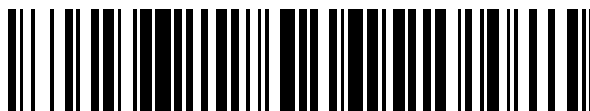


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 793 310**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2007** **PCT/SE2007/000377**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2007** **WO07123462**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2007** **E 07748042 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.02.2020** **EP 2010652**

54 Título: **Una proteína, un anticuerpo y medición de la proteína**

30 Prioridad:

25.04.2006 US 794898 P

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

13.11.2020

73 Titular/es:

FUTURE MEDICAL DIAGNOSTICS CO., LTD
(100.0%)

Floor 3, Building 4, No. 892 Wusong Road, Guo Xiang Residential District, Wuzhong Economic and Technological, Development Zone
Suzhou, Jiangsu Province, CN

72 Inventor/es:

XU, SHENGYUAN y
PER, VENGE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 793 310 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

Una proteína, un anticuerpo y medición de la proteína

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a un nuevo tipo de proteína y sus subunidades. La proteína, en particular una subunidad de la misma, es enzimáticamente activa normalmente por presentar actividad fosfolipasa B o por ser una profosfolipasa B (es decir, son PLB). La proteína, su ADN y su ruta de activación son diferentes de las PLB hasta
10 ahora reconocidas. Por lo tanto, se ha nombrado PLB-II (la variante humana HPLB-II) con el fin de distinguirla de las PLB previamente conocidas. La variante humana está relacionada con la proteína hipotética humana FLJ22662 (SEQ ID NO: 1).

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 El neutrófilo desempeña un papel importante tanto en la inmunidad innata como en las reacciones inflamatorias en la enfermedad humana (Burg y col., Clin. Immunol. 99, 7-17 (2001)). El neutrófilo elimina microorganismos invasores a través de la fagocitosis, la generación de metabolitos reactivos de oxígeno y la liberación de sustancias microbicidas almacenadas en diferentes gránulos en los neutrófilos. Aparte de las vesículas secretoras, los neutrófilos contienen
20 gránulos azurófilos, específicos (secundarios) y que contienen gelatinasa (terciarios) (Borregaard y col., Blood 89, 3503-3521 (1997)) formados en la médula ósea en las etapas posteriores de la maduración de neutrófilos (Borregaard y col., Blood 85, N.º 3, 812-817 (1995)). Durante las reacciones inflamatorias mediadas por neutrófilos, las vesículas secretoras se movilizan primero tras la estimulación, seguido por los gránulos azurófilos, los secundarios y los terciarios, (Sengelov y col., J. Immunol. 154, 4157-4165 (1995); y Sengel[delta]v y col. J. Immunol. 150 N.º4, 1535-
25 1543 (1993)). Tras la fagocitosis, los gránulos azurófilos se fusionan con los fagosomas, lo que provoca la liberación de factores proteolíticos y bactericidas en el fagolisosoma, donde el microorganismo invasor es destruido y digerido (Burg y col., (2001) citado anteriormente).

Las fosfolipasas B (Ghannoum y col., Clin. Microbiol. Rev. 13, 122-43, Table (2000)) son un grupo heterogéneo de
30 enzimas que pueden hidrolizar tanto los ácidos grasos de glicerofosfolípidos en las posiciones sn-1 y sn-2, y de este modo mostrar tanto las actividades de la fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2 y de la lisofosfolipasa. Varias PLB han sido identificadas en varios microorganismos (Ghannoum y col., (2000) citado anteriormente; y (Farn y col., J. Bacteriol 183, 6717-6720 (2001)), hongos (Ghannoum y col., (2000) citado anteriormente), Dictyostelium discoideum (Ferber y col., Eur. J. Biochem. 14, 253-257 (1970)) y en la membrana del borde en cepillo de los enterocitos maduros de
35 conejillo de indias (Gassama-Diagne y col., J. Biol. Chem. 267, 13418-13424 (1992)), rata (Tojo y col., J Biol. Chem. 273, 2214-2221 (1998)), conejo (Boll y col., J Biol. Chem. 268, 12901-12911 (1993)) y epidermis humana (Maury y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 295, 362-369 (2002)). Las PLB son también componentes importantes de venenos de abejas y serpientes. Las PLB bacterianas y fúngicas han sido notificadas por ser factores de virulencia que dañan las células huésped, mientras que las PLB de enterocitos de mamíferos participan en la digestión de los lípidos
40 alimenticios, y la PLB expresada en 5 epidermis humanas probablemente desempeña un papel en el proceso de diferenciación y participa en la función de barrera epidérmica.

La longitud completa de la proteína FLJ22662 comprende 552 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 1, AAH63561). Una proteína FLJ22662 producida de forma recombinante que contiene una secuencia de 223 residuos de la variante
45 de longitud completa (aa 330-552) (AAH00909, Strausberg y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99 (26), 16899-16903 (2002)) fusionada a GST está disponible comercialmente en Novus Biologicals, (Littleton CO, EE.UU.). Entre los usos sugeridos se encuentran membrana de Western, ELISA, y el desarrollo del ensayo. Las solicitudes de patente de Estados Unidos 20070059717, 20070004038, 20060252056, 20060240426, 20060199204, 20060194199, 20060111314, 20060073496, 20060046259, 20060019256, 20050208500, 20050095607,
50 20040076955, 20040005563, 20030170743, y 20030165949 (publicada como US 7.189.507) están relacionadas con el diagnóstico y la terapia de diversas enfermedades y mencionan las proteínas FLJ22662 y sus genes como una de muchas otras proteínas que podrían ser de interés.

OBJETIVOS

55 La identificación y caracterización de nuevas proteínas de gránulos en neutrófilos humanos es una estrategia importante para estudiar las funciones de los neutrófilos humanos. En la búsqueda de nuevas proteínas de gránulos, se descubrió una proteína con un peso molecular de 130 kDa en los extractos de ácido de granulocitos que contienen subunidades/moléculas de 25 y 45 kDa. El análisis de aminoácidos identificó esta proteína como un producto de un
60 gen (FLJ22662) que codifica una proteína de 63 kDa con función desconocida. La comparación de esta proteína con la base de datos de secuencia de GenBank utilizando el programa BLAST reveló una similitud de secuencia de aminoácidos con fosfolipasa B (PLB) de Dictyostelium, lo que sugiere una PLB putativa. Los objetivos de la invención

comprenden:

1. Comprensión de la importancia biológica en la salud y enfermedad de la nueva proteína.
2. Desarrollo de nuevos principios de fármacos basado en la actividad descubierta de la proteína como tal, incluyendo sus subunidades individuales, por ejemplo actividad de PLB-II. Esto podría lograrse por: a) uso de la proteína como tal o sus subunidades individuales, ya sea en forma nativa o en forma recombinante, o b) imitación de la actividad de la nueva proteína o sus subunidades para el diseño de nuevos principios farmacológicos, o c) el desarrollo de principios que facilita la conversión de proformas en formas activas.
- Esta estrategia debería resultar valiosa en el diseño de nuevos fármacos antibióticos, pero también podría resultar valiosa como un principio antitrombótico en otras situaciones donde la actividad es fisiológicamente importante.
3. Desarrollo de principios inhibidores para la actividad, por ejemplo, actividad de PLB-II. Esto podría lograrse por a) desarrollo de fármacos que inhiben la actividad, o b) principios farmacológicos que impiden la transformación de proformas en formas activas. La inhibición de la actividad debe resultar valiosa en un gran número de enfermedades humanas, tales como enfermedad inflamatoria, enfermedad cardiovascular, trastornos lipídicos en los que los granulocitos de neutrófilos y monocitos/macrófagos son conocidos por estar involucrados etc.
4. Desarrollo de ensayos sensibles para la medición de la actividad de la proteína y/o sus subunidades individuales ya sea solas o en combinación. Los principios de ensayo pueden estar basados en: a) principios inmunológicos que incluyen también otros principios de afinidad entre formas de nuestra nueva proteína y un homólogo de afinidad no inmunológico, b) la medición de la actividad enzimática, y/o c) detección de la expresión del ARNm del gen que se refiere a la proteína (FLJ22662 en seres humanos). Este objetivo incluye procedimientos de diagnóstico en los que el nivel de la nueva proteína, sus subunidades individuales y/o la expresión del ARNm en un fluido corporal u otro tejido supera/n los niveles de individuos sanos y se usan como un marcador para las enfermedades y otras afecciones fisiológicas que están relacionadas con los niveles de desviación de estas entidades biológicas.

25 LA INVENCION

La invención comprende tres aspectos principales: 1) una proteína de mamífero que comprende una o más subunidades, cada una de las cuales está relacionada con un fragmento de proteína hipotética humana FLJ22662 o con fragmentos correspondientes con las proteínas hipotéticas homólogas de especies de mamífero distintas a *Homo sapiens*. También pueden existir posiblemente otras subunidades en la proteína de la invención. 2) Una preparación de anticuerpos específica para la proteína de mamífero definida en esta memoria descriptiva. 3. Un procedimiento de medición de la presencia de un analito en una muestra. El analito está relacionado con la proteína de mamífero del primer aspecto principal.

35 UNA NUEVA PROTEÍNA DE MAMÍFERO (PRIMER ASPECTO PRINCIPAL)

Este aspecto se refiere a una proteína de mamífero que se caracteriza porque se deriva de

- a) la proteína de cadena sencilla hipotética humana FLJ22662 que presenta la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y en la filtración en gel y posiblemente también in vivo está presente como una proteína que contiene cuatro subunidades de polipéptido de cadena sencilla asociadas de forma no covalente (subunidades SU) cuya comparación por pares son fragmentos diferentes no superpuestos (dos subunidades SU1 y dos subunidades SU2) de la SEQ ID NO: 1, y/o
- b) una proteína hipotética homóloga de una especie de mamífero distinta a *Homo sapiens*, que, de una manera similar a FLJ22662, es capaz de dar fragmentos que pueden asociarse entre sí para dar una proteína multimérica que contiene subunidades SU1 y SU2 que son homólogas a las subunidades/fragmentos que se derivan de la proteína FLJ22662.

Más específicamente, este primer aspecto de la invención es una proteína de mamífero que consiste en una o dos subunidades de polipéptido SU de cadena sencilla que son diferentes con respecto a sus secuencias de aminoácidos, donde dichas subunidades son

- i) SU1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
- ii) SU2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,

en la que la proteína comprende al menos una subunidad SU2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

La expresión "proteína hipotética" que se encontrará en el contexto de la invención significa una proteína de cadena sencilla que, al igual que FLJ22662, puede ser aislada del material biológico como una proteína multimérica nativa que contiene al menos dos subunidades de polipéptido de cadena sencilla asociadas de forma no covalente (subunidades SU1 y SU2) que corresponden a diferentes fragmentos no superpuestos de la proteína hipotética. La

presencia in vivo de este tipo de proteínas hipotéticas es a menudo demasiado baja o demasiado poco frecuente para ser medida y/o detectada. La secuencia de la subunidad SU1 normalmente se encuentra más cerca del extremo amino-terminal de la proteína hipotética que de la secuencia de la subunidad SU2.

- 5 La proteína de mamífero de la invención se caracteriza además porque comprende una subunidad SU1 y/o una subunidad SU2. Una o ambas de las diferentes subunidades pueden estar presentes en la proteína como un duplicado, triplicado, etc., y/o puede haber una o más subunidades de otro(s) tipo(s). Las subunidades SU1 y/o las subunidades SU2 pueden derivarse de la misma especie o de especies diferentes (formas desarrolladas por el hombre). Las subunidades SU individuales también pueden ser formas químicamente derivatizadas y/o formas recombinantes, incluyendo formas mutadas que no se corresponden exactamente con las subunidades SU de ninguna especie de mamífero particular.

- La subunidad SU1 comprende la SEQ ID NO: 2 o una variante de la misma que se obtiene por sustitución, delección y/o adición de uno o más residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2. La subunidad SU2 comprende la SEQ ID NO: 3 o una variante de la misma que se obtiene por sustitución, delección o adición de uno o más residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 3. El término "variante" incluye que la secuencia de una variante de SU que presenta una identidad de secuencia de $\geq 50\%$, tal como $\geq 60\%$ o $\geq 75\%$ o $\geq 80\%$ o $\geq 90\%$ o $\geq 95\%$ con la subunidad es una variante, es decir, de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Los intervalos incluyen que las secuencias/subunidades/fragmentos pueden derivarse de proteínas homólogas de diferentes especies, así como las variantes obtenidas por ingeniería genética.
- 20 La expresión "identidad de secuencia" se refiere al programa utilizado en la parte experimental para determinar la identidad de secuencia. Las SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 se producen como regiones no solapadas en la SEQ ID NO: 1 con la SEQ ID NO: 2 que se encuentra más cerca del extremo amino-terminal de la SEQ ID NO: 1 que la SEQ ID NO: 3.

- 25 La sustitución, delección y/o adición de residuos preferentemente no deberá extinguir todas las funciones biológicas importantes de las formas nativas de las subunidades y/o la proteína multimérica correspondiente. Su capacidad de asociarse entre sí o de presentar actividad enzimática, tal como actividades de PLB-II o proPLB-II, debe al menos ser retenida parcialmente, por ejemplo.

- 30 En una variante, una parte de una longitud especificada de la secuencia en una subunidad SU es idéntica a una parte de la misma longitud A) en la secuencia de la proteína hipotética FLJ22662 y/o B) en la secuencia de una proteína hipotética homóloga correspondiente de una especie de mamífero distinta a *Homo sapiens*.

- A) En un subvariante, una subunidad SU1 y/o una subunidad SU2 comprenden al menos una, dos o más secuencias de aminoácidos de ≥ 5 , tal como ≥ 10 o ≥ 15 o ≥ 25 o ≥ 50 residuos de aminoácidos cuyas secuencias están presentes en la SEQ ID NO: 1 o en las partes correspondientes de la secuencia de una proteína de cadena sencilla hipotética homóloga de una especie de mamífero distinta a *Homo sapiens*.

B) En otra subvariante,

- 40 a) una subunidad SU1 comprende al menos una o dos secuencias de aminoácidos de ≥ 5 , tal como ≥ 10 o ≥ 15 o ≥ 25 o ≥ 50 residuos de aminoácidos cuyas secuencias están presentes en la SEQ ID NO: 2 o en las partes correspondientes de la secuencia de una proteína de cadena sencilla hipotética homóloga de una especie de mamífero distinta a *Homo sapiens*, y/o

- 45 b) una subunidad SU2 comprende al menos una o dos secuencias de aminoácidos de ≥ 5 , tal como ≥ 10 o ≥ 15 o ≥ 25 o ≥ 50 residuos de aminoácidos cuyas secuencias están presentes en la SEQ ID NO: 3 o en las partes correspondientes de la secuencia de una proteína de cadena sencilla hipotética homóloga de una especie de mamífero distinta a *Homo sapiens*.

- Este tipo de secuencia de parte en una subunidad SU1 debe ser no recuperable en una subunidad SU2 y viceversa para una subunidad SU2.

- El peso molecular P_m de la proteína de mamífero de la invención depende del número y tipos de subunidades SU en ella, así como del origen de la especie de las subunidades y de las delecciones, sustituciones o adiciones de residuos de aminoácidos particulares. Los P_m típicos están dentro del intervalo de 15-240 kDa, suponiendo que el número de subunidades es 1-4. Para subunidades SU1 únicas, el intervalo típico es 15-35 kDa y para subunidades SU2 únicas es 30-60 kDa. Para las variantes que comprenden cuatro subunidades, el intervalo típico es 60-240 kDa con un intervalo más estrecho que es aplicable a variantes en las que hay dos subunidades SU1 y dos SU2, por ejemplo, 90-190 kDa, tal como 110-150 kDa. Los P_m de variantes humanas puras se presentan en la "Parte experimental". Estos intervalos de P_m se aplican principalmente a la(s) cadena(s) de polipéptido de proteína me y subunidades de la invención. No incluyen los P_m de los grupos que se han añadido por fusión recombinante con otras proteínas o por derivación química para unirse a otras entidades de gran peso molecular. Los intervalos dados anteriormente, en particular, se refieren a P_m obtenidos por filtración en gel para las proteínas multiméricas y por SDS-PAGE en

condiciones de desnaturalización para las subunidades individuales.

- En variantes preferidas, la proteína de la invención es una lipasa, tal como la fosfolipasa y la más típica una fosfolipasa B. Esto incluye que la proteína es una enzima activa o es un proenzima que es posible transformar/activar en una enzima activa, por ejemplo, en una fosfolipasa B. Para que la proteína sea una proenzima o una enzima activa (PLB-II), parece imperativo que la nueva proteína tenga al menos una subunidad SU2 y opcionalmente esté desprovista de la subunidad SU1. Es probable que algún tipo de degradación de la subunidad SU2 sea necesario para la actividad enzimática, por ejemplo, mediante la escisión de las partes correspondientes a una reducción en el peso molecular de la subunidad SU2. La reducción del P_m para la activación es normalmente $\geq 0,5$ kDa, tal como ≥ 1 kDa o ≥ 2 kDa o ≥ 3 kDa, pero se supone que es ≤ 10 kDa. Alternativamente, la reducción del P_m puede medirse en porcentaje, por ejemplo $\geq 1\%$, tal como $\geq 2\%$ o $\geq 4\%$ o $\geq 6\%$, pero se supone que es $\leq 20\%$ del P_m de la subunidad en cuestión, por ejemplo, una subunidad SU2. Basándose en los resultados obtenidos hasta el momento, la reducción es normalmente ≤ 5 kDa o $\leq 10\%$ para variantes humanas y similares.
- 15 La secuencia de aminoácidos de las diversas subunidades SU carecen de la secuencia consenso de lipasa, es decir, una secuencia de cinco residuos de aminoácidos que comienza y termina con glicina y que tiene serina en el centro y de forma independiente cualquier tipo de residuos de aminoácidos en las dos posiciones restantes (Schrage y col., Methods Enzymol 284:85-107, 85-107 (1997)).
- 20 La proteína de mamífero de la invención puede estar en forma derivatizada, donde tres variantes importantes son 1) formas marcadas, 2) formas inmovilizadas o inmovilizables, y 3) formas fusionadas, es decir, formas recombinantes en las que uno o más de otros compuestos que presentan la estructura de polipéptido se han fusionado con una o más subunidades de la nueva proteína.
- 25 La proteína de mamífero en forma marcada es normalmente un conjugado entre la proteína y un grupo analíticamente detectable. Los grupos/marcadores detectables son principalmente de dos tipos 1) marcadores de generación de señales, y 2) marcadores de afinidad. Los ejemplos típicos del primer tipo de marcadores son fluoróforos, luminóforos, tales como bioluminóforos y quimioluminóforos, grupos radiactivos, grupos enzimáticamente activos, tales como enzimas como tales, sustratos, co-sustratos, inhibidores, potenciadores, promotores, cofactores, coenzimas, etc., partículas, por ejemplo partículas metálicas, tales como partículas de oro, etc. Los ejemplos típicos del segundo tipo de marcadores son un miembro en un par de bioafinidad, tal como biotina y avidina/estreptavidina/neutravidina etc., anticuerpos hapteno/antígeno y anti-hapteno/antígeno, ácidos nucleicos complementarios, región constante de un anticuerpo y anticuerpo de región anti-constante (conjugado de origen natural) o proteínas de unión a Ig microbianas (proteína A, G, etc.), etc. Las técnicas para producir este tipo de conjugados se conocen adecuadamente en el campo y normalmente implican el acoplamiento químico del marcador a la proteína de la nueva proteína de mamífero, o, como alternativa, si el marcador presenta una estructura polipeptídica, fusión recombinante del marcador a la(s) subunidad(es) apropiada(s) de la proteína de mamífero de la invención.
- En las formas inmovilizadas o inmovilizables, la proteína de mamífero se une a una fase sólida o es capaz de unirse a tal fase al presentar un grupo funcional adecuado que coincide con un "contragrupo" en la fase sólida.
- 40 Las fases sólidas son bien conocidas en el campo y abarcan superficies, tales como las superficies internas de las paredes internas de los vasos de reacción, partículas, por ejemplo, en forma de perlas, que pueden ser porosas o no porosas, tapones monolíticos porosos, membranas, láminas, etc. Las perlas pueden estar en forma suspendida (lechos expandidos, suspensión agitada, etc.) o en forma de lechos empaquetados/lechos sedimentados. El material en la fase sólida, por ejemplo, en partículas, es normalmente polimérico, por ejemplo, un polímero sintético o un biopolímero e incluye también polímeros inorgánicos, tales como vidrios. El término biopolímero incluye polímeros semisintéticos que comprenden una cadena polimérica derivada de un biopolímero nativo. Las partículas y otras formas de fases sólidas (por ejemplo, partículas empaquetadas en un lecho) son normalmente hidrófilas en el sentido de que serán saturadas por el agua mediante la acción de capilaridad (autosucción) si entran en contacto con un exceso de agua. El término también indica que las superficies del material en fase sólida expondrán una pluralidad de grupos funcionales polares, cada uno de los cuales comprende un heteroátomo seleccionado de entre oxígeno, azufre y nitrógeno. Los grupos funcionales apropiados pueden ser seleccionados de entre grupos hidroxilo, grupos de óxido de etileno lineales ($[-CH_2CH_2O-]_n$, donde n es un número entero > 0), grupos amino, grupos carboxi, grupos sulfona, etc., por ejemplo, con preferencia por aquellos grupos que están sin carga independiente del pH. Los materiales en fase sólida hidrófobos, por ejemplo, en forma de partículas, pueden ser hidrofílicos, normalmente mediante la introducción de grupos hidrófilos en su superficie, por ejemplo, mediante recubrimiento.
- Las técnicas para inmovilización se pueden seleccionar de entre aquellas que son conocidas en el campo, por ejemplo, a través de enlaces covalentes, enlaces de afinidad (por ejemplo, enlaces de afinidad bioespecífica), adsorción física (principalmente interacción hidrófoba), etc. Los ejemplos de enlaces de afinidad bioespecífica que se pueden utilizar son enlaces entre avidina/estreptavidina/neutravidina, etc., y un reactivo de afinidad biotinilado, anticuerpo de alta

afinidad y un reactivo de afinidad haptenilado, etc.

La proteína de mamífero de la presente invención está en forma aislada (= forma enriquecida). Esto significa normalmente que la proteína está presente en una pureza que corresponde a un enriquecimiento relativo a su concentración en un extracto ácido de gránulos de granulocitos del mismo origen de especie que la proteína, y, en particular, relativo a la concentración total de proteínas en este extracto. El extracto ácido es del mismo tipo que el usado como material de partida para nuestra purificación de la proteína innovadora. Véase la parte experimental. Los factores de enriquecimiento típicos son ≥ 10 , tal $\geq 10^2$ o $\geq 10^3$ o $\geq 10^4$.

- 10 La proteína puede estar presente en composiciones que están en forma líquida o seca, tal como en forma secada por pulverización, secada por aire o liofilizada. Las composiciones pueden contener tampones y/o agentes estabilizantes seleccionados de entre varios compuestos que presentan estructura carbohidrato u otras estructuras polihidroxi, por ejemplo, seleccionados de entre alcoholes de azúcar, mono- y disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos. Los ejemplos específicos son glucosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, dextrano, etc. Las sustancias potencialmente interesantes a ser incorporadas en composiciones que se van a manipular en forma seca son sustancias que en forma seca son capaces de existir en un estado vítreo.

- 20 La proteína de mamífero de la invención puede obtenerse a partir de material nativo por elaboración de extractos de ácido obtenidos a partir de gránulos de granulocitos. Véase la parte experimental. En el futuro es probable y, probablemente también se prefiere obtener al menos las cadenas polipeptídicas de las subunidades de la proteína de mamífero de la invención mediante la producción en primer lugar de la proteína de cadena sencilla hipotética recombinante^A, tal como FLJ22662, seguido de la fragmentación enzimática, posiblemente llevando a cabo el plegado apropiado y/o la asociación de subunidades antes o después de la fragmentación. Alternativamente, cada tipo de subunidades SU se produce por separado, tras lo cual se permite continuar con el plegado y la asociación de subunidades. Aún otra alternativa es emplear la síntesis en fase sólida para las diferentes subunidades que posteriormente se pliegan y se asocian para formar una forma multimérica de la proteína innovadora.

ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA LA PROTEÍNA DE LA INVENCION (SEGUNDO ASPECTO PRINCIPAL).

- 30 Este aspecto abarca una preparación de anticuerpos (= composición) que se dirige específicamente contra una proteína de mamífero que se define para el primer aspecto. La especificidad es para uno o más epítopos diferentes en la proteína de mamífero que son únicos para la proteína. El término "único" en este contexto implica que los epítopos no se producen de forma perturbadora en otras moléculas que están presentes junto con la proteína de mamífero, por ejemplo, in vivo, o cuando la preparación de anticuerpos que se usará en el ensayo de procedimientos comprende la formación de complejos entre la proteína de mamífero y un homólogo de afinidad que se analiza para el tercer aspecto de la invención.

- 40 La preparación de anticuerpos puede ser específica para uno o más epítopos en a) una subunidad SU1 o b) una subunidad SU2 o c) una forma multimérica de la nueva proteína. La alternativa c) abarca especificidad para epítopos que son únicos para la forma multimérica y/o para epítopos SU1 y/o SU2 que están expuestos en la forma multimérica.

La preparación de anticuerpos de la invención es policlonal o monoclonal y puede incluir una mezcla de diferentes monoclonales, por ejemplo, dos o más y normalmente ≤ 10 .

- 45 El término "anticuerpo" incluye anticuerpos de longitud completa, fragmentos de unión a antígeno y derivados químicos y diversas formas producidas de forma recombinante, tales como anticuerpos de cadena sencilla, formas fusionadas, formas quiméricas, etc. En su significado más general, el término también abarca cualquier construcción desarrollada por el hombre que puede obtenerse en una forma que presenta afinidad específica hacia una proteína de la invención, por ejemplo, anticuerpos. Las entidades activas de anticuerpos individuales (por ejemplo, capaces de unirse a los epítopos analizados anteriormente) en las preparaciones de anticuerpos de la invención pueden derivatizarse de la misma manera que se describe para la proteína de mamífero de la invención, por ejemplo, los mismos tipos de marcadores y fases sólidas que se analizan para el primer aspecto principal pueden estar unidos a las entidades.

PROCEDIMIENTOS QUE IMPLICAN LA MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA DE MAMÍFERO (TERCER ASPECTO PRINCIPAL)

- 60 Este aspecto es un procedimiento de determinación de la presencia o el nivel de un analito en una muestra. El rasgo característico es que el analito está relacionado con las proteínas de mamífero reivindicadas en esta invención. El analito puede ser por lo tanto a) la proteína de mamífero como tal, b) un inhibidor o potenciador de la actividad de la proteína de mamífero, c) un inhibidor o potenciador de la transformación de una proforma de una forma enzimática activa de la proteína de mamífero en una forma activa que presenta al menos una actividad superior a la proforma, etc. La alternativa c) en la que el potenciador puede ser una enzima que promueve la conversión en la forma activa

de la proteína de mamífero o un potenciador para tal enzima. Las alternativas b) y c) incluyen también determinar la capacidad de un compuesto particular que será un potenciador o un inhibidor. La determinación de la presencia o el nivel de analitos según las alternativas a)-c) implica normalmente la medición de la actividad enzimática de la proteína de mamífero del primer aspecto.

5

Los términos "presencia" y "nivel" comprenden concentraciones (cuantitativas), por ejemplo, cantidad por volumen unitario, o cantidades relativas, tales como relativas a una sustancia de referencia que puede ser interna (es decir, está presente junto con el analito en la muestra) o externa (es decir, está separada de la muestra). Una sustancia de referencia interna se añade normalmente por separado a la muestra o al fluido biológico, o ya está presente en el material biológico original del que se deriva dicho analito. Los términos también incluyen la actividad biológica, por ejemplo, la actividad enzimática, si el compuesto es una forma enzimática activa de la proteína de mamífero como se define en esta invención, por ejemplo, que presenta actividad de fosfolipasa B y/o actividad de profosfolipasa B. Los términos también incluyen la presencia o ausencia del analito (es decir, mediciones cualitativas).

10

15 La muestra puede ser cualquier tipo de muestra que puede contener la proteína de mamífero y/o una entidad relacionada con la proteína, tal como un potenciador o un inhibidor de la actividad biológica de la proteína (véase más arriba). La muestra se deriva normalmente de un fluido biológico. Los fluidos biológicos típicos abarcan sobrenadantes de cultivo celular, tejido y homogenados de tejido, sangre y diversas fracciones de la sangre, tales como suero o plasma, fluido lagrimal, fluido regurgitado, orina, sudor, semen, líquido cefalorraquídeo, jugo gástrico, saliva, linfa, fluido de lavado pulmonar, fluido intestinal, etc., así como varias otras preparaciones líquidas que contienen un compuesto bioorgánico, por ejemplo, diversos líquidos obtenidos en diversas etapas durante la purificación de la proteína de mamífero de la invención a partir de sus fuentes nativas (véase la parte experimental) o de su producción recombinante.

20

25 En variantes en las que se determina la capacidad de un compuesto particular para actuar como un inhibidor o potenciador, la muestra es normalmente la mezcla de reacción en la que el compuesto va a interactuar con la proteína de mamífero de la invención. La muestra es normalmente acuosa. Puede ser un líquido que contiene posiblemente material insoluble, o algún tipo de material sólido, tal como un tejido, un gel, una lámina de nitrocelulosa, etc., que puede contener una parte líquida.

30

De este modo, existen al menos dos tipos principales de fluidos biológicos: A) fluidos biológicos nativos de un individuo mamífero que incluyen también fluidos derivados del fluido nativo mediante la preparación de muestras, tal como diluciones, fracciones (plasma y suero de sangre entera), etc., o B)) líquidos de proceso obtenidos durante la producción y/o el aislamiento y/o el enriquecimiento de la proteína de mamífero a partir de individuos de mamífero o a partir de los procesos recombinantes de generación de la proteína. Si una muestra se deriva de un individuo mamífero, la muestra se toma normalmente para fines de diagnóstico.

35

Las expresiones "diagnóstico", "fines de diagnóstico" y similares en el contexto de la invención abarcan el diagnóstico inicial de condiciones de enfermedad, así como se ha establecido el seguimiento o la supervisión de las condiciones de enfermedad después de un diagnóstico real, por ejemplo, durante un proceso de tratamiento o curación u otros tipos de periodos de observación (por ejemplo, antes del brote de la enfermedad).

40

En el primer subaspecto se encuentra un procedimiento analítico para indicar una condición de enfermedad asociada con un nivel anormal de la proteína de mamífero de la invención (analito) en individuos mamíferos (pacientes). La proteína es normalmente una fosfolipasa B (PLB-II) o una profosfolipasa B (proPLB-II). Este subaspecto comprende las etapas que consisten en:

45

(i) medir el nivel de la proteína de mamífero en una muestra que se deriva de un fluido biológico procedente de un individuo mamífero,

50

(ii) usar un nivel encontrado que supera el nivel de los individuos normales (sanos) de la misma especie, por ejemplo, por ser elevado, como una indicación de que dicho individuo padece la condición de enfermedad.

El nivel puede ser aumentado o disminuido. Las condiciones de enfermedad de interés se refieren normalmente a la actividad biológica de la proteína de mamífero de la invención, por ejemplo, su actividad de fosfolipasa o la capacidad de las subunidades (SU1, SU2, etc.) para existir como una proteína multimérica o en forma total o parcialmente disociada. Es probable que el aumento de los niveles sea indicativo de las condiciones de enfermedad, tal como i) una enfermedad inflamatoria/inflamación, ii) una infección microbiana, tal como una infección viral, bacteriana o por priones, iii) una enfermedad cardiovascular, o iv) un trastorno lipídico, por ejemplo, que implican granulocitos de neutrófilos y/o monocitos/macrófagos.

60

La etapa (i) del primer subaspecto puede utilizar

Alternativa (a): uno o más homólogos de afinidad específica para una forma nativa de la proteína de mamífero descrita en esta invención, por ejemplo, un anticuerpo que se define para el segundo aspecto principal en un formato de ensayo que se describe para el segundo subaspecto a continuación, o

- 5 Alternativa (b): reactivos enzimáticos, tales como sustrato, cofactores, activadores enzimáticos, etc., es decir, el procedimiento es un ensayo enzimático.

Otras alternativas abarcan procedimientos cromatográficos que dan lugar a fracciones en las que la proteína de mamífero de la invención se enriquece y, posteriormente, se mide.

- 10 Un ensayo de afinidad bioespecífica puede utilizar una preparación de anticuerpos según la invención, y comprender la etapa que consiste en:

- (i) poner en contacto la muestra con la preparación de anticuerpos específica para la proteína de mamífero descrita en esta invención en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y la proteína de mamífero en una cantidad que está relacionada con el nivel de la proteína de mamífero en la muestra, 15
(ii) medir el nivel del complejo formado en la etapa (i) y/o el nivel de anticuerpo no complejo con la proteína, incluyendo la presencia o ausencia de dicho complejo, y
(iii) calcular el nivel de la proteína de mamífero en la muestra y/o en el fluido biológico del que se deriva la muestra a partir del nivel medido en la etapa (ii). El fluido biológico es normalmente uno de los principales tipos analizados 20 anteriormente (A y B).

- El formato de ensayo particular se puede seleccionar de entre los que están disponibles para los ensayos de afinidad bioespecífica. Estos formatos, así como los principios para la selección, son bien conocidos en el campo. Abarcan que uno o más homólogos de afinidad, por ejemplo, una o más preparaciones de anticuerpo específicas para el analito se 25 utilizan para la formación de un complejo de afinidad, cuyo nivel de se mide a continuación y se relaciona con el nivel del analito en la muestra. Las condiciones se seleccionan de tal manera que el nivel del complejo se convierte en una función del nivel de analito en la muestra y en el fluido biológico del que se deriva la muestra. Los formatos pueden o no utilizar un reactivo de afinidad que presenta un marcador de los tipos analizados anteriormente para las formas marcadas de la proteína de mamífero de la invención (véase el primer aspecto de la invención), por ejemplo, una 30 forma marcada de a) una proteína de mamífero del primer aspecto principal, o b) un anticuerpo específico para esta proteína. Durante un ensayo, un reactivo de afinidad marcado se incorpora normalmente en un complejo de afinidad en una cantidad que es una función de a) el nivel de analito en la muestra, y/o b) el nivel del complejo formado que contiene la proteína de mamífero y un anticuerpo específico para la proteína. Los formatos pueden o no utilizar un reactivo de afinidad que es inmovilizado o inmovilizable en una fase sólida como se describe para la proteína del 35 primer aspecto principal. Una forma de agrupar los formatos que utilizan reactivos marcados y/o reactivos inmovilizados o inmovilizables se encuentra en ensayos competitivos y no competitivos. El formato sándwich es un formato no competitivo típico y utiliza como regla al menos dos homólogos de afinidad que son específicos para la proteína de mamífero (analito) de modo que simultáneamente se puedan unir al analito. Uno de estos homólogos presenta normalmente un marcador mientras que los otros presentan otro marcador o es inmovilizado o inmovilizable 40 en una fase sólida. Los formatos competitivos utilizan normalmente un análogo de analito, es decir, la proteína de mamífero en forma marcada o en forma inmovilizada o inmovilizable. El análogo es normalmente competitivo con el analito por la unión a un homólogo de afinidad común (por ejemplo, anticuerpo) que se encuentra en cantidad limitante. El homólogo de afinidad puede estar en forma marcada en el caso de que el análogo de analito esté en forma inmovilizada o inmovilizable y en forma inmovilizada o inmovilizable si el análogo de analito está en forma marcada. 45 Los llamados ensayos de desplazamiento a menudo se consideran como los formatos competitivos. Los formatos también pueden dividirse en formatos heterogéneos y homogéneos donde los formatos heterogéneos requieren una separación de reactivo marcado incorporado en un complejo del mismo reactivo marcado no incorporado en el complejo antes de que se lleve a cabo la medición en la etapa (ii). Los formatos homogéneos no requieren este tipo de separación. Los formatos de ensayo bioespecíficos también incluyen formatos de inmunoelectrotransferencia, 50 aglutinación (partículas como marcadores), formatos nefelométricos/turbidométricos, etc.

La proteína de mamífero puede ser la enzima activa, por ejemplo, que presenta la actividad de fosfolipasa B (PLB-II) o la actividad de profosfolipasa B (proPLB-II), y b) que se mida el nivel de actividad de una o ambas de estas entidades.

- 55 Un ensayo puede comprender las etapas que consisten en:

- (i) incubar la muestra que contiene la proteína de mamífero del tipo descrito en el primer aspecto principal con el sustrato apropiado y otros componentes necesarios para la conversión del sustrato, 60
(ii) medir la conversión del sustrato en función del tiempo, y
(iii) calcular el nivel de la actividad enzimática de la proteína de mamífero en la muestra y/o en el fluido biológico del que se deriva la muestra en base a la tasa de conversión del sustrato medida en la etapa (ii).

Es importante asegurar que la muestra está desprovista de otras enzimas que pueden escindir uno o más de los enlaces de éster de acilo (sn-1 y sn-2) como hace nuestra nueva fosfolipasa B, por ejemplo, fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, y otras fosfolipasas B, etc. Esto se puede lograr mediante la eliminación de tales actividades enzimáticas antes de la etapa (i) o si la muestra, por definición, carece de tales actividades.

5 La muestra se deriva normalmente de uno de los dos principales tipos de fluidos biológicos analizados anteriormente (A y B). Si se deriva de un individuo mamífero, el procedimiento puede llevarse a cabo con fines de diagnóstico y el procedimiento se lleva a cabo como parte del diagnóstico de una condición de enfermedad del individuo. La variante comprenderá entonces una cuarta etapa (iv) que será igual que la etapa (ii) en el primer subaspecto. Dicho de otra
10 manera, esta variante coincide entonces con la alternativa (b) del primer subaspecto.

El procedimiento de la invención puede ser una prueba para la capacidad de un compuesto (analito) para promover o inhibir la transformación de una profosfolipasa B (proPLB-II) de la invención en una fosfolipasa B (PLB-II) de la invención. En esta variante, el compuesto a someter a ensayo es el analito y se incluye en la mezcla de incubación de
15 la etapa (i). Esta variante comprende de este modo las etapas que consisten en:

- (i) poner la profosfolipasa B, un sustrato para la fosfolipasa B y el compuesto a someter a ensayo en contacto entre sí en condiciones de activación,
- (ii) medir la conversión del sustrato en función del tiempo, y
- 20 (iii) determinar a partir de dicha conversión la capacidad del compuesto de ensayo para promover o inhibir la activación de profosfolipasa B en fosfolipasa B.

En un procedimiento para someter a ensayo la capacidad de un compuesto para inhibir o potenciar la actividad de una fosfolipasa B de la invención, el compuesto a someter a ensayo puede ser el analito incluido en la mezcla de incubación
25 de la etapa (i). Esta tercera variante comprende de este modo las etapas que consisten en:

- (i) poner en contacto la fosfolipasa B de la invención con el compuesto que se va a someter a ensayo y un sustrato para la fosfolipasa B entre sí en condiciones que permitan la conversión del sustrato,
- (ii) medir la conversión del sustrato en función del tiempo, y
- 30 (iii) determinar la capacidad de aumentar o inhibir dicho compuesto a partir de una comparación entre la conversión medida en la etapa (ii) y la tasa de conversión para condiciones estándar seleccionadas.

Los procedimientos reivindicados pueden ser parte de un procedimiento de desarrollo de fármacos en el que el fármaco final se utilizará para el tratamiento de una condición de enfermedad que se relaciona con las formas de origen nativo
35 de una proteína de mamífero del primer aspecto de la invención.

MEJORES MODOS DE LA INVENCION

Los mejores modos son:

- 40 1) *Aspecto de la proteína*: Las variantes humanas que están aisladas y caracterizadas en la parte experimental. Se cree que en el futuro las variantes producidas recombinantes serán más importantes y, por lo tanto, preferidas. 2) *Aspecto del anticuerpo*: Las preparaciones de anticuerpos policlonales utilizadas en la parte experimental, en particular de especificidades que los hacen útiles para los ensayos bioespecíficos de formas nativas de las proteínas del primer aspecto en muestras derivadas de fluidos biológicos procedentes de seres humanos. Las variantes importantes futuras
45 serán normalmente monoclonales. 3) *Aspecto del procedimiento*: Ensayos bioespecíficos para las formas nativas de las proteínas definidas en el primer aspecto y que están presentes en muestras derivadas de fluidos biológicos procedentes de seres humanos. Los ensayos futuros importantes estarán normalmente en el formato sándwich y/o la utilización de una o más preparaciones de anticuerpos que son monoclonales.

50 PARTE EXPERIMENTAL

PROCEDIMIENTOS

Preparación de proteínas de gránulos. Los gránulos fueron aislados de la capa leucocitaria de la sangre humana normal mediante una modificación del procedimiento descrito anteriormente (Peterson y col., Eur. J. Haematol 40, 415-423 (1988)). Las capas leucocitarias, aproximadamente 51 procedentes de 100 donantes de sangre sanos, se mezclaron con un volumen igual de 2 % de dextrano T-500 en solución salina tamponada con fosfato (Dulbecco, sin calcio ni magnesio). El plasma rico en granulocitos se recogió después de la sedimentación de los glóbulos rojos durante 1 h a temperatura ambiente. Los granulocitos se lavaron dos veces en PBS y una vez en sacarosa 0,34 M
60 mediante centrifugación a 400 g durante 10 min. El sedimento de granulocitos se volvió a suspender en 5 volúmenes de sacarosa 0,34 M. Las células aisladas se rompieron a continuación mediante cavitación con nitrógeno. La suspensión celular se mezcló con un volumen igual de sacarosa 0,34 M y las células se presurizaron a 4 °C durante

30 min bajo nitrógeno a 52 bar con agitación constante en una bomba de nitrógeno (Parr Instrument Company, Moline, IL). Se recogió entonces el cavitato en un volumen igual de sacarosa 0,34 M, NaCl 0,3 M y se centrifugó durante 20 min a 450 g a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó durante 20 min a 10.000 g a 4 °C para sedimentar los gránulos. Después de un ciclo de congelación y descongelación, los gránulos se extrajeron con 5 volúmenes de ácido acético 50 mM durante 1 hora a 4 °C. Se añadió un volumen igual de acetato de sodio 0,4 M con pH 4,0 y el procedimiento de extracción se continuó con agitación magnética durante 4 horas a 4 °C. A continuación, el extracto de gránulo se concentró a aproximadamente 5 ml utilizando un filtro YM-2 (Amicon Corporation, Lexington, EE.UU.).

Procedimientos cromatográficos. El procedimiento comprendía cuatro etapas distintas (A-D) en tres columnas diferentes:

Etapas A filtración en gel: Los extractos ácidos de gránulos obtenidos a partir de granulocitos humanos se cargaron en una columna Sephadex G-75 (2,5 x 90 cm) y se eluyeron por NaAc 0,2 M con pH 4,5. La mayor parte de la proteína de la invención estaba contenida en el segundo pico (volumen/fracciones de elución de 58-69 ml), evaluada por SDS-PAGE después de una separación adicional de las proteínas en cada grupo en la columna Mono-S.

Etapas B cromatografía de intercambio iónico: Sistema FPLC (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) con una columna preempaquetada Mono-S asociada a un gran intercambiador catiónico. Las fracciones/volúmenes de elución de 58-69 ml de la cromatografía de filtración en gel se aplicaron a la columna Mono-S preequilibrada con NaAc 0,1 M con pH 4,0 y se eluyeron por un gradiente lineal de NaCl 0 a 1,0 M en NaAc 0,1 M con pH 4,0 (NaCl 0,1-0,5 M para un volumen de elución de 6-27 ml y finalmente termina en 0,5 ml en un volumen de elución de 36 ml). La proteína de la invención se eluyó en las fracciones/volumen de elución de 19-22 ml (el segundo pico).

Etapas C cromatografía de intercambio iónico: El mismo sistema y columna que en la etapa B, pero la columna ahora se equilibró con fosfato de sodio 0,006 M con pH 7,4 y se eluyó por un gradiente lineal de fosfato de sodio 0,006 a 0,5 M con pH 7,4 para los volúmenes de elución de 5-24 ml. La proteína de la invención se eluyó en el segundo pico principal (fracciones/volumen de elución de 11-14 ml).

Etapas D cromatografía de hidroxipatita: Las fracciones que contienen la proteína de la invención de la etapa C se aplicaron a una columna de hidroxipatita (BioRad) equilibrada con tampón de fosfato sódico 0,02 M con pH 7,2 y se eluyó con un gradiente lineal de tampón de fosfato sódico 0,02 M con pH 7,2 a fosfato de sodio 0,4 M con pH 6,8 para fracciones/volúmenes de elución de 5-25 ml. Las fracciones/volúmenes de elución de 19-22 ml contenían proteína pura.

Aproximadamente 0,5-20 µg de proteínas de las etapas una a cuatro de la purificación se aplicaron a SDS-PAGE, y las proteínas se visualizaron por tinción con plata.

Los inhibidores de la proteinasa, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (100 mg/l) y el inhibidor de tripsina de soja (SBTI) (100 mg/l) se añadieron a todos los tampones de la etapa de rotura celular en la primera cromatografía de intercambio iónico. Las proteínas en los cromatogramas fueron medidas por su absorbancia a 280 nm. La ultrafiltración de las fracciones agrupadas se realizó en un filtro YM-10. El cambio de tampón se realizó en columnas PD-10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia).

Análisis electroforético. Las proteínas en alícuotas de 0,5-20 [µ]g se analizaron con electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) en condiciones reductoras y no reductoras utilizando gel NuPAGE precolado (Novex, Carlsbad, CA), según las instrucciones del fabricante. Las proteínas se visualizaron por tinción con plata.

Análisis de aminoácidos.

Digestión y extracción en gel. Las bandas de 25 kDa y 45 kDa de un carril en un gel teñido con Coomassie se escindieron y se molieron en trozos pequeños. Los trozos de gel se lavaron con agua destilada, se deshidrataron con acetonitrilo y se secaron al vacío. La muestra se rehidrató y se digirió con un tampón de digestión que contenía NH₄CO₃ 50 mM, CaCl₂ 5 mM y 12,5 µg/ml de tripsina modificada con calidad de secuenciación (Promega, Madison, WI) durante la noche a 37 °C. Se recogió el sobrenadante, y los péptidos se extrajeron de los trozos de gel con 20 µl de NH₄HCO₃ 25 mM y varias veces con 20 µl de 50 % acetonitrilo/5 % de ácido fórmico. Se combinaron los sobrenadantes de cada extracción.

Espectrometría de masas MALDI El digesto triptico se analizó por MALDI-Tof (MALDI Compact 4, Kratos, R.U.). El analizador de masas se exploró sobre un intervalo de relación masa a carga (m/z) de 500 a 4000 amu y los espectros resultantes se utilizaron para la búsqueda de las proteínas coincidentes en la base de datos de NCBI utilizando el

programa de búsqueda Mascot (Matrix Science).

Espectrometría de masas nanoelectrospray (MS/MS). Después de la exploración inicial de péptido, un péptido se sometió a análisis MS/MS (Micro Q-Tof, Manchester, R.U.), seguido de una búsqueda con los espectros de fragmentación en los datos del NCBI utilizando el programa de búsqueda Mascot (Matrix Science).

Determinación de proteínas. La concentración de proteínas se determinó con un kit de ensayo de proteína Bio-Rad utilizando albúmina sérica bovina como estándar siguiendo el protocolo del fabricante.

- 10 **Ensayo de enzimas.** La mezcla de reacción (40 µl de volumen final) contenía sustratos 10 mM, tampón fosfato 100 mM que contenía 3 mM de azida de sodio (NaN₃) y 0,5 % de Triton X-100, pH 7,4, y 0,5 µg de enzima o como se indica. Puesto que la formación del producto (ácido graso) fue lineal con el tiempo durante al menos 24 h en las condiciones estándar, la mezcla de reacción se incubó durante 18-20 h y la reacción se detuvo al enfriarse en hielo. El ácido graso libre (FFA por sus siglas en inglés) se determinó por medio del kit NEFA-C (WAKO chemicals, Neuss, Alemania) según las instrucciones del fabricante.

La especificidad posicional de la enzima purificada se determinó usando 1-palmitoil-2-hidroxi-fosfatidilcolina (1-palmitoil-2-hidroxi-PC) y 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C]palmitoil-fosfatidilcolina (1-palmitoil-2-¹⁴C]palmitoil-PC) como sustratos. La actividad de hidrólisis de la enzima en la posición de enlaces éster de acilo de glicerofosfolípidos en sn-1 se determinó como se ha descrito anteriormente usando 1-palmitoil-2-hidroxi-PC como sustrato. Para la actividad de hidrólisis de la enzima en la posición de sn-2, se mezcló dipalmitoilfosfatidilcolina (dipalmitoil-PC (50 nm/reacción) con PC radiomarcada (1-palmitoil-2-[1-¹⁴C]palmitoil-PC, 1 x 10⁵ cpm/reacción). La mezcla se secó bajo gas de nitrógeno y se volvió a suspender en tampón de reacción de fosfato de sodio 0,1 M, NaN₃ 3 mM y 0,5 % de Triton X-100 a pH 7,4 por sonicación para formar micelas de fosfolípidos. La incubación se llevó a cabo a 37 °C durante 20 h, la reacción se detuvo mediante la mezcla con 0,8 ml de reactivo de Dole (32 % de alcohol isopropílico/67 % de heptano/1 % de H₂SO₄ 1 M, 20:5:1) y se agitó en vórtex. Después de la centrifugación durante 2 min a 1000 g, la fase superior que contiene los ácidos grasos libres se purificó adicionalmente mediante extracción con 50 mg de gel de sílice en suspensión en heptano. Los ácidos grasos radiomarcados se cuantificaron por recuento de centelleo.

- 30 *Experimento A:* Didecanoil-PC se incubó con la proteína purificada en diferentes tiempos de almacenamiento y se midió la liberación de ácido graso libre. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo con 0,5 µg de la proteína purificada durante 20 h a 37 °C.

Experimento B: Se midió la liberación de ácido graso libre de los fosfolípidos, didecanoil-PC (Dideca-PC), dipalmitoil-PC (Dipalmi-PC), fosfatidilinositol (PI), fosfatidiletanolamina (PE) y lisofosfatidilcolina (Liso-PC). Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo con 0,5 µg de la proteína purificada (almacenada a 4 °C durante 15 semanas) durante 18-20 h a 37 °C.

Experimento C: La proteína purificada (almacenada a 4 °C durante 16 semanas) se preincubó a temperatura ambiente o a 37 °C durante 15 min con materiales liberados (0,5 µg) inducidos a partir de neutrófilos por PMA antes de la incubación con didecanoil-PC. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo con 0,5 µg de la proteína durante 20 h a 37 °C y se midió la liberación de ácido graso libre.

Experimento D: Detección de la actividad de fosfolipasa A2. El fosfolípido radiactivo, 1-palmitoil-2-[1-¹⁴C]palmitoil-PC se incubó sin (control) o con 1 µg de la proteína purificada (almacenada a 4 °C durante 16 semanas) durante 20 h a 37 °C y la radiactividad se contó como se describe en la sección de materiales y procedimientos.

- 45 *Análisis del pH óptimo, K_m y V_{máx}.* Se añadió la proteína purificada (0,5 µg) a tubos que contenían didecanoil-PC a pH variable (4,0-9,0). Los K_m y V_{máx} se calcularon a partir de gráficas de Hanes de s/vi en concentración(es) de didecanoil-PC.

Electroforesis preparativa. La electroforesis en gel preparativa se realizó en el sistema de PrepCell (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del proveedor. La concentración de acrilamida del gel de separación cilíndrico era 10 %, y el gel tenía aproximadamente 6 cm de largo. El gel acumulador tenía una concentración de acrilamida de 4 % y tenía una longitud de 2,5 cm.

Producción de anticuerpos. Las gallinas ponedoras se inmunizaron con la proteína purificada. Para la inmunización, se emulsionaron 0,5 ml de antígenos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) con un volumen igual de adyuvante de Freund. La primera inmunización se realizó con adyuvante completo de Freund y la inmunización de refuerzo se realizó con adyuvante incompleto de Freund. Las cantidades de antígeno utilizadas para cada inmunización eran 5 [µg]. Las gallinas White Leghorn se inmunizaron por vía intramuscular en el músculo de la pechuga con los antígenos emulsionados. Después de la inmunización inicial, los animales recibieron inyecciones de refuerzo con intervalos de 2 semanas tres veces y los huevos se recogieron de forma continua después del periodo de inmunización inicial de seis semanas. La yema de huevo (2 ml) a partir de los huevos individuales se mezcló con 4 ml de 0,9 % (p/v) de NaCl, 5,25 % (p/v) de PEG 6000, 0,2 % (p/v) de NaN₃. Después de una noche de incubación a

4 °C, la mezcla se centrifugó a 2000 g durante 10 min. El sobrenadante claro se utilizó para la detección de la respuesta a anticuerpos.

Separación celular y preparación de sobrenadante postnuclear

- 5 Las células sanguíneas se separaron por centrifugación en gradiente de densidad sobre solución isotónica al 67 % (v/v) de Percoll (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). La interfase, que contenía las células mononucleares y los linfocitos, se eliminó. La fracción de sedimento, que contenía los eritrocitos y los granulocitos, se trató durante 15 min con solución NH₄Cl isotónica enfriada con hielo (NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4) para lisar los
- 10 eritrocitos, seguido de lisis hipotónica de los eritrocitos residuales. Los granulocitos restantes se lavaron dos veces en PBS (sin Ca²⁺). Para separar aún más los neutrófilos de los eosinófilos, los granulocitos aislados se incubaron durante 1 h a 4 °C con microperlas magnéticas recubiertas con mAb anti-CD 16 (en una proporción de 1 x 10⁷ granulocitos en 30 µl de PBS con 2 % (v/v) de suero de ternero recién nacido a 15 µl de microperlas, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania). Las células se dejaron a continuación que pasaran a través de una columna de matriz de acero
- 15 en un campo magnético. A partir de entonces, se recogieron los eosinófilos que pasaron por la misma. La pureza y la viabilidad de los eosinófilos eran >96 y 99 %, respectivamente. Después de eliminar el campo magnético, los neutrófilos se eluyeron con PBS. La pureza de los neutrófilos fue más del 98 %. Los eosinófilos y neutrófilos aislados se volvieron a suspender, respectivamente, en 6 % (p/v) de solución de sacarosa que contenía 10 µl/ml de cóctel inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). La ultrasonificación se realizó para alterar los
- 20 eosinófilos y los neutrófilos. Los ultrasonificados se ajustaron a 9 % (p/v) de sacarosa antes de la centrifugación a 450 g durante 20 min para eliminar los núcleos y las células intactas. Los sobrenadantes postnucleares (25 µg) se cargaron en geles SDS-PAGE para inmunoelectrotransferencia. Para obtener materiales liberados, los neutrófilos aislados se volvieron a suspender en solución salina equilibrada de Hanks en alrededor de 1 x 10⁸ células/ml y se estimularon con PMA (4 x 10⁻⁷ M) durante 20 min a 37 °C. Después de la centrifugación, se aspiró el material liberado. Bajo esta
- 25 condición, aproximadamente un 6 % y un 60 % de los gránulos primarios y secundarios fueron liberados de los neutrófilos activados, a juzgar por la medición de la mieloperoxidasa y las liberaciones de lipocalina de neutrófilos humana.

- Inmunoelectrotransferencia.** SDS-PAGE se realizó en condiciones no reductoras utilizando geles NuPAGE precolados (Novex, CA), según las instrucciones del fabricante. Para la inmunoelectrotransferencia, las proteínas en el gel NuPAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (0,2 µm), como se describe en las instrucciones del fabricante. Los sitios de unión adicionales se bloquearon por incubación de la membrana de nitrocelulosa en 2 % de leche desnatada en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4 durante 1 h. La membrana se incubó durante la noche con anticuerpos de pollo contra el fragmento de 45 kDa diluido 1/1000, seguido de una incubación de 2 h con Ig Y de pollo anti-conejo
- 30 conjugada con peroxidasa (Immuno-System, Uppsala). El color se desarrolló con kits de ensayos colorimétricos de inmunoelectrotransferencia (Bio-Rad, EE.UU.).

RESULTADOS

40 Purificación de una proteína de la invención (fosfolipasa B putativa = PLB putativa)

- Aproximadamente 0,5-20 µg de proteínas de las etapas una a cuatro de la purificación se aplicaron a SDS-PAGE, y las proteínas se visualizaron por tinción con plata. La proteína purificada de la etapa cuatro de la purificación mostró solo dos bandas con pesos moleculares de 25 kDa y 45 kDa tanto en condiciones no reductoras como reductoras. Sin
- 45 embargo, estas dos moléculas no podían separarse por medios cromatográficos incluyendo la cromatografía Mono-P y en fase inversa. En cromatografía de filtración en gel, la proteína nativa purificada se eluyó en un pico a un peso molecular de alrededor de 130 kDa, y en cromatografía Mono-P, la proteína se eluyó en un pico a un pH alrededor de 8,6.

- 50 **Análisis de aminoácidos.** Con el fin de identificar la proteína, las respectivas bandas a 25 y 45 kDa en el SDS-PAGE fueron digeridas por tripsina, seguido de análisis por MALDI-Tof y MS/MS. El espectro resultante se utiliza para buscar proteínas coincidentes en la base de datos de NCBI, usando el programa de búsqueda Mascot. La búsqueda con el espectro resultante de las bandas a 25 kDa y 45 kDa produjo puntuaciones altas de 76 y 116, respectivamente, para la proteína hipotética FLJ22662 con función desconocida (una proteína de longitud completa de 63 kDa) (las
- 55 puntuaciones de proteínas superiores a 67 son significativas, $P < 0,05$). Los residuos de aminoácidos identificados por MALDI-Tof y MS/MS se muestran en la Tabla 1. Se descubrieron los residuos de la banda de 25 kDa hacia el extremo N-terminal de la proteína de longitud completa, mientras que los residuos de la banda de 45 kDa se descubrieron hacia el extremo C-terminal de la proteína. Parece que las bandas de 25 y 45 kDa en el SDS-PAGE son fragmentos de la proteína hipotética de longitud completa. La comparación de la secuencia de la proteína hipotética con la base de
- 60 datos de la secuencia de GenBank utilizando el programa BLAST reveló una serie de proteínas similares de ratón, rata y bovino con funciones desconocidas, y una PLB de Dictyostelium discoideum (número de acceso Q8MWQ0). La secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética tiene una identidad de 32 % con la de PLB de Dictyostelium

discoideum.

Ensayo de enzimas. Para determinar una posible actividad de desacilación de la PLB putativa, la proteína y los materiales purificados recientemente de diferentes etapas de purificación se incubaron con cualquiera de varios sustratos diferentes, incluyendo didecanoil-fosfatidilcolina (didecanoil-PC), dipalmitoilfosfatidilcolina (dipalmitoil-PC), fosfatidilinositol (PI), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (PE) y 1-palmitoil-2-hidroxilfosfatidilcolina (Liso-PC). No se detectó actividad alguna a excepción de los extractos de ácido de gránulos. Sin embargo, la proteína purificada se almacenó a 4 °C durante un periodo de tiempo eliminó el ácido graso de didecanoil-PC, y la actividad aumentó durante el tiempo de almacenamiento. Además de la desacilación de la fosfatidilcolina, la enzima también mostró actividad de desacilación en PI5 PE y Liso-PC. Para investigar si un cambio en el peso molecular se asoció con la aparición de la actividad de desacilación, la proteína purificada almacenada a 4 °C durante 16 semanas se analizó por SDS-PAGE. Además de las bandas principales a 25 y 45 kDa, aparecieron bandas menores a pesos moleculares de alrededor de 21 y 41-44 kDa que se desplazaron en parte de las principales bandas, coincidiendo con la aparición de una actividad de desacilación significativa. Cuanto más desplazamiento de las principales bandas a las bandas menores, más actividad enzimática aparece. La enzima es activa en un amplio intervalo de pH con un óptimo de 7,4, cuando se utilizó didecanoil-PC como sustrato y se incubó a 37 °C. A partir de las gráficas de Hanes un k_m de 1,1 mM y un valor de $V_{m\acute{a}x.}$ de 21,4 nM/min/mg se calcularon cuando se usó la proteína (almacenada durante 15 semanas). Es obvio que la proteína nativa purificada necesita procesamiento molecular para adquirir su actividad. Para investigar si los factores de activación están presentes en los gránulos de los neutrófilos, la proteína parcialmente activada (0,5 µg, almacenada durante 19 semanas) se preincubó con materiales liberados (0,5 µg) inducidos por PMA de los neutrófilos durante 15 min a temperatura ambiente y a 37 °C antes de la incubación con la mezcla de sustrato. La actividad se incrementó aproximadamente un 10 % por preincubación a temperatura ambiente y un 30 % por preincubación a 37 °C.

Conociendo que la enzima puede eliminar el ácido graso de la posición sn-1 de 1-palmitoil-2-hidroxil-PC (Liso-PC), se incubó con fosfatidilcolina marcada, 1- palmitoil-2-[1-¹⁴C]palmitoil-PC (GM Health care, Uppsala). La enzima también eliminó el ácido graso de la posición sn-2. Sobre la base de estos resultados se concluye que se trata de una nueva PLB humana.

Producción de anticuerpos y localización celular de la nueva PLB en neutrófilos.

En el momento de la inmunización, la molécula de 25 kDa no fue identificada como parte de la proteína hipotética (FLJ22662), por lo tanto, las moléculas de 25 y 45 kDa se separaron por electroforesis preparativa y los antígenos se inyectaron por separado a diferentes pollos. El pollo que dio la molécula de 25 kDa no tenía respuesta al antígeno, mientras que el pollo que dio la molécula de 45 kDa había producido anticuerpos específicos y se hicieron reaccionar con la molécula de 45 kDa como se ve en una inmunoelectrotransferencia. Para investigar el origen de la proteína en los granulocitos, neutrófilos y eosinófilos humanos, se prepararon sobrenadantes postnucleares y las proteínas se separaron en SDS-PAGE, seguido por inmunoelectrotransferencia utilizando los anticuerpos anti-pollo de 45 kDa. Ninguna banda se detectó en el sobrenadante postnuclear de eosinófilos, pero se detectó una banda a un peso molecular de 45 kDa en el sobrenadante postnuclear de neutrófilos, lo que indica el origen de los neutrófilos de la proteína.

DISCUSIÓN

Este estudio ha demostrado la identificación, purificación y caracterización de una nueva proteína a partir de extractos de ácido de gránulos de granulocitos de neutrófilos de donantes de sangre sanos por medio de un procedimiento simple de tres columnas. La proteína se identificó como una nueva PLB contenida en los gránulos secretores de los neutrófilos humanos. El descubrimiento arroja nueva luz sobre el papel de los neutrófilos en la inflamación, ya que esta enzima no solo puede tener la capacidad de destruir bacterias, sino también tener la capacidad de generar mediadores lipídicos de la inflamación en los procesos locales que implican neutrófilos. Las PLB son enzimas que pueden eliminar los ácidos grasos de los glicerofosfolípidos tanto en la posición sn-1 como en sn-2 y, por lo tanto, presentan actividades tanto de fosfolipasa A2 como de lisofosfolipasa. Varias PLB se han identificado en bacterias (Farn y col., citado anteriormente), hongos (Ghannoum y col., citado anteriormente), Dictyostelium discoideum (Ferber y col., citado anteriormente), en células de mamífero (Gassama-Diagne y col., citado anteriormente; Tojo y col., citado anteriormente; Boll y col., observado anteriormente.; y Maury y col., citado anteriormente) y en venenos de abeja y serpiente. Los genes que codifican estas PLB se clonaron y tres familias de genes distintos han sido identificadas a partir de bacterias, hongos y mamíferos (Boll y col., citado anteriormente (Farn y col, citado anteriormente.) (Ghannoum y col., citado anteriormente); Maury y col., citado anteriormente; Delagebeaudeuf y col., J Biol. Chem. 273, 13407-13414 (1998); y Takemori y col., J. Biol. Chem. 273, 2222-2231 (1998)). Sin embargo, el gen (FLJ22662) no está relacionado con ninguna de estas familias de genes y la proteína codificada carece del motivo de lipasa típico (Schrag y col., citado anteriormente) encontrado en lipasas y fosfolipasas hacia el extremo C-terminal, lo que sugiere que la PLB putativa es un miembro de una nueva familia de genes de PLB como se describe para PLB de Dictyostelium (Morgan y col., Biochem. J. 382, 441-449 (2004)). Se sugiere que esta nueva PLB deba ser nombrada fosfolipasa B

humana de tipo II (HPLB-II) para distinguir este producto de gen de las PLB anteriormente mencionadas. Ya que la HPLB-II también mostró la actividad de PLA2, puede suponerse que puede estar implicada en diversos procesos biológicos, tales como el metabolismo del ácido araquidónico (Leslie CC, J. Biol. Chem. 272, 16709-16712 (1997)), aterosclerosis (Webb y col., Arterioscler. Thromb. Vase. Biol. 23, 263-268 (2003)) y la defensa antibacteriana (Buckland y col., Biochim. Biophys. Acta. 1488, 71-82 (2000); y (Koduri y col., J Biol. Chem. 277, 5849-5857 (2002)).

Era obvio que la HPLB-II necesita un procesamiento molecular para adquirir su actividad de desacilación. Una observación similar se hizo en la PLB5 intestinal de conejillo de indias que se produce como una proenzima activada al cambiar el peso molecular de 170 kDa a 140 kDa por un tratamiento con tripsina (Delagebeaudeuf y col., (1998) citado anteriormente). Los materiales de las diferentes etapas de purificación (etapa 2-4) no mostraron actividad de desacilación a excepción de los extractos de ácido de gránulos. La actividad observada en los extractos de ácido de gránulos no era probablemente debido a las PLA2 presentes en gránulos primarios y secundarios de neutrófilos (Victor y col., FEBS Lett. 136, 298-300 (1981); y Degousee y col., J. Biol. Chem. 277, 5061-5073 (2002)), ya que estos son enzimas dependientes de Ca^{2+} y Ca^{2+} no fue añadida a la mezcla de incubación. Por lo tanto, puede haber factores en los gránulos que conducen a la activación de la HPLB-II. Esto fue confirmado por la preincubación de la enzima parcialmente activada con materiales liberados de los neutrófilos. Esta preincubación activa aún más la enzima. El mecanismo, sin embargo, por el cual la HPLB-II gana actividad, queda por investigar. La caracterización de la especificidad del sustrato indica que la HPLB-II no se limita a hidrolizar fosfatidil-PC, ya que PI y PE también sirven como sustratos. La enzima es activa en un amplio intervalo de pH con un óptimo de 7,4, lo que sugiere un papel de desacilación extracelular. La inmunoelectrotransferencia fue elegida para determinar la localización de la HPLB-II en los granulocitos humanos, debido a que el antígeno utilizado para la inmunización estaba en una forma desnaturalizada después de la separación por electroforesis preparativa. Por lo tanto, los anticuerpos producidos en este estudio son adecuados para detectar la forma desnaturalizada de la molécula. La inmunoelectrotransferencia indicó un origen de neutrófilos de HPLB-II. Sin embargo, la inmunoelectrotransferencia no logró mostrar una banda a un peso molecular de 63 kDa (un peso molecular de proteína hipotética de longitud completa FLJ22662). La explicación para esto podría ser que la proteína de longitud completa de 63 kDa es escindida por proteasas presentes en la preparación del sobrenadante postnuclear. Sin embargo, esto es improbable, ya que un cóctel de inhibidores de proteasa fue incluido en la preparación. Otra explicación es que la proteína de longitud completa ya ha sido procesada en fragmentos de 25 y 45 kDa durante la granulopoyesis.

Los fragmentos de 25 y 45 kDa fueron vistos en SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Sin embargo, las dos moléculas no se separaron mediante procedimientos cromatográficos aplicados en este estudio, incluyendo cromatografía de intercambio iónico y cromatografía en fase inversa. Estos resultados y el peso molecular aparente de 130 kDa mediante filtración en gel sugieren que la proteína, de hecho, es una proteína oligomérica que comprende al menos dos moléculas de 25 kDa y dos de 45 kDa asociadas de forma no covalente.

Tabla 1 Huella peptídica de masa de la proteína purificada

Subunidades de 25 kDa			Subunidades de 45 kDa		
N.º	m/z	N.º de residuos en FLJ22662	N.º	m/z	N.º de residuos en FLJ22662
1	1129,62	47-57	1	2685,34	233-255
2	1160,62	52-61	2	1819,85	259-273
3	1144,62	75-84	3	1468,80	313-324
4	895,41	134-140	4	1921,89	345-360
5	832,42	141-146	5	2715,36	371-393
6	1230,57	151-159	6	1750,85	394-407
7	810,37	154-159	7	1622,75	395-407
8	1821,91	160-176	8	1381,69	421-432
			9	1251,48	466-475
			10	2972,53	493-520
			11	2595,32	527-548
Las secuencias/fragmentos de aminoácido que se muestran en negrita se determinaron por MS/MS					

40 CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA INNOVADORA EN VARIOS FLUIDOS BIOLÓGICOS.

- Un radioinmunoensayo (RIA, por sus siglas en inglés) de doble anticuerpo fue desarrollado para la medición de HPLB-II. La HPLB-II se marcó con ^{125}I por el procedimiento con cloramina T. ^{125}I libre se separó de la proteína marcada por filtración en gel en una columna de Sephadex G-25. Antes de la incubación por RIA, el antígeno marcado se diluyó en
- 5 tampón de ensayo (fosfato de sodio 50 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 80 mM, Na-EDTA 10 mM, 0,2 % de albúmina sérica bovina, 0,02 % de NaN_3 , 0,2 % de CTAB y 0,5 % de Tween 20) a 38.000 ± 2000 cpm/100 μl (trazador). Una solución de 50 μl de cualquier muestra o patrón (2-128 $\mu\text{l/l}$) se mezcló secuencialmente con 50 μl de HPLB-II marcada (trazador), 50 μl de anticuerpos específicos cultivados en conejo (diluido 1:60000 en tampón de ensayo) y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente. A partir de entonces, 0,5 ml de suspensión de decantación que contenía IgG anti-
- 10 conejo en Sephadex cultivada en ovejas se añadieron y la incubación continuó durante 1 h a 4 °C. Los complejos de anticuerpo de HPLB-II unidos en IgG anti-conejo en Sephadex se separaron y se sedimentaron por centrifugación a 18 °C durante 15 min a 4000 rpm. Después de la decantación, la radiactividad se midió en un contador de rayos gamma.
- 15 **Resultados:** Una curva estándar indica un posible intervalo de medición de 1-100 $\mu\text{g/l}$ de PLB-II (cuatro subunidades) con un límite de detección de 1 $\mu\text{g/l}$. La PLB-II en el suero normal era indetectable mientras que niveles elevados se encontraron en el suero obtenido de pacientes con infecciones agudas bacterianas (3-9 $\mu\text{g/l}$). Los niveles altamente elevados también fueron encontrados en los fluidos de lavado pulmonar de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (1-21 $\mu\text{g/l}$) y fluido intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (22-52 $\mu\text{g/l}$).

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Venge, Per
Xu, Shengyuan

5

<120> Nueva proteína bioactiva

<130> PL-BII Venge/Xu

10 <150> US 60/794.898

<151> 25-04-2006

<160> 3

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 552

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Thr	Arg	Gly	Gly	Pro	Gly	Gly	Arg	Pro	Gly	Leu	Pro	Gln	Pro	Pro
1				5					10					15	

Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ala	Glu
			20					25					30		

Pro	Pro	Lys	Pro	Ala	Gly	Val	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Ala	Tyr	Trp	Met	Pro
		35					40					45			

Ala	Glu	Lys	Thr	Val	Gln	Val	Lys	Asn	Val	Met	Asp	Lys	Asn	Gly	Asp
	50					55					60				

Ala	Tyr	Gly	Phe	Tyr	Asn	Asn	Ser	Val	Lys	Thr	Thr	Gly	Trp	Gly	Ile
65					70					75				80	

Leu	Glu	Ile	Arg	Ala	Gly	Tyr	Gly	Ser	Gln	Thr	Leu	Ser	Asn	Glu	Ile
				85					90					95	

Ile	Met	Phe	Val	Ala	Gly	Phe	Leu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Thr	Ala	Pro	His
			100					105					110		

25

ES 2 793 310 T3

Met	Asn	Asp	His	Tyr	Thr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gln	Leu	Ile	Thr	Lys	Pro			
		115					120					125						
Ser	Ile	Met	Asp	Lys	Val	Gln	Asp	Phe	Met	Glu	Lys	Gln	Asp	Lys	Trp			
	130					135					140							
Thr	Arg	Lys	Asn	Ile	Lys	Glu	Tyr	Lys	Thr	Asp	Ser	Phe	Trp	Arg	His			
145					150					155					160			
Thr	Gly	Tyr	Val	Met	Ala	Gln	Ile	Asp	Gly	Leu	Tyr	Val	Gly	Ala	Lys			
				165					170					175				
Lys	Arg	Ala	Ile	Leu	Glu	Gly	Thr	Lys	Pro	Met	Thr	Leu	Phe	Gln	Ile			
			180					185					190					
Gln	Phe	Leu	Asn	Ser	Val	Gly	Asp	Leu	Leu	Asp	Leu	Ile	Pro	Ser	Leu			
		195					200					205						
Ser	Pro	Thr	Lys	Asn	Gly	Ser	Leu	Lys	Val	Phe	Lys	Arg	Trp	Asp	Met			
	210					215					220							
Gly	His	Cys	Ser	Ala	Leu	Ile	Lys	Val	Leu	Pro	Gly	Phe	Glu	Asn	Ile			
225					230					235				240				
Leu	Phe	Ala	His	Ser	Ser	Trp	Tyr	Thr	Tyr	Ala	Ala	Met	Leu	Arg	Ile			
				245					250					255				
Tyr	Lys	His	Trp	Asp	Phe	Asn	Ile	Ile	Asp	Lys	Asp	Thr	Ser	Ser	Ser			
		260						265					270					
Arg	Leu	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Pro	Gly	Phe	Leu	Glu	Ser	Leu	Asp	Asp			
		275					280					285						
Phe	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ser	Gly	Leu	Ile	Leu	Leu	Gln	Thr	Thr	Asn	Ser			
	290					295					300							

ES 2 793 310 T3

Val	Phe	Asn	Lys	Thr	Leu	Leu	Lys	Gln	Val	Ile	Pro	Glu	Thr	Leu	Leu	305	310	315	320
Ser	Trp	Gln	Arg	Val	Arg	Val	Ala	Asn	Met	Met	Ala	Asp	Ser	Gly	Lys	325	330	335	
Arg	Trp	Ala	Asp	Ile	Phe	Ser	Lys	Tyr	Asn	Ser	Gly	Thr	Tyr	Asn	Asn	340	345	350	
Gln	Tyr	Met	Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Lys	Val	Lys	Leu	Asn	His	Ser	Leu	355	360	365	
Asp	Lys	Gly	Thr	Leu	Tyr	Ile	Val	Glu	Gln	Ile	Pro	Thr	Tyr	Val	Glu	370	375	380	
Tyr	Ser	Glu	Gln	Thr	Asp	Val	Leu	Arg	Lys	Gly	Tyr	Trp	Pro	Ser	Tyr	385	390	395	400
Asn	Val	Pro	Phe	His	Glu	Lys	Ile	Tyr	Asn	Trp	Ser	Gly	Tyr	Pro	Leu	405	410	415	
Leu	Val	Gln	Lys	Leu	Gly	Leu	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Asp	Leu	Ala	Pro	Arg	420	425	430	
Ala	Lys	Ile	Phe	Arg	Arg	Asp	Gln	Gly	Lys	Val	Thr	Asp	Thr	Ala	Ser	435	440	445	
Met	Lys	Tyr	Ile	Met	Arg	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Lys	Lys	Asp	Pro	Tyr	Ser	450	455	460	
Arg	Gly	Asp	Pro	Cys	Asn	Thr	Ile	Cys	Cys	Arg	Glu	Asp	Leu	Asn	Ser	465	470	475	480
Pro	Asn	Pro	Ser	Pro	Gly	Gly	Cys	Tyr	Asp	Thr	Lys	Val	Ala	Asp	Ile	485	490	495	
Tyr	Leu	Ala	Ser	Gln	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ala	Ile	Ser	Gly	Pro	Thr	Val	500	505	510	

ES 2 793 310 T3

Gln Gly Gly Leu Pro Val Phe Arg Trp Asp Arg Phe Asn Lys Thr Leu
515 520 525

His Gln Gly Met Ala Glu Val Tyr Asn Phe Asp Phe Ile Thr Met Lys
530 535 540

Pro Ile Leu Lys Leu Asp Ile Lys
545 550

<210> 2

<211> 130

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Ala Glu Lys Thr Val Gln Val Lys Asn Val Met Asp Lys Asn
1 5 10 15

Gly Asp Ala Tyr Gly Phe Tyr Asn Asn Ser Val Lys Thr Thr Gly Trp
20 25 30

Gly Ile Leu Glu Ile Arg Ala Gly Tyr Gly Ser Gln Thr Leu Ser Asn
35 40 45

Glu Ile Ile Met Phe Val Ala Gly Phe Leu Glu Gly Tyr Leu Thr Ala
50 55 60

Pro His Met Asn Asp His Tyr Thr Asn Leu Tyr Pro Gln Leu Ile Thr
65 70 75 80

Lys Pro Ser Ile Met Asp Lys Val Gln Asp Phe Met Glu Lys Gln Asp
85 90 95

Lys Trp Thr Arg Lys Asn Ile Lys Glu Tyr Lys Thr Asp Ser Phe Trp
100 105 110

10

Arg His Thr Gly Tyr Val Met Ala Gln Ile Asp Gly Leu Tyr Val Gly
115 120 125

Ala Lys
130

<210> 3

15 <211> 316

ES 2 793 310 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

5

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

ES 2 793 310 T3

Lys Val Lys Leu Asn His Ser Leu Asp Lys Gly Thr Leu Tyr Ile Val		
130	135	140
Glu Gln Ile Pro Thr Tyr Val Glu Tyr Ser Glu Gln Thr Asp Val Leu		
145	150	155
		160
Arg Lys Gly Tyr Trp Pro Ser Tyr Asn Val Pro Phe His Glu Lys Ile		
	165	170
		175
Tyr Asn Trp Ser Gly Tyr Pro Leu Leu Val Gln Lys Leu Gly Leu Asp		
	180	185
		190
Tyr Ser Tyr Asp Leu Ala Pro Arg Ala Lys Ile Phe Arg Arg Asp Gln		
	195	200
		205
Gly Lys Val Thr Asp Thr Ala Ser Met Lys Tyr Ile Met Arg Tyr Asn		
	210	215
		220
Asn Tyr Lys Lys Asp Pro Tyr Ser Arg Gly Asp Pro Cys Asn Thr Ile		
225	230	235
		240
Cys Cys Arg Glu Asp Leu Asn Ser Pro Asn Pro Ser Pro Gly Gly Cys		
	245	250
		255
Tyr Asp Thr Lys Val Ala Asp Ile Tyr Leu Ala Ser Gln Tyr Thr Ser		
	260	265
		270
Tyr Ala Ile Ser Gly Pro Thr Val Gln Gly Gly Leu Pro Val Phe Arg		
	275	280
		285
Trp Asp Arg Phe Asn Lys Thr Leu His Gln Gly Met Ala Glu Val Tyr		
	290	295
		300
Asn Phe Asp Phe Ile Thr Met Lys Pro Ile Leu Lys		
305	310	315

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de mamífero que consiste en una o dos subunidades de polipéptido SU de cadena sencilla que son diferentes con respecto a sus secuencias de aminoácidos, donde dichas subunidades son
 - i) SU1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; y
 - ii) SU2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3,en la que la proteína comprende al menos una subunidad SU2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
2. La proteína de mamífero de la reivindicación 1, **caracterizada porque** está desprovista de cualquier subunidad SU1 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
3. La proteína de mamífero de la reivindicación 1, **caracterizada porque** comprende al menos una o dos subunidades SU1 que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y al menos una o dos subunidades SU2 que consisten en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, donde las subunidades SU se derivan de la misma especie de mamífero.
4. La proteína de mamífero de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, **caracterizada porque** una subunidad SU2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 tiene un peso molecular de aproximadamente 25 kDa y una subunidad SU2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 tiene un peso molecular de aproximadamente 45 kDa.
5. La proteína de mamífero de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, **caracterizada porque** es un profosfolipasa B (PLB-II).
6. La proteína de mamífero de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, **caracterizada porque** presenta una actividad de fosfolipasa B y comprende una subunidad SU2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 en forma activada con un peso molecular que es inferior al menos 0,5 kDa en la forma nativa inactiva de la subunidad SU2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.
7. La proteína de mamífero de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, **caracterizada porque** se proporciona en forma derivatizada, por ejemplo a) marcada con un marcado analíticamente detectable, o b) inmovilizada en una fase sólida o equipada con un marcador de inmovilización que hace que la proteína de mamífero sea inmovilizable en una fase sólida.
8. Una preparación de anticuerpos que se dirige específicamente contra una proteína de mamífero según cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un procedimiento de determinación de la presencia o el nivel de un analito en una muestra, **caracterizado porque** A) es un procedimiento analítico para indicar una condición de enfermedad asociada con niveles anormales de la proteína de mamífero como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en individuos mamíferos (pacientes), y b) comprende las etapas que consisten en:
 - (i) medir el nivel de la proteína en una muestra que se deriva de un fluido biológico procedente de un individuo mamífero,
 - (ii) usar un nivel encontrado que supera el nivel de los individuos normales (sanos) de la misma especie como una indicación de que dicho individuo padece la condición de enfermedad.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, **caracterizado porque** comprende un ensayo de afinidad bioespecífica para medir el nivel de la proteína de mamífero.
11. El procedimiento de la reivindicación 9, **caracterizado porque** el analito es enzimáticamente activo, por ejemplo, PLB-II activa o proPLB-II activa, y porque el procedimiento comprende que el nivel de la proteína de mamífero se mida mediante la utilización de dicha actividad.
12. El procedimiento de la reivindicación 9 en combinación con las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado porque** el nivel encontrado es aumentado y es utilizado como indicación de i) una enfermedad inflamatoria/inflamación, ii) una infección microbiana, tal como una infección viral, bacteriana o por priones, iii) una enfermedad cardiovascular, o iv) un trastorno lipídico, que implican por ejemplo granulocitos de neutrófilos y/o monocitos/macrófagos.

13. El procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado porque** A) la proteína de mamífero es una forma de profosfolipasa B-II (proPLB-II), y B) el procedimiento es una prueba para verificar la capacidad de un compuesto (analito) para transformar o para inhibir la transformación de proPLB-II en una forma enzimática activa de PLB-I que
5 comprende las etapas que consisten en:

- (i) poner la profosfolipasa B, un sustrato para la fosfolipasa B y el compuesto a someter a ensayo en contacto entre sí en condiciones de activación,
- (ii) medir la conversión del sustrato en función del tiempo, y
- 10 (iii) determinar a partir de dicha conversión la capacidad del compuesto de ensayo para activar la profosfolipasa B en fosfolipasa B.

14. Un procedimiento de determinación de la presencia o el nivel de una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en una muestra, **caracterizado porque** A) la proteína de mamífero es una forma enzimática activa de fosfolipasa B-II (PLB-II), y B) el procedimiento es una prueba para verificar la capacidad de un compuesto (analito)
15 para mejorar o inhibir la actividad enzimática de PLB-II, que comprende las etapas que consisten en:

- (i) poner la profosfolipasa B, un sustrato para la fosfolipasa B y el compuesto a someter a ensayo en contacto entre sí en condiciones de activación,
- 20 (ii) medir la conversión del sustrato en función de tiempo, y determinar a partir de dicha conversión la capacidad del compuesto de ensayo para mejorar o inhibir la actividad enzimática de PLB-II.