcc agaggacaac agtgtggaga ccagagcctc tcatcgcccc 1620
 catggcagct caggccacag ccaactgggc agcaacagca taccgctcgc ggctggagag 1680
 gccctcggc caccaccagt gccgtccagg cattatggac ttctgggcca gtgtacctg 1740
 agcacggtga atggacagt tgctaaccac ctagggggagc tgacttctca ggaagactgc 1800
 tgtggcagtg tggggacttc ttgggggggt acttctctgt ccccatgccc acccagacca 1860
 gctttccccc tgattgaaaa cggccagctg gagtgtcccc aagggtataa gagactaaac 1920
 ctacagcatt gccaaagacat caatgagtgc ctgacctggt gctgtgcaa ggattcagag 1980
 tgtgtgaaca ccaggggcag ctacctgtgc acctgacagg ccggcctcat gctggatcca 2040
 tcaaggagcc gctgtgtatc ggacaaggct gtctccatga aacagggact ctgttaccgc 2100
 tcaatyygtl ctggcacctg caccctgcct ttggtacaac ggatcaccaa gcagatgac 2160
 tgttgcagcc gtgtgggcaa agcctggggc agcaaatgtg aacactgccc cctgctggc 2220
 acagaagcct tcagggagat ctgccctgct ggccatgget acgcctactc aagctcagac 2280
 atccgctgt ctatgaggaa agctgaggaa gaggaactgg ctagccccgt aagggaacag 2340
 agacagcaga gcagtggacc cccacctggg gcagcagaaa ggcagccact ccgggcagcc 2400
 actgccacct ggatgagggc tgagaccctc cctgacaaa gtgactctcg ggctattcag 2460
 attacaacca gtgctcccca cctacctgcc cgggtaccag gggatgccac tggaaagacca 2520
 acgccatcat tgcttgaca gggcattcca gagggtccag cagaagagca ggtgatccct 2580
 tccagtgatg tcctgggtgac gcacggctcc ccaggctttg atccatgttt cgctggagcc 2640
 tccaacatct gtggcccctg gacctgtgtg aagctcccaa atggatacag atgtgtctcg 2700
 agccctgggt accagctaca ccccagccag gactactgta ctgatgaca cgagtgtctg 2760
 aggaacccct gtgaaggag agggcgctgt gtcaacagtg tgggtccta ctctgcctc 2820
 tgctaccag gctacacact agccacccta ggagacacac aggagtgcga agatgtggat 2880
 gagtgtgagc agccgggggt gtgcagcggg ggacgatgca gcaaacactga gggctcgtac 2940
 cactgcgagt gtgatcaggg ctacgtcatg gtcagaagag gacactgcca agatatcaac 3000
 gaatgccgtc acctgggtac ctgccctgat gggagatgag tcaactcccc tggctcctac 3060
 acttgtctgg cctgtgagga gggctacata gggcagagcg ggaactgtgt agatatgaat 3120
 gagtgtctga cccccggat atgtgcccat ggaaggtgca tcaacatgga aggtccttt 3180
 agatgtctct gtgagccagg ctatgagctc accccagaca agaagggctg ccgagatgtg 3240
 gacgagtgtg ccagccgagc ctcatgcccc accggcctct gcctcaacac ggagggctcc 3300
 ttcacctgct cagcctgtca gagtgggtac tgggtgaacy aayatggcac tgctgtgaa 3360
 gacctggatg aatgtgcctt ccccggagtc tgcccacag gctctgcaac caaactgtg 3420
 ggctcctct cctgcaagga ctgagacagg ggcttcgggc ccagcccctt gggcaacagc 3480
 tgtgaagatg tggatgagtg tgaaggctcc cagaacagct gcctgggagg cgagtgcag 3540
 aacacagatg gttcctacca gtgctctgt ccccagggtt tccagctggc caatggcacc 3600
 gtgtgtgagg atgtggaaga atgtgttggg gaagaacact gcgctcctca tggcgaatgc 3660
 ctcaacagcc cggggctcct cttctgtctc tgtgcaccgc gctttgctag tgctgagggg 3720
 ggcaccagat gccaggatgt tgatgaatgt gcaaccacag agccgtgtct gggaggacac 3780
 tgtgtcaaca ccgagggctc cttcaactgt ctgtgtgaga ctggcttcca gcccgccca 3840
 gacagtggag agtgtgtgga catagatgaa tgtgcaaatg atactgtgtg tgggaacct 3900
 ggcttctgtg acaatacggg tggctccttc cgctgctgt gtgaccaggg cttcgagacc 3960
 tcacctcag gctgggagtg tgttgatgtg aacgagtggt agctcatgct ggcagtgtgt 4020

ES 2 443 042 T3

ggggatgcac tctgcgagaa cgtggaaggc tccttcctgt gcctttgtgc cagtgaacct 4080
 gaggagtatg atgcagaaga aggacactgc cgtcctcggg tggctggagc tcagagaatc 4140
 ccagagggtc caacagagga gcaggctgca ggccttaccg gcatggagtg ctatgctgaa 4200
 cacaatgggt gtctctccatg ctctcaaadc ttggggccaga actccacaca ggctgagtgc 4260
 tgctcgaccg aggggtgccag atggggggaa acctgtgatc cctgcccacg tgaggactca 4320
 gtggaattca gtgagctgtg cccagtggtt caaggttaca tcccagtgga aggggctggg 4380
 acatttgagc aagccatgta tacagatgcc gacgagtgca tactgtttgg gcctgctctc 4440
 tgccagaatg gccgatgcct caacacagtg cctggctaca tttgcctgtg caaccctggc 4500
 taccactatg atgccgtcag caggaagtgc caggatcaca acgaatgccg ggacttggcc 4560
 tgtgagaacg gcgagtgtgt gaacacagaa ggctccttcc actgcttctg cagtcccccc 4620
 ctcatcctag acctcagcgg acagcgtgtg gtgaacagta ccagcagctc agaggacttc 4680
 cctgaccatg acatccacat ggacatctgc tggaaaaaag tcaccaatga cgtgtgcagc 4740
 cagcccttgc gtgggcacca tactacctat acagagtgtt gctgccaaga cggggaggcc 4800
 tggagccagc agtgtgtctt gtgccccccc aggagctctg aggtctatgc tcagctgtgc 4860
 aatgtggctc ggattgaggc agagagggaa gcagggatcc acttccggcc aggatatgag 4920
 tatggccctg gccagatgta tctacctgaa accctctacg gccagatgg agcccccttc 4980
 tataactacc tgggcccctga ggacactgtt cctgagcctc ccttctccaa cacagccagt 5040
 catttgggag acaacacacc catccttgag cctcccctgc agccctctga acttcagccc 5100
 ccagccatc agaacccccct ggcttctctc gaaggccttc aggtgagga atgtggctc 5160
 ctgaaatggg gtgagaatgg ccgctgtgtg cgtgtgcgag agggctacac ttgtgactgc 5220
 tttgaaggct tccagctgga tacagccctc atggcctgtg tggatgtgaa tgagtgtgaa 5280
 gacctgaacg gcgctgcgag actctgtgag catggtcact gcgagaacac agaggggtcc 5340
 tatcgctgcc actgttcccc tggttacgtg gcagagcccc ggccccca ca ctgtgcagcc 5400
 aaggagttag agtgagagat catggtgggc agctatgtgg aaatggctat cagccatagg 5460
 ctggggactt aaggttgctt ccctagctgg gaagacgtga ctgggaagac cccgtgatgc 5520
 catcaggcca gggctctgga gccagttcc gccagcctcg cctctctttt atctcttccg 5580
 gcttaactct ggggtgtaat tccgtcactg cctctatgcc actgcttggc tcagacacca 5640
 caaatatctt aatgctttag cactggccg tgagacacag cccacagtct gtcctcgggg 5700
 ccacacttta gagcgcctat cagaagagtc ctctgtcact cctcttaggc tgtgcagaca 5760
 ctgcaggcac ccccttccat ctgtgatcta cacatcatct cgatggttct gtaacgggga 5820
 cagtggctac atccacctgg gtagggccct tcacagtga tggagcagga gagggctctg 5880
 ggagttagct caatgccacc tctcagaacc accaccagca ctgggtggcg tgagttcttt 5940
 ttgctactcc tccatcccat agacagttct gcggccccga gaagggacca gtttccctca 6000
 cctcagagga tgaagactaa tactaacttg ctgagtgtaa gaaacgaaag aagaggaata 6060
 acgagtctga gaaagtgtgg caagagagtg atacggaaaa catgggagtc catatgaaag 6120
 gaggagccaa gagttagaca aaacacgaag tcgctttggg caaatcagtc caagcctcct 6180
 tagagcttct gtgtgcctgc agggaggctc gccacaagct ctggcgccca tctgcaaaca 6240
 cctttattag gctcatctgt tccccacag aaaacctaaa tagatggcct taacaatata 6300
 aaggcagagc aagccagatt tttcaaagt gtctctctcc tccacttcag aagcacttgc 6360
 ccttgcttcc tcttaacaca tgcacttcca caccagctag ctgggggttc aggagcgtgg 6420
 gggaataaaa tgttcatctg cc 6442

<210> 3

<211> 1821

5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Pro Arg Thr Lys Ala Arg Ser Pro Gly Arg Ala Leu Arg Asn
 1 5 10 15
 Pro Trp Arg Gly Phe Leu Pro Leu Thr Leu Ala Leu Phe Val Gly Ala
 20 25 30

10

ES 2 443 042 T3

Gly His Ala Gln Arg Asp Pro Val Gly Arg Tyr Glu Pro Ala Gly Gly
 35 40 45
 Asp Ala Asn Arg Leu Arg Arg Pro Gly Gly Ser Tyr Pro Ala Ala Ala
 50 55 60
 Ala Ala Lys Val Tyr Ser Leu Phe Arg Glu Gln Asp Ala Pro Val Ala
 65 70 75 80
 Gly Leu Gln Pro Val Glu Arg Ala Gln Pro Gly Trp Gly Ser Pro Arg
 85 90 95
 Arg Pro Thr Glu Ala Glu Ala Arg Arg Pro Ser Arg Ala Gln Gln Ser
 100 105 110
 Arg Arg Val Gln Pro Pro Ala Gln Thr Arg Arg Ser Thr Pro Leu Gly
 115 120 125
 Gln Gln Gln Pro Ala Pro Arg Thr Arg Ala Ala Pro Ala Leu Pro Arg
 130 135 140
 Leu Gly Thr Pro Gln Arg Ser Gly Ala Ala Pro Pro Thr Pro Pro Arg
 145 150 155 160
 Gly Arg Leu Thr Gly Arg Asn Val Cys Gly Gly Gln Cys Cys Pro Gly
 165 170 175
 Trp Thr Thr Ala Asn Ser Thr Asn His Cys Ile Lys Pro Val Cys Glu
 180 185 190
 Pro Pro Cys Gln Asn Arg Gly Ser Cys Ser Arg Pro Gln Leu Cys Val
 195 200 205
 Cys Arg Ser Gly Phe Arg Gly Ala Arg Cys Glu Glu Val Ile Pro Asp
 210 215 220
 Glu Glu Phe Asp Pro Gln Asn Ser Arg Leu Ala Pro Arg Arg Trp Ala
 225 230 235 240
 Glu Arg Ser Pro Asn Leu Arg Arg Ser Ser Ala Ala Gly Glu Gly Thr
 245 250 255
 Leu Ala Arg Ala Gln Pro Pro Ala Pro Gln Ser Pro Pro Ala Pro Gln
 260 265 270
 Ser Pro Pro Ala Gly Thr Leu Ser Gly Leu Ser Gln Thr His Pro Ser
 275 280 285
 Gln Gln His Val Gly Leu Ser Arg Thr Val Arg Leu His Pro Thr Ala
 290 295 300

ES 2 443 042 T3

Thr Ala Ser Ser Gln Leu Ser Ser Asn Ala Leu Pro Pro Gly Pro Gly
305 310 315 320

Leu Glu Gln Arg Asp Gly Thr Gln Gln Ala Val Pro Leu Glu His Pro
325 330 335

Ser Ser Pro Trp Gly Leu Asn Leu Thr Glu Lys Ile Lys Lys Ile Lys
340 345 350

Ile Val Phe Thr Pro Thr Ile Cys Lys Gln Thr Cys Ala Arg Gly His
355 360 365

Cys Ala Asn Ser Cys Glu Arg Gly Asp Thr Thr Thr Leu Tyr Ser Gln
370 375 380

Gly Gly His Gly His Asp Pro Lys Ser Gly Phe Arg Ile Tyr Phe Cys
385 390 395 400

Gln Ile Pro Cys Leu Asn Gly Gly Arg Cys Ile Gly Arg Asp Glu Cys
405 410 415

Trp Cys Pro Ala Asn Ser Thr Gly Lys Phe Cys His Leu Pro Ile Pro
420 425 430

Gln Pro Asp Arg Glu Pro Pro Gly Arg Gly Ser Arg Pro Arg Ala Leu
435 440 445

Leu Glu Ala Pro Leu Lys Gln Ser Thr Phe Thr Leu Pro Leu Ser Asn
450 455 460

Gln Leu Ala Ser Val Asn Pro Ser Leu Val Lys Val His Ile His His
465 470 475 480

Pro Pro Glu Ala Ser Val Gln Ile His Gln Val Ala Gln Val Arg Gly
485 490 495

Gly Val Glu Glu Ala Leu Val Glu Asn Ser Val Glu Thr Arg Pro Pro
500 505 510

Pro Trp Leu Pro Ala Ser Pro Gly His Ser Leu Trp Asp Ser Asn Asn
515 520 525

Ile Pro Ala Arg Ser Gly Glu Pro Pro Arg Pro Leu Pro Pro Ala Ala
530 535 540

Pro Arg Pro Arg Gly Leu Leu Gly Arg Cys Tyr Leu Asn Thr Val Asn
545 550 555 560

Gly Gln Cys Ala Asn Pro Leu Leu Glu Leu Thr Thr Gln Glu Asp Cys
565 570 575

Cys Gly Ser Val Gly Ala Phe Trp Gly Val Thr Leu Cys Ala Pro Cys

ES 2 443 042 T3

Pro Asp Gly Tyr Arg Cys Val Cys Ser Pro Gly Tyr Gln Leu His Pro
 865 870 875 880
 Ser Gln Ala Tyr Cys Thr Asp Asp Asn Glu Cys Leu Arg Asp Pro Cys
 885 890 895
 Lys Gly Lys Gly Arg Cys Ile Asn Arg Val Gly Ser Tyr Ser Cys Phe
 900 905 910
 Cys Tyr Pro Gly Tyr Thr Leu Ala Thr Ser Gly Ala Thr Gln Glu Cys
 915 920 925
 Gln Asp Ile Asn Glu Cys Glu Gln Pro Gly Val Cys Ser Gly Gly Gln
 930 935 940
 Cys Thr Asn Thr Glu Gly Ser Tyr His Cys Glu Cys Asp Gln Gly Tyr
 945 950 955 960
 Ile Met Val Arg Lys Gly His Cys Gln Asp Ile Asn Glu Cys Arg His
 965 970 975
 Pro Gly Thr Cys Pro Asp Gly Arg Cys Val Asn Ser Pro Gly Ser Tyr
 980 985 990
 Thr Cys Leu Ala Cys Glu Glu Gly Tyr Arg Gly Gln Ser Gly Ser Cys
 995 1000 1005
 Val Asp Val Asn Glu Cys Leu Thr Pro Gly Val Cys Ala His Gly
 1010 1015 1020
 Lys Cys Thr Asn Leu Glu Gly Ser Phe Arg Cys Ser Cys Glu Gln
 1025 1030 1035
 Gly Tyr Glu Val Thr Ser Asp Glu Lys Gly Cys Gln Asp Val Asp
 1040 1045 1050
 Glu Cys Ala Ser Arg Ala Ser Cys Pro Thr Gly Leu Cys Leu Asn
 1055 1060 1065
 Thr Glu Gly Ser Phe Ala Cys Ser Ala Cys Glu Asn Gly Tyr Trp
 1070 1075 1080
 Val Asn Glu Asp Gly Thr Ala Cys Glu Asp Leu Asp Glu Cys Ala
 1085 1090 1095
 Phe Pro Gly Val Cys Pro Ser Gly Val Cys Thr Asn Thr Ala Gly
 1100 1105 1110
 Ser Phe Ser Cys Lys Asp Cys Asp Gly Gly Tyr Arg Pro Ser Pro
 1115 1120 1125

ES 2 443 042 T3

Leu Gly Asp Ser Cys Glu Asp Val Asp Glu Cys Glu Asp Pro Gln
 1130 1135 1140
 Ser Ser Cys Leu Gly Gly Glu Cys Lys Asn Thr Val Gly Ser Tyr
 1145 1150 1155
 Gln Cys Leu Cys Pro Gln Gly Phe Gln Leu Ala Asn Gly Thr Val
 1160 1165 1170
 Cys Glu Asp Val Asn Glu Cys Met Gly Glu Glu His Cys Ala Pro
 1175 1180 1185
 His Gly Glu Cys Leu Asn Ser His Gly Ser Phe Phe Cys Leu Cys
 1190 1195 1200
 Ala Pro Gly Phe Val Ser Ala Glu Gly Gly Thr Ser Cys Gln Asp
 1205 1210 1215
 Val Asp Glu Cys Ala Thr Thr Asp Pro Cys Val Gly Gly His Cys
 1220 1225 1230
 Val Asn Thr Glu Gly Ser Phe Asn Cys Leu Cys Glu Thr Gly Phe
 1235 1240 1245
 Gln Pro Ser Pro Glu Ser Gly Glu Cys Val Asp Ile Asp Glu Cys
 1250 1255 1260
 Glu Asp Tyr Gly Asp Pro Val Cys Gly Thr Trp Lys Cys Glu Asn
 1265 1270 1275
 Ser Pro Gly Ser Tyr Arg Cys Val Leu Gly Cys Gln Pro Gly Phe
 1280 1285 1290
 His Met Ala Pro Asn Gly Asp Cys Ile Asp Ile Asp Glu Cys Ala
 1295 1300 1305
 Asn Asp Thr Met Cys Gly Ser His Gly Phe Cys Asp Asn Thr Asp
 1310 1315 1320
 Gly Ser Phe Arg Cys Leu Cys Asp Gln Gly Phe Glu Ile Ser Pro
 1325 1330 1335
 Ser Gly Trp Asp Cys Val Asp Val Asn Glu Cys Glu Leu Met Leu
 1340 1345 1350
 Ala Val Cys Gly Ala Ala Leu Cys Glu Asn Val Glu Gly Ser Phe
 1355 1360 1365
 Leu Cys Leu Cys Ala Ser Asp Leu Glu Glu Tyr Asp Ala Gln Glu
 1370 1375 1380
 Gly His Cys Arg Pro Arg Gly Ala Gly Gly Gln Ser Met Ser Glu

ES 2 443 042 T3

1385						1390						1395			
Ala	Pro	Thr	Gly	Asp	His	Ala	Pro	Ala	Pro	Thr	Arg	Met	Asp	Cys	
1400						1405						1410			
Tyr	Ser	Gly	Gln	Lys	Gly	His	Ala	Pro	Cys	Ser	Ser	Val	Leu	Gly	
1415						1420						1425			
Arg	Asn	Thr	Thr	Gln	Ala	Glu	Cys	Cys	Cys	Thr	Gln	Gly	Ala	Ser	
1430						1435						1440			
Trp	Gly	Asp	Ala	Cys	Asp	Leu	Cys	Pro	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Glu	
1445						1450						1455			
Phe	Ser	Glu	Ile	Cys	Pro	Ser	Gly	Lys	Gly	Tyr	Ile	Pro	Val	Glu	
1460						1465						1470			
Gly	Ala	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Thr	Met	Tyr	Thr	Asp	Ala	Asp	Glu	
1475						1480						1485			
Cys	Val	Ile	Phe	Gly	Pro	Gly	Leu	Cys	Pro	Asn	Gly	Arg	Cys	Leu	
1490						1495						1500			
Asn	Thr	Val	Pro	Gly	Tyr	Val	Cys	Leu	Cys	Asn	Pro	Gly	Phe	His	
1505						1510						1515			
Tyr	Asp	Ala	Ser	His	Lys	Lys	Cys	Glu	Asp	His	Asp	Glu	Cys	Gln	
1520						1525						1530			
Asp	Leu	Ala	Cys	Glu	Asn	Gly	Glu	Cys	Val	Asn	Thr	Glu	Gly	Ser	
1535						1540						1545			
Phe	His	Cys	Phe	Cys	Ser	Pro	Pro	Leu	Thr	Leu	Asp	Leu	Ser	Gln	
1550						1555						1560			
Gln	Arg	Cys	Met	Asn	Ser	Thr	Ser	Ser	Thr	Glu	Asp	Leu	Pro	Asp	
1565						1570						1575			
His	Asp	Ile	His	Met	Asp	Ile	Cys	Trp	Lys	Lys	Val	Thr	Asn	Asp	
1580						1585						1590			
Val	Cys	Ser	Glu	Pro	Leu	Arg	Gly	His	Arg	Thr	Thr	Tyr	Thr	Glu	
1595						1600						1605			
Cys	Cys	Cys	Gln	Asp	Gly	Glu	Ala	Trp	Ser	Gln	Gln	Cys	Ala	Leu	
1610						1615						1620			
Cys	Pro	Pro	Arg	Ser	Ser	Glu	Val	Tyr	Ala	Gln	Leu	Cys	Asn	Val	
1625						1630						1635			
Ala	Arg	Ile	Glu	Ala	Glu	Arg	Glu	Ala	Gly	Val	His	Phe	Arg	Pro	
1640						1645						1650			

ES 2 443 042 T3

Gly Tyr Glu Tyr Gly Pro Gly Pro Asp Asp Leu His Tyr Ser Ile
 1655 1660 1665

Tyr Gly Pro Asp Gly Ala Pro Phe Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Glu
 1670 1675 1680

Asp Thr Val Pro Glu Pro Ala Phe Pro Asn Thr Ala Gly His Ser
 1685 1690 1695

Ala Asp Arg Thr Pro Ile Leu Glu Ser Pro Leu Gln Pro Ser Glu
 1700 1705 1710

Leu Gln Pro His Tyr Val Ala Ser His Pro Glu Pro Pro Ala Gly
 1715 1720 1725

Phe Glu Gly Leu Gln Ala Glu Glu Cys Gly Ile Leu Asn Gly Cys
 1730 1735 1740

Glu Asn Gly Arg Cys Val Arg Val Arg Glu Gly Tyr Thr Cys Asp
 1745 1750 1755

Cys Phe Glu Gly Phe Gln Leu Asp Ala Ala His Met Ala Cys Val
 1760 1765 1770

Asp Val Asn Glu Cys Asp Asp Leu Asn Gly Pro Ala Val Leu Cys
 1775 1780 1785

Val His Gly Tyr Cys Glu Asn Thr Glu Gly Ser Tyr Arg Cys His
 1790 1795 1800

Cys Ser Pro Gly Tyr Val Ala Glu Ala Gly Pro Pro His Cys Thr
 1805 1810 1815

Ala Lys Glu
 1820

<210> 4

<211> 1764

5

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Arg Ala Pro Thr Thr Val Arg Cys Ser Gly Arg Ile Gln Arg Ala
 1 5 10 15

Arg Trp Arg Gly Phe Leu Pro Leu Val Leu Ala Leu Leu Met Gly Thr
 20 25 30

Ser His Ala Gln Arg Asp Ser Val Gly Arg Tyr Glu Pro Ala Ser Arg
 35 40 45

Asp Ala Asn Arg Leu Trp Arg Pro Val Gly Asn His Pro Ala Ala Ala

10

ES 2 443 042 T3

50	55	60																			
Ala	Ala	Lys	Val	Tyr	Ser	Leu	Phe	Arg	Glu	Pro	Asp	Ala	Pro	Val	Pro						
65					70					75					80						
Gly	Leu	Ser	Pro	Ser	Glu	Trp	Asn	Gln	Pro	Gly	Gln	Gly	Ile	Pro	Gly						
				85					90					95							
Arg	Leu	Ala	Glu	Ala	Glu	Ala	Arg	Arg	Pro	Ser	Arg	Ala	Gln	Gln	Leu						
			100						105					110							
Arg	Arg	Val	Gln	Ser	Pro	Val	Gln	Thr	Arg	Arg	Ser	Asn	Pro	Arg	Gly						
		115						120					125								
Gln	Gln	Pro	Pro	Ala	Ala	Arg	Thr	Ala	His	Ser	Val	Val	Arg	Leu	Ala						
		130					135						140								
Thr	Pro	Gln	Arg	Pro	Ala	Ala	Ala	Arg	Arg	Gly	Arg	Leu	Thr	Gly	Arg						
145					150					155					160						
Asn	Val	Cys	Gly	Gly	Gln	Cys	Cys	Pro	Gly	Trp	Thr	Thr	Ser	Asn	Ser						
			165						170					175							
Thr	Asn	His	Cys	Ile	Lys	Pro	Val	Cys	Gln	Pro	Pro	Cys	Gln	Asn	Arg						
			180					185					190								
Gly	Ser	Cys	Ser	Arg	Pro	Gln	Leu	Cys	Ile	Cys	Arg	Ser	Gly	Phe	Arg						
		195					200						205								
Gly	Ala	Arg	Cys	Glu	Glu	Val	Ile	Pro	Glu	Glu	Glu	Phe	Asp	Pro	Gln						
	210					215						220									
Asn	Ala	Arg	Pro	Val	Pro	Arg	Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro						
225					230					235					240						
His	Arg	Ser	Ser	Glu	Ala	Arg	Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Arg	Ile	Gln	Pro						
				245					250					255							
Leu	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Arg	Thr	Leu	Ser	Gln	Thr						
			260						265					270							
Arg	Pro	Leu	Gln	Gln	His	Ala	Gly	Leu	Ser	Arg	Thr	Val	Arg	Arg	Tyr						
		275					280						285								
Pro	Ala	Thr	Gly	Thr	Asn	Gly	Gln	Leu	Met	Ser	Asn	Ala	Leu	Pro	Ser						
		290				295						300									
Gly	Pro	Gly	Pro	Glu	Leu	Arg	Asp	Ser	Ser	Gln	Gln	Ala	Ala	His	Met						
305				310						315					320						
Asn	His	Leu	Ser	His	Pro	Trp	Gly	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Lys	Ile	Lys						
				325					330					335							

ES 2 443 042 T3

Lys Ile Lys Val Val Phe Thr Pro Thr Ile Cys Lys Gln Thr Cys Ala
 340 345 350
 Arg Gly Arg Cys Ala Asn Thr Cys Glu Lys Gly Asp Thr Thr Thr Leu
 355 360 365
 Tyr Ser Gln Gly Gly His Gly His Asp Pro Lys Ser Gly Phe Arg Ile
 370 375 380
 Tyr Phe Cys Gln Ile Pro Cys Leu Asn Gly Gly Arg Cys Ile Gly Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Cys Trp Cys Pro Ala Asn Ser Thr Gly Lys Phe Cys His Leu
 405 410 415
 Pro Val Pro Gln Pro Asp Arg Glu Pro Pro Gly Arg Gly Ser Gln His
 420 425 430
 Arg Ala Leu Leu Glu Gly Pro Leu Lys Gln Ser Thr Phe Thr Leu Pro
 435 440 445
 Leu Ser Asn Gln Leu Ala Ser Val Asn Pro Ser Leu Val Lys Val Gln
 450 455 460
 Met Gln His Pro Pro Glu Ala Ser Val Gln Ile His Gln Val Ala Arg
 465 470 475 480
 Val Arg Gly Glu Val Asp Pro Val Pro Glu Asp Asn Ser Val Glu Thr
 485 490 495
 Arg Ala Ser His Arg Pro His Gly Ser Ser Gly His Ser His Trp Ala
 500 505 510
 Ser Asn Ser Ile Pro Ala Arg Ala Gly Glu Ala Pro Arg Pro Pro Pro
 515 520 525
 Val Pro Ser Arg His Tyr Gly Leu Leu Gly Gln Cys Tyr Leu Ser Thr
 530 535 540
 Val Asn Gly Gln Cys Ala Asn Pro Leu Gly Glu Leu Thr Ser Gln Glu
 545 550 555 560
 Asp Cys Cys Gly Ser Val Gly Thr Ser Trp Gly Val Thr Ser Cys Ala
 565 570 575
 Pro Cys Pro Pro Arg Pro Ala Phe Pro Val Ile Glu Asn Gly Gln Leu
 580 585 590
 Glu Cys Pro Gln Gly Tyr Lys Arg Leu Asn Leu Ser His Cys Gln Asp
 595 600 605

ES 2 443 042 T3

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

Asn Thr Arg Gly Ser Tyr Leu Cys Thr Cys Arg Pro Gly Leu Met Leu
625 630 635 640

Asp Pro Ser Arg Ser Arg Cys Val Ser Asp Lys Ala Val Ser Met Lys
645 650 655

Gln Gly Leu Cys Tyr Arg Ser Met Val Ser Gly Thr Cys Thr Leu Pro
660 665 670

Leu Val Gln Arg Ile Thr Lys Gln Ile Cys Cys Cys Ser Arg Val Gly
675 680 685

Lys Ala Trp Gly Ser Lys Cys Glu His Cys Pro Leu Pro Gly Thr Glu
690 695 700

Ala Phe Arg Glu Ile Cys Pro Ala Gly His Gly Tyr Ala Tyr Ser Ser
705 710 715 720

Ser Asp Ile Arg Leu Ser Met Arg Lys Ala Glu Glu Glu Glu Leu Ala
725 730 735

Ser Pro Val Arg Glu Gln Arg Gln Gln Ser Ser Gly Pro Pro Pro Gly
740 745 750

Ala Ala Glu Arg Gln Pro Leu Arg Ala Ala Thr Ala Thr Trp Ile Glu
755 760 765

Ala Glu Thr Leu Pro Asp Lys Gly Asp Ser Arg Ala Ile Gln Ile Thr
770 775 780

Thr Ser Ala Pro His Leu Pro Ala Arg Val Pro Gly Asp Ala Thr Gly
785 790 795 800

Arg Pro Thr Pro Ser Leu Pro Gly Gln Gly Ile Pro Glu Gly Pro Ala
805 810 815

Glu Glu Gln Val Ile Pro Ser Ser Asp Val Leu Val Thr His Gly Pro
820 825 830

Pro Gly Phe Asp Pro Cys Phe Ala Gly Ala Ser Asn Ile Cys Gly Pro
835 840 845

Gly Thr Cys Val Lys Leu Pro Asn Gly Tyr Arg Cys Val Cys Ser Pro
850 855 860

Gly Tyr Gln Leu His Pro Ser Gln Asp Tyr Cys Thr Asp Asp Asn Glu
865 870 875 880

Cys Leu Arg Asn Pro Cys Glu Gly Arg Gly Arg Cys Val Asn Ser Val

ES 2 443 042 T3

Ala Asn	Gly Thr Val Cys Glu	Asp Val Asp Glu Cys	Val Gly Glu
1160	1165	1170	
Glu His	Cys Ala Pro His Gly	Glu Cys Leu Asn Ser	Pro Gly Ser
1175	1180	1185	
Phe Phe	Cys Leu Cys Ala Pro	Gly Phe Ala Ser Ala	Glu Gly Gly
1190	1195	1200	
Thr Arg	Cys Gln Asp Val Asp	Glu Cys Ala Thr Thr	Glu Pro Cys
1205	1210	1215	
Leu Gly	Gly His Cys Val Asn	Thr Glu Gly Ser Phe	Asn Cys Leu
1220	1225	1230	
Cys Glu	Thr Gly Phe Gln Pro	Ala Pro Asp Ser Gly	Glu Cys Val
1235	1240	1245	
Asp Ile	Asp Glu Cys Ala Asn	Asp Thr Val Cys Gly	Asn His Gly
1250	1255	1260	
Phe Cys	Asp Asn Thr Asp Gly	Ser Phe Arg Cys Leu	Cys Asp Gln
1265	1270	1275	
Gly Phe	Glu Thr Ser Pro Ser	Gly Trp Glu Cys Val	Asp Val Asn
1280	1285	1290	
Glu Cys	Glu Leu Met Leu Ala	Val Cys Gly Asp Ala	Leu Cys Glu
1295	1300	1305	
Asn Val	Glu Gly Ser Phe Leu	Cys Leu Cys Ala Ser	Asp Leu Glu
1310	1315	1320	
Glu Tyr	Asp Ala Glu Glu Gly	His Cys Arg Pro Arg	Val Ala Gly
1325	1330	1335	
Ala Gln	Arg Ile Pro Glu Val	Pro Thr Glu Glu Gln	Ala Ala Gly
1340	1345	1350	
Leu Thr	Gly Met Glu Cys Tyr	Ala Glu His Asn Gly	Gly Pro Pro
1355	1360	1365	
Cys Ser	Gln Ile Leu Gly Gln	Asn Ser Thr Gln Ala	Glu Cys Cys
1370	1375	1380	
Ser Thr	Gln Gly Ala Arg Trp	Gly Glu Thr Cys Asp	Pro Cys Pro
1385	1390	1395	
Ser Glu	Asp Ser Val Glu Phe	Ser Glu Leu Cys Pro	Ser Gly Gln
1400	1405	1410	

ES 2 443 042 T3

Gly Tyr Ile Pro Val Glu Gly Ala Trp Thr Phe Gly Gln Ala Met
 1415 1420 1425

Tyr Thr Asp Ala Asp Glu Cys Ile Leu Phe Gly Pro Ala Leu Cys
 1430 1435 1440

Gln Asn Gly Arg Cys Leu Asn Thr Val Pro Gly Tyr Ile Cys Leu
 1445 1450 1455

Cys Asn Pro Gly Tyr His Tyr Asp Ala Val Ser Arg Lys Cys Gln
 1460 1465 1470

Asp His Asn Glu Cys Gln Asp Leu Ala Cys Glu Asn Gly Glu Cys
 1475 1480 1485

Val Asn Thr Glu Gly Ser Phe His Cys Phe Cys Ser Pro Pro Leu
 1490 1495 1500

Ile Leu Asp Leu Ser Gly Gln Arg Cys Val Asn Ser Thr Ser Ser
 1505 1510 1515

Ser Glu Asp Phe Pro Asp His Asp Ile His Met Asp Ile Cys Trp
 1520 1525 1530

Lys Lys Val Thr Asn Asp Val Cys Ser Gln Pro Leu Arg Gly His
 1535 1540 1545

His Thr Thr Tyr Thr Glu Cys Cys Cys Gln Asp Gly Glu Ala Trp
 1550 1555 1560

Ser Gln Gln Cys Ala Leu Cys Pro Pro Arg Ser Ser Glu Val Tyr
 1565 1570 1575

Ala Gln Leu Cys Asn Val Ala Arg Ile Glu Ala Glu Arg Glu Ala
 1580 1585 1590

Gly Ile His Phe Arg Pro Gly Tyr Glu Tyr Gly Pro Gly Pro Asp
 1595 1600 1605

Asp Leu Pro Glu Thr Leu Tyr Gly Pro Asp Gly Ala Pro Phe Tyr
 1610 1615 1620

Asn Tyr Leu Gly Pro Glu Asp Thr Val Pro Glu Pro Pro Phe Ser
 1625 1630 1635

Asn Thr Ala Ser His Leu Gly Asp Asn Thr Pro Ile Leu Glu Pro
 1640 1645 1650

Pro Leu Gln Pro Ser Glu Leu Gln Pro Pro Ala Ile Gln Asn Pro
 1655 1660 1665

Leu Ala Ser Phe Glu Gly Leu Gln Ala Glu Glu Cys Gly Ile Leu

ES 2 443 042 T3

1670		1675		1680				
Asn Gly	Cys Glu	Asn Gly	Arg	Cys Val	Arg Val	Arg	Glu Gly	Tyr
1685			1690			1695		
Thr Cys	Asp Cys	Phe Glu	Gly	Phe Gln	Leu Asp	Thr	Ala Leu	Met
1700			1705			1710		
Ala Cys	Val Asp	Val Asn	Glu	Cys Glu	Asp Leu	Asn	Gly Ala	Ala
1715			1720			1725		
Arg Leu	Cys Ala	His Gly	His	Cys Glu	Asn Thr	Glu	Gly Ser	Tyr
1730			1735			1740		
Arg Cys	His Cys	Ser Pro	Gly	Tyr Val	Ala Glu	Pro	Gly Pro	Pro
1745			1750			1755		
His Cys	Ala Ala	Lys Glu						
1760								

<210> 5

<211> 21

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador1

10

<400> 5

cgagatctgc cctagtggaa a 21

<210> 6

15 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> cebador2

<400> 6

ggcccgaata tcacacactc a 21

25 <210> 7

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

5

<220>

<223> Sonda1

<400> 7

agcctggacg ttggacaga cca 23

10

<210> 8

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> cebador3

<400> 8

20

cacttggac tgcttgaag g 21

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

<223> cebador4

30

<400> 9

cccgttcagg tctcacact 20

<210> 10

<211> 25

35

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> sonda2

5

<400> 10

ctcatggcct gtgtggatgt gaatg 25

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de uso de LTBP2 como biomarcador para insuficiencia cardíaca congestiva que comprende:
- i) medir el nivel de ARNm de LTBP2 en una muestra biológica tomada de un mamífero,
 - 5 ii) comparar el nivel de ARNm de LTBP2 en la muestra biológica con el nivel de LTBP2 en una muestra de control, y
 - iii) diagnosticar insuficiencia cardíaca congestiva en base al elevado nivel de ARNm de LTBP2 de la muestra biológica en comparación con la muestra de control,
- en el que la muestra es una muestra de tejido de corazón.
2. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el mamífero es un ser humano.
- 10 3. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uso de LTBP2 se combina con el uso de uno o más biomarcadores.
4. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uso de LTBP2 se combina con el uso de uno o más biomarcadores que están comprendidos en un grupo de biomarcadores que consiste en CRTAC, PRSS23, FN1, TGFB2, NPR3 y CTGF.
- 15 5. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uso de LTBP2 se combina con el uso de uno o más biomarcadores que están comprendidos en un grupo de biomarcadores que consiste en BNP, ANP, troponina, CRP, mioglobina, CK-MB o metabolitos.
6. Un procedimiento de la reivindicación 1, en el que el uso de LTBP2 se combina con el uso de uno o más biomarcadores clínicos que están comprendidos en un grupo de biomarcadores que consiste en tensión arterial, frecuencia cardíaca, tensión arterial pulmonar o resistencia vascular sistémica.
- 20

Fig. 1

SEC ID N°: 1

CCTCGCTCCCTCTCCGGTAATGAGGGGGCTGAGCTGTCCCTCCGAGGAGGGGGCCTGGTGT
GGATAAAAGAGACGAAAAAGCCGGGGGAGGTTTCCAAAAATAAAACCGTCCGGGTCCCCTT
CAGACGGCTGCAGGCACAGGGAGGAGGCGGAAGGTGCAGCAGCCGTGCGAGCCCAGCTGG
AGTAGGAGCGCGGACTCGAGGCTCGGGGCGCGCAGCCCTCGTTCCGCCGAGAGCCGGGCC
CCAGTCGGCCGCTTCAGGGCCCCCTAGACTCAGAGAAGCTGGCCGCCGGGGCGGGCCGGGA
GAACAGCCCAGGGCGTCCAGCGTGCCGACCACAAAGCTCTTCGCGGTGCCCGCGGCACC
ACTCTCCAGCCGCCCGCGCCATGAGGCCGCGGACCAAAGCCCGCAGCCCAGGGCGCGCCC
TGCGGAACCCCTGGAGAGGCTTCTGCGCTCACCCCTGGCTCTCTTCGTGGGCGCGGTCA
TGCCCAAAGGGACCCCGTAGGGAGATACGAGCCGGCTGGTGGAGACGCGAATCGACTGCGG
CGCCCTGGGGCAGCTACCCGGCAGCGGCTGCAGCCAAGGTGTACAGTCTGTTCCGGGAGC
AGGACGCGCCTGTGCGGGCTTGCAGCCCGTGGAGCGGGCCAGCCGGGCTGGGGGAGCCC
CAGGAGGCCACCGAGGCGGAGGCCAGGAGGCCGTCCCGCGCGCAGCAGTCGCGGCGTGT
CAGCCACCTGCGCAGACCCGGAGAAGCACTCCCCTGGGCCAGCAGCAACCAGCACCCCGGA
CCCGGGCCGCGCCGGCTCTCCACGCCTGGGGACCCACAGCGGTCTGGGGCTGCGCCCC
AACCCGCGCGAGGGCGGCTCACGGGGAGGAACGTCTGCGGGGACAGTGCTGCCAGGA
TGGACAACAGCAAACAGCACCAACCACTGTATCAAACCCGTTTGCAGCCGCCGTGCCAGA
ACCGGGCTCCTGCAGCCGCCCGCAGCTCTGTGTCTGCCGCTCTGGTTTCCGTGGAGCCCG
CTGCGAGGAGGTCATTCCCGATGAGGAATTTGACCCCCAGAACTCCAGGCTGGCACCTCGA
CGCTGGGCCGAGCGTTCACCCAACCTGCGCAGGAGCAGTGCAGGCTGGAGAGGGCACCTTGG
CCAGAGCACAGCCGCCAGCACACAGTCGCCGCCCGCACACAGTCGCCACCAGCTGGGAC
CCTGAGTGGCCTCAGCCAGACCCACCCTTCCCAGCAGCACGTGGGGTTGTCCCGCACTGT
CGACTTCACCCGACTGCCACGGCCAGTAGCCAGCTCTCTTCCAACGCCCTGCCCCGGGAC
CAGGCCTTGAGCAGAGAGATGGCACCCAACAGGCGGTACCTCTGGAGACCCCTCATCCCC
CTGGGGGCTGAACCTCACGGAGAAAATCAAGAAGATCAAGATCGTCTTCACTCCCACCATC
TGCAAGCAGACCTGTGCCCGTGGACACTGTGCCAACAGCTGTGAGAGGGGCGACACCACCA
CCCTGTACAGCCAGGGCGGCCATGGGCACGATCCCAAGTCTGGCTTCCGCATCTATTTCTG
CCAGATCCCCTGCCTGAACGGAGGCGCTGCATCGGCAGGGACGAATGCTGGTGGCCCGCC
AACTCCACCGGAAGTTCTGCCACCTGCCATATCCCGCAGCCGGACAGGGAGCCTCCAGGGA
GGGGTCCCGCCCCAGGGCCTTGCTGGAAGCCCCACTGAAGCAGTCCACTTTCACACTGCC
GCTCTCCAACCAGCTGGCCTCCGTGAACCCCTCCCTGGTGAAGGTGCACATTCACCACCA
CCCGAGGCCTCAGTGCAGATCCACCAGGTGGCCAGGTGCGGGGCGGGGTGGAGGAGGCC
TAGTGGAGAACAGCGTGGAGACCAGACCCCGCCCTGGCTGCCTGCCAGCCCTGGCCACAG

CCTCTGGGACAGCAACAACATCCCTGCTCGGTCTGGAGAGCCCCCTCGGCCACTGCCCCCA
 GCAGCACCAGGCCCTCGAGGACTGCTGGGCCGGTGTACCTGAACACTGTGAACGGACAGT
 GTGCCAACCTCTGCTGGAGCTGACTACCCAGGAGGACTGCTGTGGCAGTGTGGGAGCCTT
 CTGGGGGGTGACTTTGTGTGCCCCATGCCACCCAGACCAGCCTCCCCGGTGATTGAGAAT
 GGCCAGCTGGAGTGTCTCAGGGGTACAAGAGACTGAACCTCACTCACTGCCAAGATATCA
 ACGAGTGTGTGACCCCTGGGCCCTGTGCAAGGACGCGGAGTGTGTGAATACCAGGGGCAGCTA
 CCTGTGCACATGCAGACCTGGCCTCATGCTGGATCCATCGCGGAGCCGCTGTGTGTCTGGAC
 AAGGCAATCTCCATGCTGCAGGGACTGTGCTACCGGTGCTGTTGGGGCCCCGGCACCTGCACCC
 TGCCTTTGGCCCAGCGGATCACCAAGCAGATATGCTGCTGCAGCCGCGTGGGCAAAGCATG
 GGGCAGCGAGTGTGAGAAATGCCCTCTGCCTGGCACAGAGGCCCTCAGAGAGATCTGCCCT
 GCCGGCCACGGCTACACCTACGCGAGCTCCGACATCCGCTGTCCATGAGGAAAGCCGAGG
 AGGAGGAACCTGGCAAGGCCCCCAAGGGAGCAAGGGCAGAGGAGCAGCGGGGCACTGCCCGG
 GCCAGCAGAGAGGCAGCCCCCTCCGGGTGCTCACGGACACCTGGCTTGAGGCCGGGACCATC
 CCTGACAAGGGTGACTCTCAGGCTGGCCAGGTCACGACCAGTGTCACTCATGCACCTGCCT
 GGGTCACAGGGAATGCCACAACCCCAACATGCCTGAACAGGGGATGTCAGAGATACAGGA
 AGAACAAAGTGACCCCCCTCACCGATGTGCTGGTGACCCCTGAGCACCCCAGGCATTGACAGA
 TGCGCTGCTGGAGCCACCAACGTCTGTGGCCCTGGAACCTGCGTGAACCTCCCCGATGGAT
 ACAGATGTGCTCTGCAGCCCTGGCTACCAGCTGCACCCCAGCCAGGCCTACTGCACAGATGA
 CAACGAGTGTCTGAGGGACCCCTGCAAGGGAAAAGGGCGCTGCATCAACCCGCTGGGGTCC
 TACTCTGCTTCTGCTACCCCTGGCTACACTCTGGCCACCTCAGGGGCGACACAGGAGTGTG
 AAGATATCAATGAGTGTGAGCAGCCAGGGGTGTGCAGCGGGGGGAGTGCACCAACACCGA
 GGGCTCGTACCACTGCGAGTGTGATCAGGGCTACATCATGGTCAGGAAAGGACACTGCCAA
 GATATCAACGAATGCCGTACCCCCGTACCTGCCCTGATGGGAGATGCGTCAATTTCCCCTG
 GCTCCTACACTTGTCTGGCTGTGAGGAGGGCTACCGGGGCCAGAGTGGGAGCTGTGTAGA
 TGTGAATGAGTGTCTGACTCCCGGGGTCTGTGCCATGGAAAGTGCACCAACCTAGAAGGC
 TCCTTCAGATGCTCTTGTGAGCAGGGCTATGAGGTACCTCAGATGAGAAGGGCTGCCAAG
 ATGTGGATGAGTGTGCCAGCCGGGCCCTCATGCCCCACAGGCCTCTGCCTCAACACGGAGGG
 CTCCCTCGCCTGCTCTGCCTGTGAGAACGGGTACTGGGTGAATGAAGACGGCACTGCCTGT
 GAAGACCTAGATGAGTGTGCCTTTCCCGGGAGTCTGCCCCCTCCGGAGTCTGCACCAACACGG
 CTGGCTCCTTCTCCTGCAAGGACTGCGATGGGGGCTACCGGCCAGCCCCCTGGGTGACTC
 CTGTGAAGATGTGGATGAATGTGAAGACCCCCAGAGCAGCTGCCTGGGAGGCGAGTGAAG
 AACACTGTGGGCTCCTACCAGTGCCTCTGTCCCCAGGGCTTCCAGCTGGCCAATGGCACCG
 TGTGTGAGGATGTGAATGAGTGCATGGGGGAGGAGCACTGCGCACCCCACGGCGAGTGCCT
 CAACAGCCACGGGTCTTTCTTCTGT
 CTGTGCGCGCCTGGCTTCGTGAGCGCAGAGGGGGCACCAGCTGCCAGGATGTGGACGAGT
 GTGCCACCACAGACCCGTGTGTGGGAGGGCACTGTGTCAACACCGAGGGCTCCTTCAACTG

TCTATGTGAGACTGGCTTCCAGCCCTCCCCAGAGAGTGGAGAGTGTGTGGATATTGACGAG
 TGTGAGGACTATGGAGACCCGGTGTGTGGCACCTGGAAGTGTGAAAACAGCCCTGGCTCCT
 ACCGCTGTGTCTCTGGGCTGCCAGCCTGGCTTCCACATGGCCCCGAACGGAGACTGCATTGA
 CATAGACGAGTGCGCCAACGACACCATGTGTGGCAGCCACGGCTTCTGTGACAACACTGAT
 GGCTCCTTCCGCTGCCTCTGTGACCAGGGCTTCGAGATCTCTCCCTCAGGCTGGGACTGTG
 TGGATGTGAACGAGTGTGAGCTTATGCTGGCGGTATGTGGGGCCGCGTCTGTGAGAACGT
 GGAGGGCTCCTTCTGTGCCTCTGTGCCAGTGACCTGGAGGAGTACGATGCCCAGGAGGGG
 CACTGCCGCCACGGGGGGCTGGAGGTCAGAGTATGTCTGAGGCCCAACGGGGGACCATG
 CCCCAGCCCCACCCGCATGGACTGCTACTCCGGGCAGAAGGGCCATGCGCCCTGTCCAG
 TGTCTGGGCCGGAACACCACACAGGCTGAATGCTGCTGCACCCAGGGCGCTAGCTGGGGA
 GATGCCGTGACCTCTGCCCGTCTGAGGACTCAGCTGAATTCAGCGAGATCTGCCCTAGTG
 GAAAAGGCTACATTCCTGTGGAAGGAGCCTGGACGTTTGGACAGACCATGTACACAGATGC
 GGATGAGTGTGTGATATTGGGCCCTGGTCTCTGCCCGAACGGCCGGTGCCTCAACACCGTG
 CCTGGTTATGTCTGCCTGTGCAATCCCGGCTTCCACTACGATGCTTCCCACAAGAAGTGTG
 AGGATCACGATGAGTGCCAGGACCTGGCCTGTGAGAATGGCGAGTGCCTCAACACGGAGGG
 CTCTTCCACTGCTTCTGCAGCCCCCGCTCACCTGGACCTCAGCCAGCAGCGCTGCATG
 AACAGCACCAGCAGCACGGGAGGACCTCCCTGACCACGACATCCACATGGACATCTGCTGGA
 AAAAAATCACCAATGATGTGTGCAGCGAACCCTGCGTGGGCACCGCACCACTACACGGA
 ATGCTGCTGCCAGGACGGCGAGGCTGGAGCCAGCAGTGTGCTCTGTGTCCCCCGAGGAGC
 TCTGAGGTCTATGCTCAGCTGTGCAACGTGGCTCGCATTGAGGCAGAGCGGGAGGCCGGGG
 TCCACTTCCGGCCAGGCTATGAGTATGGCCCCGGGCCCGATGACCTGCACTACAGCATCTA
 TGGCCCAGATGGGGCCCCCTTCTACAACCTACCTGGGCCCGGAGGACACCGTCCCTGAGCCT
 GCCTTCCCCAACACAGCCGGTCACTCAGCGGACCCGACACCCATCCTTGAGTCTCCTTTGC
 AGCCCTCAGAATCCAGCCCCACTACGTGGCCAGCCATCCAGAGCCCCAGCCGGCTTCGA
 AGGGCTCAGGCGGAGGAGTGCGGCATCCTGAACGGCTGTGAGAATGGCCGCTGTGTGCCG
 GTGCGGGAGGGCTACACCTGTGACTGTTTTGAGGGCTTCCAGCTGGATGCGGCCACATGG
 CCTGCGTAGATGTGAATGAGTGTGATGACTTGAACGGGCTGCTGTGCTCTGTGTCCATGG
 TTACTGCGAGAACACAGAGGGCTCCTACCGCTGCCACTGCTCCCCGGGATATGTGGCTGAG
 GCAGGGCCCCCCCCACTGCACTGCCAAGGAGTAGCAGTCAGGGGTCAGTGTGGCAACTACCT
 GGAAATGGCCTCCAGTCACAGGCAGGGGCTTGGAGGATGATTTCCCTAGCTGGGAAGACACC
 GTGACATCAGGCCAGAGGTTTCCAATCAGCCTTGCTGCTTTTCACTCTCTCCAGCTTAGCC
 TCTGGCTGTAAGCTTCGGTCATTCCTCCATGCCCTTGCTTGGCTCAAGCACCACCAATCG
 CTTTAATGCTTCAGCCACCGCATGAGGCCCTGTCCACCACCTTTCTGTCCTTGCTATGGG
 ATGCTTACCAAAGGATGGCCCTCATCCACCTCCCAAGCTGTGCGGAGCATGCAAGGCCCA
 TGGCCTCACACTGCAGACACCCCTTCCAGCCACAATCCACCATCATCCTGACGATCCCAC
 AACTGGGACAGAGGCTACATCTGCCCTAGGGAGGTCCTTCCAGAATCTGTGGAGCAAGAAAG

GATTTGGGGAAGCTTGGGGACTGACTCCAGAGCCCCCTCCTAAGAACCATCACCACCCTC
AGCCAATCTGTTCTGGGCCCTGATTTTGCCACACCTCCATCCTGTAGCCCATTCTCTGACC
CCAAGGAGTGGCAGAAGATCCCTTCACTCAGAGAAGCAAGGCTGATATTAGCTTGTGAAT
GTAAGAGACACAAATGAAGAAGAACAAGAGCCTGAGAAAGCAGCAAGAGGACATGATGAA
AAATACGTGGAGTTGATGAGAAAGGGGAGCCAAGGCTTTATACGTCTAAAGAAAATATTCA
GTAGCTGAATCCGCCCAGTGATAGCCTGTGGGCACCAGCAGCAAGGGCTGCCATGGGATAC
AGCACCCATCTACAAAGACCTCTATTACATAAACACTGCTTCTTACAGGAAACAAACCTCT
TCTGGGATCTCCTTTTGTGAAAACCAGTTTGATGTGCTAAAAGTAAAAGTCTATTTTCCA
GTGTGGTCTTGTTCAGAAGCAGCCAGATTTCCAATGTTGTTTTTCCCCTCCACTCAGAAAC
CCCTGCCCTTTCCCTTCAGAAAACGATGGCAGGCATTCCTCTGAGTTTACAAGCAGAGACT
CACTCCAACCCAAACTAGCTGGGAGTTCAGAACCATGGTGGGAATAAAGAAATGTGCATCTG
GTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Fig. 2

SEC ID N°: 2

AGAGGTCCCTAGACGGGAAGGGGCACGCCGCCAGGCGGGACTGTGGAGCTAACGATGGAGA
 GCACCTCCCTGCGAGGTCTCCGGTGCCACAGCTCTGCAGCCACTCTGGCGCCATGAGGGC
 GCCGACCACCGTCCGCTGCTCCGGACGCATCCAAAGGGCGCGTTGGAGGGGCTTCCTGCCA
 CTTGTCTTGCTCTCTTGATGGGGACAAGTCATGCCCAAAGGGATTCCGTGGGGAGATACG
 AACCAGCTAGCCGGGATGCCAATCGGTTGTGGCGCCCCGTGGGCAACCACCCCGCAGCGGC
 TGCAGCCAAGGTGTACAGTCTGTTCCGAGAGCCCAGCGCGCCGGTCCCCGGCTTGTGCCCC
 TCTGAGTGGAAATCAGCCGGGCCAGGGGATCCCTGGGAGGCTCGCAGAGGCCGAGGCCAGGA
 GACCGTCCCAGCCCAGCAGCTGCGTCGAGTCCAGTACCTGTCCAGACTCGGAGAAGCAA
 TCCCCGAGGCCAGCAGCCACCAGCAGCCCGGACCGCACATTCGGTCTGTCGCTGGCGACC
 CCTCAGCGACCCGCGGCTGCACGCCGAGGGCGGCTCACCGGGAGAAAATGTCTGCGGGGGAC
 AGTGCTGCCCTGGATGGACGACATCGAACAGCACCAACCACTGTATCAAACCTGTGTGTCA
 GCCTCCCTGTGAGAACCAGGGGCTCCTGCAGCCGGCCCCAGCTCTGCATCTGCCGTTCTGGC
 TTCCGTGGGGCACGCTGCGAGGAGTTCATCCCTGAGGAGGAGTTTGACCCTCAGAAATGCCA
 GGCTGTGCCAGACGCTCAGTGGAGGGAGCACCTGGCCCTCACAGGAGCAGCGAGGCCAG
 AGGAAGTCTAGTGACCAGAATACAGCCGCTGCTACCACCACTACCACCACCTCCATCTAGG
 ACCCTCAGCCAGACCCGTCCCCTGACGACAGCATGCAGGACTGTCCAGAACAGTTCTGCTGTT
 ATCCGGCCACTGGTACCAATGGCCAACTGATGTC AACGCTCTGCCCTTCAGGACCAGGACC
 TGAGCTGAGAGACAGCAGCCAACAGGCAGCACACATGAACCATCTCTCACACCCCTGGGGG
 CTGAACCTCACCGAGAAAATCAAGAAGATTAAGGTGCTCTTCACTCCCACCATCTGCAAGC
 AGACCTGTGCCCCGGGGCCGCTGTGCCAACACGCTGTGAGAAGGGTGACACCACCACCTGTA
 CAGTCAGGGCGGCCATGGGCATGACCCCAAGTCTGGCTTCCGTATCTATTTCTGCCAAAATC
 CCCTGCCTGAATGGAGGCCGCTGCATTTGGCCGGGACGAGTGTGGTGTCCAGCCAACTCTA
 CAGGGAAGTTCTGCCATCTGCCCTGTCCCACAGCCAGACAGGGAGCCTCCAGGACGAGGCTC
 CCAGCACAGACCCCTGCTGGAAGGGCCATTGAAGCAATCCACCTTCACGCTGCCCTCTCTCC
 AACCAGCTGGCCTCTGTGAACCCCTCGCTGGTGAAGGTACAAATGCAGCACCCGCCCTGAGG
 CCTCCGTGCAGATCCACCAGGTGGCCCGGGTCCGGGGTGAGGTGGACCCTGTGCCAGAGGA
 CAACAGTGTGGAGACCAGAGCCTCTCATCGCCCCATGGCAGCTCAGGCCACAGCCACTGG
 GCCAGCAACAGCATAACCGCTCGGGCTGGAGAGGGCCCCCTCGGCCACCACCAGTGCCGTCCA
 GGCATTATGGACTTCTGGGCCAGTGTACCTGAGCACGGTGAATGGACAGTGTGCTAACCC
 CCTAGGGGAGCTGACTTCTCAGGAAGACTGCTGTGGCAGTGTGGGGACTTCTTGGGGGGTG
 ACTTCTGTGCCCCATGCCCACCCAGACCAGCTTTCCCCGTGATTGAAAACGGCCAGCTGG
 AGTGTCCCCAAGGGTATAAGAGACTAAAACCTCAGCCATTGCCAAGACATCAATGAGTGCCT
 GACCCTGGGCCTGTGCAAGGATTCAGAGTGTGTGAACACCAGGGGCAGCTACCTGTGCACC
 TGCAGGCCCCGGCCTCATGCTGGATCCATCAAGGAGCCGCTGTGTATCGGACAAGGCTGTCT

CCATGAAACAGGGACTCTGTTACCGGTCAATGGTGTCTGGCACCTGCACCCTGCCTTTGGT
 ACAACGGATCACCAAGCAGATATGCTGTTGCAGCCGTGTGGGCAAAGCCTGGGGCAGCAA
 TGTGAACACTGCCCCCTGCC'TGGCACAGAAGCC'TTCAGGGAGATCTGCCCTGCTGGCCATG
 GCTACGCCTACTCAAGCTCAGACATCCGCCTGTCTATGAGGAAAGCTGAGGAAGAGGAACT
 GGCTAGCCCCGTAAGGGAACAGAGACAGCAGAGCAGTGGACCCCCACCTGGGGCAGCAGAA
 AGGCAGCCACTCCGGGCAGCCACTGCCACC'TGGATTGAGGCTGAGACCCTCCCTGACAAAG
 GTGACTCTCG

GGCTATTCAGATTACAACCAGTGTCTCCCCACCTACCTGCCCGGGTACCAGGGGATGCCACT
 GGAAGACCAACGCCATCATTTGCC'TGGACAGGGCATTCAGAGGGTCCAGCAGAAGAGCAGG
 TGATCCCTTCCAGTGAATGTCC'TGGTGACGCACGGTCCCCCAGGCTTTGATCCATGTTTCGC
 TGGAGCCTCCAACATCTGTGGCCCTGGGACCTGTGTGAAGCTCCCAAATGGATACAGATGT
 GTCTGCAGCCCTGG'TTACCAGCTACACCCAGCCAGGACTACTGTACTGATGACAACGAGT
 GTCTGAGGAACCCCTGTGAAGGAAGAGGGCGCTGTGTCAACAGTGTGGGCTCCTACTCCTG
 CCTCTGCTACCCAGGCTACACACTAGCCACCCTAGGAGACACACAGGAGTGCCAAGATGTG
 GATGAGTGTGAGCAGCCGGGGTGTGCAGCGTGGACGATGCAGCAACACTGAGGGCTCGT
 ACCACTGCGAGTGTGATCAGGGCTACGTTCATGGTCAGAAAGAGGACACTGCCAAGATATCAA
 CGAATGCCGTACCC'TGGTACC'TGCCCTGATGGGAGATGCGTCAACTCCCTGGC'TCC'TAC
 ACTTGTCTGGCCTGTGAGGAGGGCTACATAGGGCAGAGCGGGAAC'TGTGTAGATATGAATG
 AGTGTCTGACCCCCGGGATATGTGCCCATGGAAGGTGCATCAACATGGAAGGCTCCTTTAG
 ATGCTCTTGTGAGCCAGGCTATGAGCTCACCCAGACAAGAAGGGCTGCCGAGATGTGGAC
 GAGTGTGCCAGCCGAGCCTCATGCCCCACCGCCTCTGCCTCAACACGGAGGGCTCCTTCA
 CCTGCTCAGCCTGTGAGAGTGGGTACTGGGTGAACGAAGATGGCACTGCCCTGTGAAGACCT
 GGATGAATGTGCCTTCCCCGGAGTCTGCCCCACAGGCGTCTGCACCAACACTGTGGGCTCC
 TTCTCCTGCAAGGACTGCGACAGGGGCTTCCGGCCAGCCCCCTGGGCAACAGCTGTGAAG
 ATGTGGATGAGTGTGAAGGTCCCCAGAACAGCTGCC'TGGGAGGCGAGTGAAGAACACAGA
 TGGTTCC'TACCAGTGCCTCTGTCCCCAGGGCTTCCAGCTGGCCAATGGCACCGTGTGTGAG
 GATGTGGACGAATGTGT'TGGGGAAGAACAACACTGCGCTCCTCATGGCGAATGCC'TCAACAGCC
 CGGGTCC'TTCTTCTGTCTCTGTGCACCCGGCTTTGCTAGTGTGAGGGGGGCACCAGATG
 CCAGGATGTTGATGAATGTGCAACCACAGAGCCGTGTCTGGGAGGACACTGTGTCAACACC
 GAGGGCTCCTTCAACTGTCTGTGTGAGACTGGCTTCCAGCCCGCCCAGACAGTGGAGAGT
 GTGTGGACATAGATGAATGTGCAAAATGATACTGTGTGTGGGAACCATGGCTTCTGTGACAA
 TACGGATGGCTCCTTCCGCTGCCTGTGTGACCAGGGCTTCGAGACCTCACCTCAGGCTGG
 GAGTGTGTGATGTGAACGAGTGTGAGCTCATGCTGGCAGTGTGTGGGGATGCCACTCTGCC
 AGAACGTGGAAGGCTCCTTCCCTGTGCCTTTGTGCCAGTGACCTTGAGGAGTATGATGCAGA
 AGAAGGACACTGCCGTCC'TCGGGTGGCTGGAGCTCAGAGAATCCCAGAGGTCCCAACAGAG
 GAGCAGGCTGCAGGCC'TTACCGGCATGGAGTGTCTATGCTGAACACAATGGTGGTCCCTCCAT

GCTCTCAAATCTTGGGCCAGAACTCCACACAGGCTGAGTGCTGCTCGACCCAGGGTGCCAG
 ATGGGGGGAAACCTGTGATCCCTGCCATCTGAGGACTCAGTTGAATTCAGTGAGCTGTGC
 CCCAGTGGTCAAGGTTACATCCCAGTGGAAAGGGCCTGGACATTTGGACAAGCCATGTATA
 CAGATGCCGACGAGTGCATACTGTTTGGGCCCTGCTCTCTGCCAGAATGGCCGATGCCCTCAA
 CACAGTGCCTGGCTACATTTGCCTGTGCAACCCTGGCTACCACTATGATGCCGTGAGCAGG
 AAGTGCCAGGATCACAACGAATGCCAGGACTTGGCCCTGTGAGAACGGCGAGTGTGTGAACA
 CAGAAGGCTCCTTCCACTGCTTCTGCAGTCCCCCCTCATCCTAGACCTCAGCGGACAGCG
 CTGTGTGAACAGTACCAGCAGCTCAGAGGACTTCCCTGACCATGACATCCACATGGACATC
 TGCTGGAAAAAGTACCAATGACGTGTGCAGCCAGCCCTTGCGTGGGCACCATACTACCT
 ATACAGAGTGTGCTGCCAAGACGGGGAGGCCCTGGAGCCAGCAGTGTGCTCTGTGCCCCCC
 CAGGAGCTCTGAGGTCTATGCTCAGCTGTGCAATGTGGCTCGGATTGAGGCAGAGAGGGAA
 GCAGGGATCCACTTCCGGCCAGGATATGAGTATGGCCCTGGCCAGATGATCTACCTGAAA
 CCCTCTACGGCCAGATGGAGCCCCCTTCTATAACTACCTGGGCCCTGAGGACACTGTTCC
 TGAGCCTCCCTTCTCCAACACAGCCAGTCAATTTGGGAGACAACACACCCATCCTTGAGCCT
 CCCCTGCAGCCCTCTGAACTTCCAGCCCCAGCCATTCAGAACCCCTGGCTTCCCTCGAAG
 GCCTTCAGGCTCAGGAATGTGGCATCCTGAATGGCTGTGAGAATGGCCGCTGTGTGCGTGT
 GCGCGAGGGCTACACTTGTGACTGCTTTGAAGGCTTCCAGCTGGATACAGCCCTCATGGCC
 TGTGTGGATGTGAATGAGTGTGAAGACCTGAACGGCGCTGCGCGACTCTGTGCGCATGGTC
 ACTGCGAGAACACAGAGGGTTCCCTATCGCTGCCACTGTTCCCCTGGTTACGTGGCAGAGCC
 CGGGCCCCACACTGTGCAGCCAAGGAGTAGGAGTGAGAGATCATGGTGGGCAGCTATGTG
 GAAATGGCTATCAGCCATAGGCTGGGGACTTAAGGTTGCTTCCCTAGCTGGGAAGACGTGA
 CTGGGAAGACCCCGTATGCCATCAGGCCAGGGCTCTGGAGCCAGTTCCGCCAGCCTCGC
 CTCCTTTTTATCTCTTCCGGCTTAACTCTGGGTGTGAATTCGTCAGTGCCTCTATGCCAC
 TGCTTGGCTCAGACACCACAAATATTTAATGCTTTAGCCACTGGCCGTGAGACACAGCCC
 ACAGTCTGTCTCGGGGCCACACTTTAGAGCGCCATCAGAAGAGTCCCTCGTGCCTCCTC
 TTAGGCTGTGCAGACACTGCAGGCACCCCTTCCATCTGTGATCTACACATCATCTCGATG
 GTTCTGTAACGGGGACAGTGGCTACATCCACCTGGGGATGGCCCTTACAGTGAATGGAGC
 AGGAGAGGGTCTGGGGAGTAGCTCCAATGCCACCTCTCAGAACCACCACCAGCACTGGGTG
 GCGTGAGTCTTTTTGCTACTCCTCCATCCCATAGACAGTTCTGCGGCCCGAGAAGGGAC
 CAGTTTCCCTCACCTCAGAGGATGAAGACTAATACTAACTTGCTGAGTGTAAAGAAACGAAA
 GAAGAGGAATAACGAGTCTGAGAAAAGTGTGGCAAGAGAGTGATACGGAACATGGGAGTC
 CATATGAAAGGAGGAGCCAAGAGTTAGACAAAACACGAAGTCGCTTTGGGCAAATCAGTCC
 AAGCCTCCTTAGAGCTTCTGTGTGCCCTGCAGGGAGGCTCGCCACAAGCTCTGGCGCCCATC
 TGCAAACACCTTTATTAGGCTCATCTGTTCCCCACAGGAAAACCTAAATAGATGGCCTTAA
 CAATATAAAGGCAGAGCAAGCCAGATTTTCAAAGTTGTTTCTCTCCTCCACTTCAGAAGC

ACTTGCCCTTGCTTCCTCTTAACACATGCACTTCCACACCAGCTAGCTGGGGGTTTCAGGAG
CGTGGGGGAATAAAAATGTTTCATCTG
CC

Fig. 3

SEC ID N°: 3

MRPRTKARSPGRALRNPWRGFLPLTLALFVGAGHAQRDPVGRYEPAGGDANRLR
RPGGSYPAAAAAKVYSLFREQDAPVAGLQPVERAQPGWGSRRPTEAEARRPSRA
QQSRRVQPPAQTRRSTPLGQQQAPRTRAAPALPRLGTPQRSGAAPPTPPRGRLTG
RNVCGGQCCPGWTTANSTNHCIPVCEPPCQNRGSCSRPQLCVCRSGFRGARCEE
VIPDEEFDQNSRLAPRRWAERSPNLRRSSAAGEGTLARAQPPAPQSPAPQSPAG
TSLGLSQTHPSQQHVGLSRTVRLHPTATASSQLSSNALPPGPGLEQRDGTQQAVPL
EHPSSPWGLNLTEKIKKIKIVFTPTICKQTCARGHCANSCERGDTTTTLYSQGGHGH
PKSGFRIYFCQIPCLNGGRCIGRDECWCPANSTGKFCHLPIQPDPREPPGRGSRPRAL
LEAPLKQSTFTLPLSNQLASVNPVLKVIHHPPEASVQIHQVAQVRGGVEEALVE
NSVETRPPPWLPA SPGHSLWDSNNIPARSGEPPRPLPPAAPRPRGLLGRCYLNTVN
GQCANLLELTQEDCCGSVGA FWGVTLCAPCPRPASPVIENGQLECPQGYKRLN
LTHCQDINECLTLGLCKDAECVNTRGSYLCTCRPGLMLDPSRSRCVSDKAISMLQG
LCYRSLGPGTCTPLAQRTKQICCSRVGKAWGSECEKCPLPGTEAFREICPAGHG
YTYASSDIRLSMRKAEELARPPREQQQRSSGALPGAERQPLRVVTDTWLEAGT
IPDKGDSQAGQVTTSVTHAPAVVTGNATTPPMPEQGIAEIQEEQVTPSTDVLTLS
TPGIDRCAAGATNVC GPGTCVNL PDGYRCVCS PGYQLHPSQAYCTDDNECLRDPC
KGKGRGINRVGSYSCFCYPGYTLATSGATQECQDINECEQPGVCSGGQCTNTEGS
YHCECDQGYIMVRKGHCQDINECRHPGTCPDGRCVNSPGSYTCLACEEGYRGQSG
SCVDVNECLTPGVCAHGKCTNLEGSFRCSC EQGYEVTSDEKGCQDVDECASRASC
PTGLCLNTEGSFACSA CENGYWVNEDGTACEDLDECAFPGVCP SGVCTNTAGSFS
CKDCDGGYRPSPLGDSCEDVDECEDPQSSCLGGECKNTVGSYQCLCPQGFQLANG
TVCEDVNECMGEEHCAPHGECLNSHG SFFCLCAPGFVSAEGGTSCQDVDECATTD
PCVGGHCVNTEGSFNCLCETGFQPSPESGECVDIDECEDYGD PVCGTWCENS PGS
YRCVLGCQPGFHM PNGDCID IDECANDTMCGSHGFCDNTDGSFRCLCDQGF EISP
SGWDCVDVNECELMLAVCGAALCENVEGSFLCLCASDLEEYDAQEGHCRPRGAG
GQSMSEAP

TGDHAPAPTRMDCYSGQKGHAPCSSVLGRNTTQAECCTQGASWGDACDLCPSE
DSAEFSEICPSGKGYIPVEGAWTFGQTMYPDADCECVIFGPGGLCPNGRCLNTVPGYV
CLCNPGFHYDASHKKCEDHDECQDLACENGEVCNTEGSFHCFCSPPLTLDLSQQR
CMNSTSTEDLPDHDHMDICWKKVTNDVCSEPLRGHRTTYTECCCQDGEAWSQ
QCALCPPRSSEVYAQLCNVAREAEAREAGVHFRPGYEGPDPDLHYSIYGPDGAP
FYNYLGPEDTVPEPAFPNTAGHSADRTPILESPLQPSSELQPHYVASHPEPPAGFEG
QAEECGILNGCENGRVVRVREGYTCDCFEQFLDAAHMACVDVNECDDLNGPAV
LCVHGYCENTEGSYRCHCSPGYVAEAGPPHCTAKE

Fig. 4

SEC ID N°: 4

MRAPTTVRCSGRIQRARWRGFLPLVLALLMGTSHAQRDSVGRYEPASRDANRLW
RPVGNHPAAAAKVYSLFREPDAPVGLSPSEWNQPGQIPGRLAEAEARRPSRA
QQLRRVQSPVQTRRSNPRGQPPAARTAHSVVRLATPQRPAARRGRLTGRNVC
GGQCCPGWTTSNSTNHCIKPVCPQCNRGSCSRPQLCICRSGFRGARCEEVIPEEE
FDPQONARPVRRSVEGAPGPHRSSEARGSLVTRIQPLLPPLPPPSRTLSQTRPLQQH
AGLSRTVRRYPATGTNGQLMSNALPSGPGPELRDSSQQAAMNHLSHPWGLNLT
EKIKKIKVVFTPTICKQTCARGRCANTCEKGDTTTTLYSQGGHGHDPKSGFRIYFCQI
PCLNGGRICGRDECWCPANSTGKFCHLPVPQPDREPPGRGSQHRALLEGPLKQSTF
TLPLSNQLASVNPSLVKVMQHPPEASVQIHQVARVRGEVDPVPEDNSVETRASH
RPHGSSGSHSHWASNSIPARAGEAPRPPVPSRHYGLLGQCYLSTVNGQCANPLGEL
TSQEDCCGSVGTSWGVTSCAPCPPRPAFPVIENGQLECPQGYKRLNLSHCQDINEC
LTLGLCKDSECVNTRGSYLCTCRPGLMLDPSRSRCVSDKAVSMKQGLCYRSMVSG
TCTLPLVQRITKQICCCSRVGKAWGSKCEHCPLPGTEAFREICPAGHGYAYSSDIR
LSMRKAEELASPVREQRQSSGPPGAAERQPLRAATATWIEAETLPDKGDSRA
IQITTSAPHLPARVPGDATGRPTPSLPGQIPEGPAEEQVIPSSDVLVTHGPPGFDFCF
AGASNICGPGTCVKLPNGYRCVCSPGYQLHPSQDYCTDDNECLRNPCEGRGRCVN
SVGSYSCLCYPGYTLATLGDTQECQDVDECEQPGVCSGGRCNTEGSYHCECDQG
YVMVRRGHCQDINECRHPGTCPDGRCVNSPGSYTCLACEEGYIGQSGNCVDMNE
CLTPGICAHGRCINMEGSFRCSCEPGYELTPDKKGRDVDECASRASCPGLCLNT
EGSFTCSACQSGYWVNEGDGACEDLDECAFPVGCPTGVCTNTVGSFCKDCDRGF
RPSPLGNSCEDVDECEGPQNSCLGGECKNTDGSYQCLCPQGFQLANGTVCEDVDE
CVGEEHCAPHGECLNSPGSFFCLCAPGFASAEGGTRCQDVDECATTEPCLGGHCV

NTEGSFNCLCETGFQPAPDSGECVDIDECANDTVCGNHGFCDNTDGSFRCLCDQG
FETSPSGWECVDVNECELMLAVCGDALCENVEGSFLCLCASDLEEYDAEEGHCRP
RVAGAQRIVEVPTEEQAAGLTGMECYAEHNGGPPCSQILGQNSTQAECSTQGAR
WGETCDPCSEDSVEFSELCPGQGYIPVEGAWTFGQAMYTDADECILFGPALCQN
GRCLNTPGYICLCNPGYHYDAVSRKCQDHNECQDLACENGEVNTTEGSFHCFC
PPLILDLSGQRCVNSTSSSEDFPDHDIHMDICWKKVTNDVCSQPLRGHHTTYTECC
CQDGEAWSQQCALCPPRSSEVYAQLCNVARIEAEREAGIHFRPGYEGPDPDLPE
TLYGPDGAPFYNYLGPEDTVPEPPFSNTASHLGDNTPILEPPLQPSELQPPAIQNPLA
SFEGLQAEECGILNGCENGRVVRREGYTCDCFEFGQLDTALMACVDVNECEDLN
GAARLCAHGHCENTEGSYRCHCSPGYVAEPGPPHCAAKE

Fig. 5

SEC ID N°: 5

5' CGAGATCTGCCCTAGTGGAAA 3'

Fig. 6

SEC ID N°: 6

5' GGCCCGAATATCACACTCA 3'

Fig. 7

SEC ID N°: 7

5' AGCCTGGACGTTTGGACAGACCA 3'

Fig. 8

SEC ID N°: 8

5' CACTTGTGACTGCTTTGAAGG 3'

Fig. 9

SEC ID N°: 9

5' CCCGTTCAGGTCTTCACACT 3'

Fig. 10

SEC ID N°: 10

5' CTCATGGCCTGTGTGGATGTGAATG 3'

Fig. 11

Datos de expresión en tiempo real de LTBP2 en corazón de rata (modelo de DOCA)

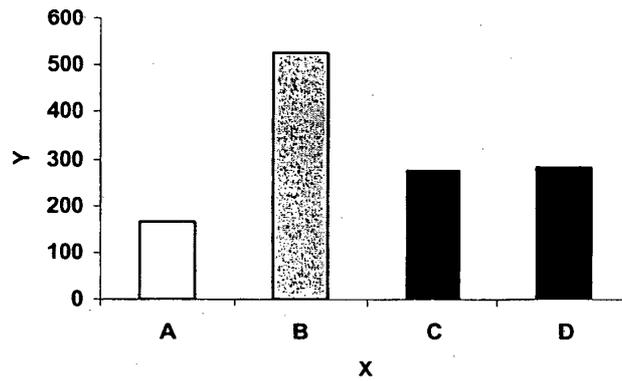


Fig. 12

Datos de expresión en tiempo real de LTBP2 en corazón de rata (modelo de oclusión)

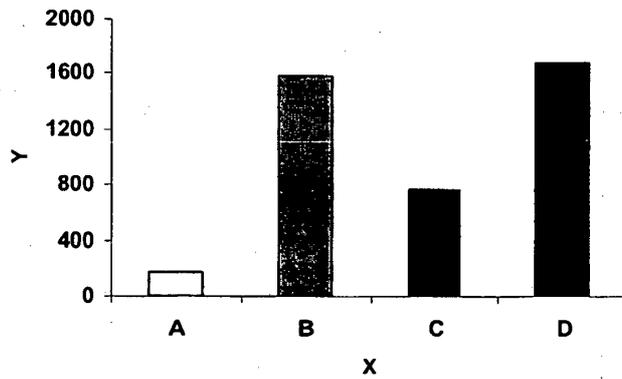


Fig. 13

Datos de expresión en tiempo real de LTBP2 en corazón de rata (modelo de monocrotalina)

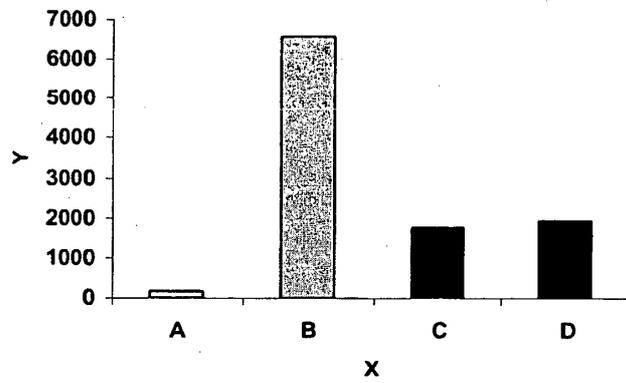


Fig. 14

Datos de expresión de micromatrices de LTBP2 en corazón de rata (modelo de DOCA)

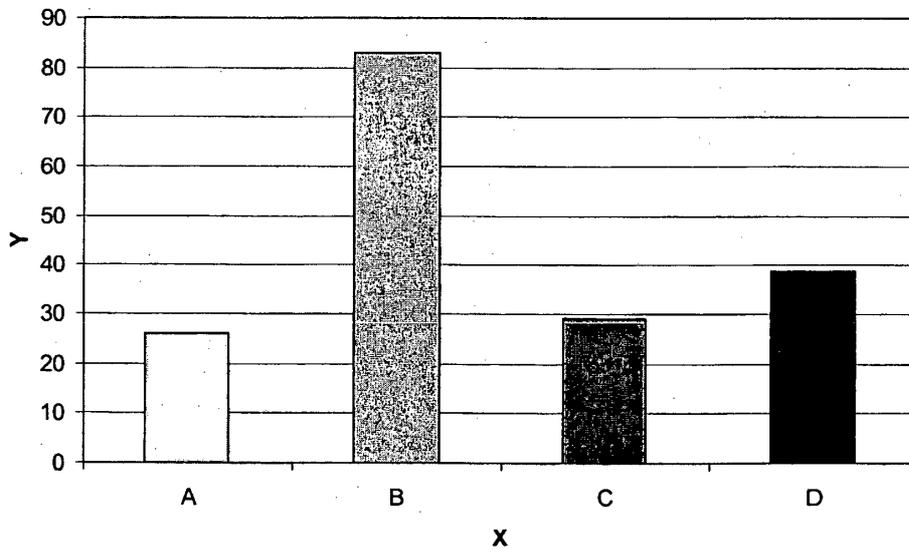


Fig. 15

Datos de expresión de micromatrices de LTBP2 en corazón de rata (modelo de oclusión)

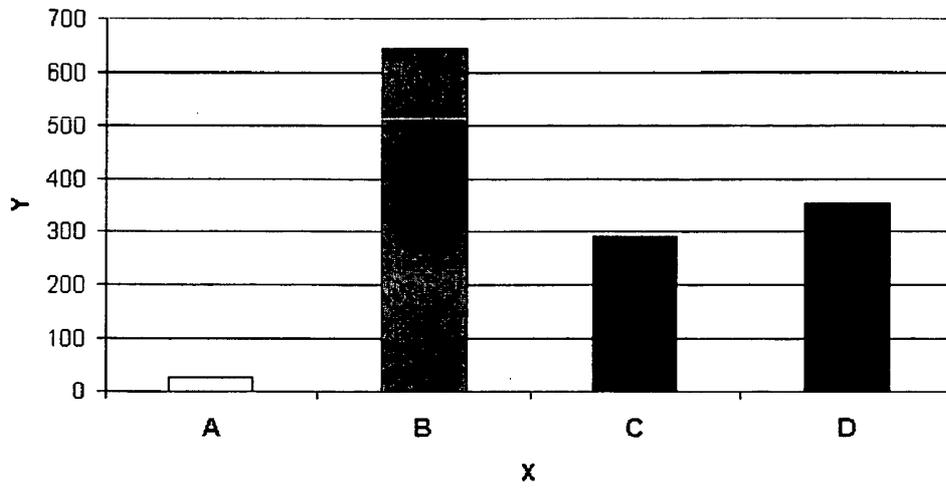


Fig. 16

Datos de expresión de micromatrices de LTBP2 en corazón de rata (modelo de monocrotalina)

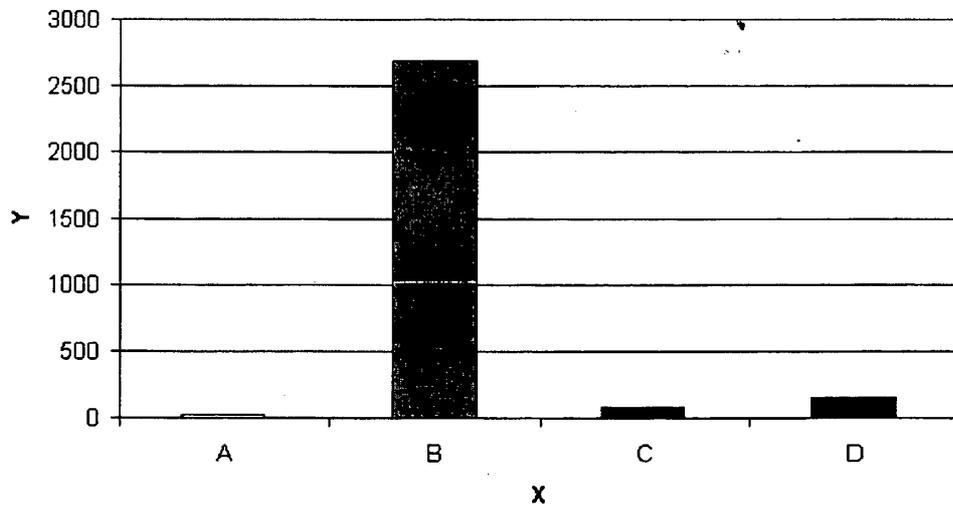


Fig. 17

Datos de expresión de micromatrices de LTBP2 en corazón humano

