



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 281 898**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/15 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95909203 .2**

86 Fecha de presentación : **13.12.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **0815202**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.1998**

54 Título: **Inhibidor tisular humano de metaloproteinasa-4.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2007

73 Titular/es: **HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.**
14200 Shady Grove Road
Rockville, Maryland 20850, US

72 Inventor/es: **Greene, John M. y**
Rosen, Craig A.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 281 898 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

Inhibidor tisular humano de metaloproteinasa-4.

5 Esta invención se refiere a polinucleótidos recién identificados, polipéptidos codificados por tales polinucleótidos, el uso de tales polinucleótidos y polipéptidos, así como la producción de tales polinucleótidos y polipéptidos. Más particularmente, los polipéptidos de la presente invención son polipéptidos del inhibidor tisular humano de la metaloproteinasa-4, más adelante se denomina "TIMP-4 humano". La invención también se refiere a la inhibición de la acción de tales polipéptidos.

10 La matriz extracelular es una estructura compleja que contiene colágeno, proteoglicano, glicosaminoglicano, glicoproteínas (fibronectina, condronectina, laminina) y en algunos tejidos, elastina (Hay, E.D., *J. Cell Biol.*, 91:205-223 (1981)).

15 Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs, del Inglés "Matrix Metalloproteinases") constituyen el grupo principal de endopeptidasas de unión a zinc que degradan las proteínas de la matriz extracelular, por ejemplo, del tejido conectivo, colágeno y gelatina, durante la remodelación del tejido conectivo durante los procesos fisiológicos normales y algunos patológicos. La actividad incontrolada de las MMPs puede dar como resultado un considerable daño tisular, y estas enzimas han estado implicadas en una diversidad de procesos de enfermedad, incluyendo la invasión celular tumoral, la angiogénesis tumoral y la artritis reumatoides (Okada, Y., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 261:14.245-14.255 (1986)). Las MMPs se secretan a partir de células como zimógenos inactivos y su actividad en el ambiente extracelular está regulado por diversos activadores e inhibidores (Matrisian, L.M., *Trends Genet.*, 6:121-125 (1990)).

25 La regulación de la proteólisis mediada por metaloproteinasa puede darse mediante proteínas inhibitoras que se dan de manera natural, tal como el inhibidor tisular de metaloproteinasa (TIMP, del Inglés, "Tissue Inhibitor of Metalloproteinase"). El equilibrio entre la producción y la activación de las MMPs, y su inhibición por inhibidores naturales tal como TIMP, determina, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, si el tejido conectivo está degradado.

30 Las MMPs incluyen un número de proteasas, ilustradas por la propia colagenasa intersticial (tipo I), las estromelisininas (también conocidas como proteoglicanasas o transinas), fibroblasto y gelatinasas de leucocito polimorfonuclear (también conocidas como colagen-IV-asas) y "pump-1" (metaloproteasas 1 putativas, metaloproteasas uterinas) [Goldberg *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 261:6.600 (1986); Whitman *et al.*, *Biochem. J.*, 240:913 (1986); Breathnach *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 15:1.139 (1987); Muller *et al.*, *Biochem. J.*, 253:187 (1988); Collier *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:6.579 (1988); Murphy *et al.*, *Biochem. J.*, 258:463 (1989); Quantin *et al.*, *Biochem. (N.Y.)*, 28:5.327 (1989); Birkedal-Hansen, *J. Oral Pathol.*, 17:445 (1988)].

35 En general, la familia mamífera de proteasas tiene una o más de las siguientes propiedades: (a) actividad proteolítica óptima alrededor de pH neutro; (b) dependencia de la actividad de la enzima en presencia de zinc, tan evidente por la pérdida de actividad en el tratamiento con quelantes de ión metálico divalente, tal como fenantrolina 1,10 (quelación preferencial de zinc) o EDTA (propiedades de quelación menos restringidas; EDTA y EGTA también contribuyen a la inactivación enzimática vía quelación de iones calcio requeridos para la estabilidad enzimática); (c) inhibición por TIMPs; (d) ausencia de inhibición significativa por inhibidores conocidos de otras familias de metaloproteasas que contienen zinc, neutrales, tal como termolisis, enzima convertidora de la angiotensina y "encefalinasas"; y (e) biosíntesis y secreción como formas precursoras latentes (zimógenos), que requieren la activación extracelular. Se ha conseguido la activación mediante un número de endoproteasas, agentes organomercuriales y caotrópicos.

40 En general, los miembros de la familia de las enzimas metaloproteasa neutras tienen distintivas especificidades de sustrato. Por tanto, la colagenasa tipo I es única en su capacidad de escindir un péptido específico unido en las fibrillas naturales de los colágenos intersticiales (por ejemplo, tipos I, II y III). Las gelatinasas son sólo escasamente activas en estos colágenos, pero son capaces de degradar colágenos intersticiales desnaturalizados, así como los colágenos no fibrilares, por ejemplo, tipo IV, tal como se encuentran en la membrana basal. Se ha informado que Pump 1 actúa preferentemente sobre los colágenos desnaturalizados (gelatinas), aunque su perfil difiere del de las estromelisininas o las colagenasas tipo IV. Tanto las estromelisininas como las gelatinasas también son capaces de degradar las proteínas estructurales no colagenosas, tal como la proteína central de proteoglicano y elastina. Las macromoléculas implicadas en las interacciones célula a sustrato y célula a célula, tal como laminina y fibronectina, son también susceptibles a la degradación por varias de estas metaloproteasas.

45 Las enzimas de esta familia se producen por fibroblastos de piel y sinoviales, condrocitos, células mononucleares periféricas, queratinocitos y tejido gingival. Estos también existen dentro de las vesículas de almacenamiento granular en leucocitos polimorfonucleares (PMNLs, del Inglés "Polymorphonuclear Leukocytes").

50 La información actual sugiere que hay una familia de inhibidores de metaloproteinasa que comprende TIMP-1 (inhibidor tisular de metaloproteinasas-1); TIMP-2; TIMP-3 humano el cual se ha clonado, expresado y mapeado en el cromosoma 22 humano; y el inhibidor tisular de metaloproteinasa de pollo (ChIMP-5). El polipéptido de la presente invención se ha identificado supuestamente como un novedoso polipéptido de TIMP humano basado en la homología de la secuencia de aminoácidos.

ES 2 281 898 T3

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se ha proporcionado un novedoso polipéptido maduro que es TIMP-4 humano, así como fragmentos biológicamente activos y diagnósticamente o terapéuticamente útiles, análogos y derivados de los mismos.

5 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se ha proporcionado moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican TIMP-4 humano, incluyendo ARNms, ADNs, ADNcs, ADNs genómicos así como fragmentos biológicamente activos y diagnósticamente o terapéuticamente útiles, análogos y derivados de los mismos.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado un proceso para producir dicho polipéptido mediante técnicas recombinantes que comprende el cultivo de células huésped procariotas y/o eucariotas recombinantes, que contienen una secuencia de ácido nucleico de TIMP-4 humano bajo condiciones que promueven la expresión de la proteína y la posterior recuperación de dicha proteína.

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado una composición farmacéutica que contiene la proteína TIMP-4 humana de la invención la cual es eficaz para complementar el TIMP-4 humano endógeno de un enfermo y, de ese modo, aliviar las enfermedades relacionadas con la insuficiente actividad de TIMP-4 humano que incluyen, por ejemplo, enfermedades artríticas tales como reumatoide y osteoartritis, reumatismo de tejido suave, policondritis y tendonitis; enfermedades de resorción de hueso, tal como osteoporosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo y colesteatoma; la destrucción de colágeno aumentada que se da conjuntamente con la diabetes; las
20 clases recesivas de epidermolisis bulosa distrófica; enfermedad periodontal, alveolitis y consecuencias relacionadas de la producción gingival de colagenasa; ulceración corneal; ulceración de la piel y el tracto gastrointestinal y curación anormal de heridas; enfermedades de post operatorio en las cuales se aumentan los niveles de colagenasa; cáncer mediante el bloqueo de la destrucción de las membranas basales tisulares que conduce a la metástasis cancerosa; enfermedades de desmielinación de los sistemas nerviosos centrales y periféricos; asma; glomeruloesclerosis; choque
25 séptico e infección; y soriasis.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado un anticuerpo frente a tales polipéptidos.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se ha proporcionado sondas de ácido nucleico que comprenden moléculas de ácido nucleico de suficiente longitud para hibridar específicamente con las secuencias de TIMP-4 humano.

35 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se han proporcionado antagonistas para tales polipéptidos los cuales se pueden emplear con propósitos terapéuticos, por ejemplo, para remodelar y reparar el tejido y para la destrucción del tejido cicatriz.

40 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se han proporcionado ensayos de diagnóstico para detectar enfermedades relacionadas con mutaciones en las secuencias de TIMP-4 humano y la sobre expresión del polipéptido.

Estos y otros aspectos de la presente invención deberían estar claros para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

45 Los siguientes dibujos son ilustrativos de las realizaciones de la invención y no se supone que limitan el alcance de la invención tal como lo abarcado por las reivindicaciones.

50 La Figura 1 muestra la secuencia de ADNc y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida del polipéptido completo de TIMP-4 humano. Se usan las abreviaciones estándar de una letra para los aminoácidos. La secuenciación se realizó usando un secuenciador de ADN automatizado 373 (Applied Biosystems, Inc.). Se prevé que la precisión de la secuenciación es mayor que preciso al 97%.

La Figura 2 es una comparación de secuencia de aminoácidos entre el polipéptido de la presente invención y otros polipéptidos de TIMP humano.

55 La Figura 3 expone los resultados de un análisis de transferencia tipo Northern que indica los diversos tejidos humanos en los cuales se expresa el TIMP-4 humano.

60 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se ha proporcionado un ácido nucleico aislado (polinucleótido) que codifica el polipéptido maduro que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de la Figura 1 o el polipéptido maduro codificado por el ADNc del clon depositado como N° Depósito ATCC 75946 el 11 de Noviembre de 1994.

65 Se puede obtener un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención a partir de un cerebro humano en primera fase. Este contiene un marco de lectura abierto y codifica una proteína de 224 residuos de aminoácido de los cuales aproximadamente los primeros 29 residuos representan la secuencia líder de modo que la proteína madura comprende 195 residuos de aminoácido. El polinucleótido de esta invención se descubrió en una genoteca de ADNc derivada de un cerebro humano en fase temprana. La proteína presenta el mayor grado de homología con el TIMP-2 humano con un 48% de identidad y un 72% de similitud sobre un tramo de 136 aminoácidos. El TIMP-4 humano tiene la signatura de 12 aminoácidos de cisteína, los cuales se conservan en todos los miembros de la familia

ES 2 281 898 T3

del TIMP. Los 12 residuos de cisteína están todos unidos a disulfuro en TIMP-1 y TIMP-2. Esta evidencia fuertemente sugiere que el polipéptido de la presente invención es un miembro novedoso de la familia del TIMP.

5 El polinucleótido de la presente invención puede estar en forma de ARN o en forma de ADN, dicho ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético. El ADN puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, y si es de cadena sencilla puede ser la cadena codificadora o la cadena no codificadora (antisentido). La secuencia codificadora, la cual codifica el polipéptido maduro, puede ser idéntica a la secuencia codificadora mostrada en la Figura 1 o a la del clon depositado o puede ser una secuencia codificadora diferente, dicha secuencia codificadora, como resultado de la redundancia o la degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido maduro que el ADN de la Figura 1 o el ADNc depositado.

15 El polinucleótido que codifica el polipéptido maduro de la Figura 1 o el polipéptido maduro codificado por el ADNc depositado puede incluir: únicamente la secuencia codificadora del polipéptido maduro; la secuencia codificadora del polipéptido maduro y la secuencia codificadora adicional tal como una secuencia secretora o líder o una secuencia de proproteína; la secuencia codificadora del polipéptido maduro (y opcionalmente la secuencia codificadora adicional) y la secuencia no codificadora, tal como intrones o la secuencia no codificadora 5' y/o 3' de la secuencia codificadora del polipéptido maduro.

20 Por tanto, el término "polinucleótido que codifica un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye únicamente la secuencia codificadora para el polipéptido así como un polinucleótido que incluye secuencia codificadora y/o no codificadora adicional.

25 Además, la presente invención se refiere a variantes de los polinucleótidos anteriormente descritos los cuales codifican los fragmentos, análogos y derivados del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de la Figura 1 o el polipéptido codificado por el ADNc del clon depositado. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica del polinucleótido que se da de manera natural o una variante del polinucleótido que no se da de manera natural.

30 Por tanto, la presente invención incluye polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido maduro que el mostrado en la Figura 1 o el mismo polipéptido maduro codificado por el ADNc del clon depositado así como variantes de tales polinucleótidos, codificando dichas variantes un fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la Figura 1 o el polipéptido codificado por el ADNc del clon depositado. Tales variantes de nucleótido incluyen variantes de delección, variantes de sustitución y variantes de adición o inserción.

35 Tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria, el polinucleótido puede tener una secuencia codificadora que es una variante alélica que se da de manera natural de la secuencia codificadora mostrada en la Figura 1 o de la secuencia codificadora del clon depositado. Tal como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia de polinucleótido que puede tener una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos, lo cual no altera sustancialmente la función del polipéptido codificado.

40 La presente invención también incluye polinucleótidos, en los cuales la secuencia codificadora del polipéptido maduro se puede fusionar en el mismo marco de lectura a una secuencia de polinucleótido lo cual ayuda en la expresión y secreción de un polipéptido a partir de una célula huésped, por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia líder es una proproteína y puede tener la secuencia líder escindida por la célula huésped para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos también pueden codificar una proproteína que es la proteína madura más residuos de aminoácidos 5' adicionales. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que se escinde la prosequencia se queda una proteína madura activa.

50 Por tanto, por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención puede codificar una proteína madura o una proteína que tiene una prosequencia o una proteína que tiene tanto una prosequencia como una presequencia (secuencia líder).

55 Los polinucleótidos de la presente invención también pueden tener la secuencia codificadora fusionada en el marco a una secuencia señal la cual permite la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia señal puede ser una etiqueta de hexahistidina administrada por un vector pQE-9 para asegurar la purificación del polipéptido maduro fusionado a la señal en el caso de un huésped bacteriano o, por ejemplo, la secuencia señal puede ser una etiqueta de hemaglutinina (HA) cuando se usa un huésped mamífero, por ejemplo, células COS-7. La etiqueta de HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson, I., *et al.*, *Cell*, 37:767 (1984)).

60 Además, la presente invención se refiere a polinucleótidos que hibridan con las secuencias anteriormente descritas si hay al menos 50% y preferentemente 70% de identidad entre las secuencias. La presente invención particularmente se refiere a polinucleótidos que hibridan bajo condiciones estrictas con los polinucleótidos anteriormente descritos. Tal como se usa en la presente invención, el término "condiciones estrictas" quiere decir que la hibridación ocurrirá únicamente si hay al menos 95% y preferentemente al menos 97% de identidad entre las secuencias. Los polinucleótidos que hibridan con los polinucleótidos anteriormente descritos en una realización preferida codifican polipéptidos que retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por el ADNc de la Figura 1 o el ADNc depositado.

ES 2 281 898 T3

El(los) depósito(s) referido(s) en la presente memoria se mantendrá(n) bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con el propósito del Procedimiento de Patente. Estos depósitos se proporcionan simplemente por comodidad para los expertos en la técnica y no son una admisión de que se requiera un depósito bajo 35 U.S.C. §112. La secuencia de los polinucleótidos contenidos en los materiales depositados, así como la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos codificados así, se incorporan en la presente memoria como referencia y son determinantes en el acontecimiento de cualquier conflicto con cualquier descripción de secuencias de la presente memoria. Se puede requerir una licencia para producir, usar o vender los materiales depositados y ninguna de tales licencias es concedida por la presente invención.

Además, la presente invención se refiere a un polipéptido de TIMP-4 humano que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de la Figura 1 o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc depositado, así como fragmentos, análogos y derivados de tal polipéptido.

Los términos “fragmento”, “derivado” y “análogo” cuando se refiere al polipéptido de la Figura 1 o al codificado por el ADNc depositado, quiere decir un polipéptido que retiene esencialmente la misma función o actividad biológica que dicho polipéptido. Por tanto, un análogo incluye una proproteína que se puede activar mediante escisión de la porción de proproteína para producir un polipéptido maduro activo.

El polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético, preferentemente un polipéptido recombinante.

El fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la Figura 1 o el codificado por el ADNc depositado puede ser (i) uno en el cual uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácidos conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácidos conservado) y tal residuo de aminoácidos sustituido puede o no puede ser uno codificado por el código genético, o (ii) uno en el cual uno o más de los residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente, o (iii) uno en el cual el polipéptido maduro se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el cual los aminoácidos adicionales se fusionan al polipéptido maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Tales fragmentos, derivados y análogos se consideran que están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención preferentemente se proporcionan en una forma aislada y preferentemente se purifican hasta la homogeneidad.

El término “aislado” quiere decir que el material se extrae de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si se da de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que se da de forma natural presente en un animal vivo no se aísla, sino que se aísla el mismo polinucleótido o polipéptido separado de alguno o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, e incluso aislarse en el sentido de que tal vector o composición no sean parte de su ambiente natural.

La presente invención también se refiere a vectores que incluyen polinucleótidos de la presente invención, células huésped que se modifican por ingeniería genética con vectores de la invención y la producción de los polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes.

Las células huésped se modifican por ingeniería genética (transducidas o transformadas o transfectadas) con los vectores de esta invención los cuales pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula vírica, un fago, etc. Las células huésped modificadas por ingeniería genética se pueden cultivar en medios nutritivos convencionales tan apropiados para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes de TIMP-4 humano. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares son las previamente usadas con la célula huésped seleccionada para la expresión y estarán claras para aquellos con un conocimiento normal en la técnica.

Los polinucleótidos de la presente invención se pueden emplear para producir polipéptidos mediante técnicas recombinantes. Por tanto, por ejemplo, el polinucleótido se puede incluir en uno cualquiera de una diversidad de vectores de expresión para expresar un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo, derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN vírico tal como de *Vaccinia*, adenovirus, virus tipo fox de ave de corral, y de la seudorrabia. Sin embargo, se puede usar cualquier otro vector siempre que sea replicable y viable en el huésped.

La secuencia apropiada de ADN se puede insertar en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un(os) sitio(s) de la endonucleasa de restricción apropiado(s) mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se considera que tales procedimientos y otros están dentro del alcance de los expertos en la técnica.

ES 2 281 898 T3

La secuencia de ADN en el vector de expresión se une operativamente a una(s) secuencia(s) de control de expresión apropiada(s) (promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar: el promotor de LTR o SV40, lac o trp de *E. coli*, el promotor P_L del fago lambda y otros promotores conocidos para controlar la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para la expresión de amplificación.

Además, los vectores de expresión preferentemente contienen uno o más genes señales seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tal como la resistencia a neomicina o dihidrofolato reductasa para el cultivo de célula eucariota, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

Se puede emplear el vector que contiene la secuencia de ADN apropiada tal como la anteriormente descrita, así como una secuencia control o promotor apropiada, para transformar un huésped apropiado para permitir al huésped expresar la proteína.

Como ejemplos representativos de huésped apropiados, se pueden mencionar: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tal como levadura; células de insecto tales como S2 y Sf9 de *Drosophila*; células animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; células vegetales, etc. Se considera que la selección de un huésped apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Más particularmente, la presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias tan ampliamente descritas anteriormente. Las construcciones comprenden un vector, tal como un plásmido o vector vírico, en el cual se ha insertado una secuencia de la invención, en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende además secuencias reguladoras, incluyendo, por ejemplo, un promotor, operablemente unido a la secuencia. Gran número de los vectores y promotores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica y están comercialmente disponibles. Se proporcionan los siguientes vectores a modo de ejemplo. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pbs, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, se puede usar cualquier otro plásmido o vector siempre que sean replicables y viables en el huésped.

Las regiones promotores se pueden seleccionar a partir de cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con señales seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos particulares nombrados incluyen: lacI, lacZ, T3, T7, gpt, P_R de lambda, P_L y trp. Los promotores eucariotas incluyen: inmediato temprano de CMV, timidin quinasa de HSV, temprano y tardío de SV40, LTRs de retrovirus y metalotioneina-I de ratón. La selección del vector y promotor apropiado también está dentro del nivel de aquellos con un conocimiento normal en la técnica.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a células huésped que contienen las construcciones anteriormente descritas. La célula huésped puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción dentro de la célula huésped se puede efectuar mediante transfección por fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación. (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)).

Las construcciones en las células huésped se pueden usar de una manera convencional para producir el producto genético codificado por la secuencia recombinante. Si no, los polipéptidos de la invención se pueden producir sintéticamente mediante sintetizadores de péptido convencionales.

Las proteínas maduras se pueden expresar en células de mamífero, levadura, bacterias u otras células bajo el control de promotores apropiados. También se pueden emplear los sistemas de traducción libre de célula para producir tales proteínas usando derivados de ARNs de las construcciones de ADN de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión apropiados para usar con los huéspedes procariotas y eucariotas están descritos por Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), cuya descripción se incorpora en la presente memoria como referencia.

La transcripción del ADN codificador de los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores se incrementa insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan con cis, normalmente aproximadamente entre 10 y 300 pb que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 sobre el último lado del origen de replicación de 100 a 270 pb, un potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma sobre el último lado del origen de replicación y potenciadores de adenovirus.

Generalmente, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y señales seleccionables que permitan la transformación de la célula huésped, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción

de una secuencia estructural en dirección 3'. Tales promotores pueden estar derivados de operones codificadores de enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK, del Inglés "Phosphoglycerate Kinase"), factor α , fosfatasa ácida o proteínas de golpe de calor, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con las secuencias de inicio y terminación de traducción, y preferentemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida en el espacio periplásmico o en el medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión incluyendo un péptido de identificación N-terminal que imparte las características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales adecuadas de inicio y terminación de la traducción en la fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más señales seleccionables fenotípicas y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y para, si se desea, proporcionar la amplificación dentro del huésped. Huésped procariontes adecuados para la transformación incluyen: *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro del género *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aunque otros también se pueden emplear como materia de elección.

Como ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano pueden comprender una señal seleccionable y un origen bacteriano de replicación derivado de plásmidos comercialmente disponibles comprendiendo elementos genéticos del muy conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Estas secciones de "cadena principal" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural a expresar.

Después de la transformación de una cepa huésped adecuada y el desarrollo de la cepa huésped hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado es instalado por medios apropiados (por ejemplo, cambio de temperatura o instalación química) y las células se cultivan durante un periodo adicional.

Generalmente se recogen las células mediante centrifugación, se alteran por medios físicos o químicos y el extracto en bruto resultante se retiene para una purificación adicional.

Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas se pueden alterar mediante cualquier método convencional, incluyendo el ciclo de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica o el uso de agentes de lisis celular, tales métodos son muy conocidos por los expertos en la técnica.

También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Ejemplos de sistemas de expresión de mamífero incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritos por Gluzman, *Cell*, 23:175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero comprenderán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuado y también cualquier sitio de unión a ribosoma necesario, sitio de poliadenilación, sitios donador y aceptor de empalme, secuencias de terminación transcripcional y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. Las secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y poliadenilación de SV40 se pueden usar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Los polipéptidos de TIMP-4 humano se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos que incluyen: precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio iónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxipatita y cromatografía en lectina. Se pueden usar las etapas de repliegamiento proteico, si es necesario, en la configuración final de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del Inglés "High Performance Liquid Chromatography") para las etapas de purificación final.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser un producto purificado de manera natural, o un producto de procedimientos sintéticos químicos o producido mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped procarionte o eucariota (por ejemplo, por células bacterianas, de levadura, vegetales superiores, de insecto y de mamífero en cultivo). Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden ser glicosilados o pueden ser no glicosilados. Los polipéptidos de la invención también pueden incluir un residuo de aminoácido de metionina inicial.

La presente invención también está dirigida, en parte, a TIMP-4 humano que tiene, como característica definida, la capacidad de inhibir la acción de las MMPs. El polipéptido de TIMP-4 humano se puede emplear como inhibidor de la metaloproteína para prevenir la invasión tumoral y la angiogénesis y la posterior metástasis. El polipéptido de TIMP-4 humano también se puede emplear para tratar enfermedades artríticas, tales como artritis reumatoide y osteoartritis, reumatismo de tejido suave, policondritis y tendinitis; y enfermedades de resorción de hueso, tales como osteoporosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo y colesteatoma. El TIMP-4 humano también se puede emplear para prevenir la destrucción aumentada de colágeno que se da conjuntamente con la diabetes, las clases recesivas de epidermolisis bulosa distrófica, enfermedad periodontal y consecuencias relacionadas de la producción gingival de colagenasa. El TIMP-4 humano también se puede emplear para inhibir la liberación de colagenasa de PMNL después

ES 2 281 898 T3

de la infiltración celular a la encía inflamada, incluyendo combatir la gran susceptibilidad de los enfermos de diabetes a la enfermedad periodontal.

5 El TIMP-4 humano también se puede emplear para tratar la ulceración corneal, por ejemplo, la inducida por álcali u otras quemaduras, por radiación, por Vitamina E o deficiencia retinoide; ulceración de la piel y el tracto gastrointestinal y curación anormal de heridas y enfermedades de post operatorio incluyendo la anastomosis de colon, en las cuales se incrementa los niveles de colagenasa.

10 El tumor mediado por MMPs se desarrolló *in situ*. Por consiguiente, el TIMP-4 humano se puede usar para bloquear la destrucción de las membranas basales celulares, mecanismo por el cual las células cancerosas sufren metástasis. Las MMPs han estado implicadas en la neovascularización requerida para soportar el desarrollo tumoral y sobrevivir, en la remodelación de tejido requerida para acomodar el desarrollo de los tumores primarios y secundarios y en la penetración de las células tumorales a través de las membranas basales de las paredes vasculares durante la metástasis.

15 Las MMPs son responsables de la degradación localizada de la pared folicular durante la ovulación y la degradación localizada de la pared uterina para la implantación de blastocitos. Por consiguiente, el TIMP-4 humano se puede emplear como anticonceptivo.

20 El TIMP-4 humano también se puede emplear como factor de crecimiento general para tratar la restenosis y enfermedades similares. El TIMP-4 humano se puede emplear particularmente como factor de crecimiento para líneas celulares eritroides.

25 Otras enfermedades en las que se puede usar el TIMP-4 humano para tratarlas incluyen: alveolitis, asma, soriasis, glomeruloesclerosis y choque séptico puesto que las MMPs están implicadas en la invasividad tisular de algunos parásitos.

30 Se pueden usar fragmentos del gen completo de TIMP-4 humano como sonda de hibridación para una genoteca de ADNc para aislar el gen completo y aislar otros genes que tengan una alta similitud de secuencia con el gen o similar actividad biológica. Las sondas de este tipo pueden ser, por ejemplo, entre 20 y 2.000 pares de bases. Sin embargo, preferentemente, las sondas tienen entre 30 y 50 pares de bases. La sonda también se puede usar para identificar un clon de ADNc correspondiente a un transcrito completo y a un clon genómico o clones que contengan el gen de TIMP-4 humano completo incluyendo las regiones reguladoras y promotor, exones e intrones. Un ejemplo de un cribado comprende el aislamiento de la región codificadora del gen TIMP-4 humano usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda de oligonucleótido. Los oligonucleótidos marcados que tienen una secuencia complementaria a la del gen de la presente invención se usan para cribar una genoteca de ADNc, ADN o ARNm genómico humano para determinar qué miembros de la genoteca híbrida con la sonda.

40 Esta invención también se refiere al uso del gen de TIMP-4 humano como parte de un ensayo de diagnóstico para detectar enfermedades o susceptibilidad a enfermedades relacionadas con la presencia de TIMP-4 humano mutado.

45 Los individuos que portan mutaciones en el gen de TIMP-4 humano se pueden detectar al nivel de ADN mediante una diversidad de técnicas. Se pueden obtener los ácidos nucleicos para diagnóstico a partir de células de un enfermo, tal como a partir de sangre, orina, saliva, biopsia de tejido y material de autopsia. El ADN genómico se puede usar directamente para la detección o se puede amplificar enzimáticamente usando PCR (Saiki *et al.*, *Nature*, 324:163-166 (1986)) antes del análisis. Con el mismo propósito también se puede usar ARN o ADNc. Como ejemplo, los cebadores de PCR complementarios al ácido nucleico que codifica el TIMP-4 humano se pueden usar para identificar y analizar las mutaciones de TIMP-4 humano. Por ejemplo, se pueden detectar deleciones e inserciones mediante un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales se pueden identificar mediante la hibridación del ADN amplificado con ARN de TIMP-4 humano radiomarcado o si no, las secuencias de ADN antisentido de TIMP-4 humano radiomarcadas. Las secuencias perfectamente emparejadas se pueden distinguir de los híbridos mal emparejados mediante la digestión por ARNasa A o por diferencias en las temperaturas de fusión.

55 Los ensayos genéticos basados en las diferencias de secuencia de ADN se pueden conseguir por la detección de la alteración en la movilidad electroforética de fragmentos de ADN en geles con o sin agentes de desnaturalización. Se pueden visualizar pequeñas deleciones e inserciones de secuencia mediante la electroforesis en gel de alta resolución. Se pueden distinguir los fragmentos de ADN de diferentes secuencias sobre geles con gradiente de formamida con desnaturalización en los cuales las movilidades de los diferentes fragmentos de ADN se retardan en el gel en diferentes posiciones de acuerdo con sus temperaturas de fusión específica o de fusión parcial (véase, por ejemplo, Myers *et al.*, *Science*, 230:1.242 (1985)).

65 También se pueden revelar los cambios de secuencia en localizaciones específicas mediante ensayos de protección de nucleasa, tal como protección con ARNasa y S1 o el método de escisión química (por ejemplo, Cotton *et al.*, *PNAS*, USA, 85:4.397-4.401 (1985)).

Por tanto, se puede conseguir la detección de una secuencia de ADN específica mediante métodos tales como la hibridación, protección de ARNasa, escisión química, secuenciación directa de ADN o el uso de enzimas de restric-

ción, (por ejemplo, Polimorfismos de la longitud del fragmento de restricción (RFLP, del Inglés “Restriction Fragment Length Polymorphisms”)) y la transferencia tipo “Southern” del ADN genómico.

Además de la electroforesis en gel más convencional y la secuenciación de ADN, las mutaciones también se pueden detectar por análisis *in situ*.

La presente invención también se refiere a un ensayo de diagnóstico para detectar los niveles alterados de la proteína TIMP-4 humana en diversos tejidos ya que una sobreexpresión de las proteínas en comparación con muestras de tejido control normales puede detectar la presencia de una enfermedad o susceptibilidad a una enfermedad regulada por TIMP-4 humano. Los ensayos usados para detectar niveles de proteína TIMP-4 humana en una muestra derivada de un huésped son muy conocidos por los expertos en la técnica e incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia tipo “Western”, ensayos tipo ELISA y ensayos tipo “sándwich”. Un ensayo tipo ELISA (Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 1(2), Capítulo 6, (1991)) inicialmente comprende la preparación de un anticuerpo específico al antígeno de TIMP-4 humano, preferentemente un anticuerpo monoclonal. Además se prepara un anticuerpo informativo frente al anticuerpo monoclonal. Para que el anticuerpo informativo se una a un reactivo detectable tal como radioactividad, fluorescencia o, en este ejemplo, una enzima peroxidasa de rábano. Se extrae una muestra de un huésped y se incuba en un soporte sólido, por ejemplo, un plato de poliestireno, que une las proteínas en la muestra. A continuación, se recupera cualquier sitio de unión a proteína libre sobre el plato incubando con una proteína no específica como BSA. A continuación, se incuba el anticuerpo monoclonal en el plato un tiempo durante el cual los anticuerpos monoclonales se unen a cualquier proteína TIMP-4 humana unida al plato de poliestireno. Todo anticuerpo monoclonal no unido se lava con tampón. Ahora, el anticuerpo informativo unido a la peroxidasa de rábano se coloca en el plato dando como resultado la unión o el anticuerpo informativo a cualquier anticuerpo monoclonal unido a TIMP-4 humano. A continuación, se lava el anticuerpo informativo no unido. A continuación, se añade los sustratos de peroxidasa al plato y la cantidad de color desarrollado en un periodo de tiempo dado es una medida de la cantidad de proteína TIMP-4 humana presente en un volumen dado de muestra de enfermo si se compara frente a una curva patrón.

Se puede emplear un ensayo de competición en el que los anticuerpos específicos a TIMP-4 humano se unen a un soporte sólido y a TIMP-4 humano marcado y se pasa una muestra derivada del huésped al soporte sólido y la cantidad de marca detectada, por ejemplo, mediante cromatografía de centelleo líquida, se puede correlacionar con una cantidad de TIMP-4 humano en la muestra.

Un ensayo tipo “sándwich” es similar a un ensayo tipo ELISA. En un ensayo tipo “sándwich” el TIMP-4 humano se pasa a un soporte sólido y se une a anticuerpo unido a un soporte sólido. A continuación, un segundo anticuerpo se une al TIMP-4 humano. A continuación, se pasa un tercer anticuerpo que está marcado y es específico al segundo anticuerpo al soporte sólido y se une al segundo anticuerpo y, a continuación, se puede cuantificar una cantidad.

Esta invención también proporciona un método de cribado (“screening”) de compuestos para identificar aquellos que son agonistas o antagonistas al polipéptido de TIMP-4 humano. Un ejemplo de tal método comprende obtener tejido de mamífero que comprende una matriz extracelular, por ejemplo, articulaciones radiocarpales bovinas. Se divide el cartílago articular en discos más pequeños y se marcan con sulfato de sodio ³⁵S (10 micro Ci/ml) en DMEM durante un tiempo suficiente para que el cartílago incorpore el sulfato de sodio marcado. A continuación, se añade una MMP, por ejemplo, estromelina o IL1 o TNF a los discos de cartílago bajo condiciones apropiadas de modo que se dará normalmente la descomposición del tejido. A continuación, se añade el TIMP-4 humano y los compuestos a cribar a la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para que la MMP descomponga normalmente los discos de cartílago. A continuación, se recoge el sobrenadante, el cual es el medio fuera de los discos de cartílago y se cuenta la radioactividad mediante un contador de centelleo líquido. A continuación, se calcula el porcentaje de ³⁵S liberado en los medios. Esta liberación de ³⁵S-GAG es representativa del conjunto de proteoglicano en la matriz extracelular del cartílago y refleja la degradación del proteoglicano mediante la MMP. A continuación, se compara la cantidad de ³⁵S-GAG, determinada por cromatografía de centelleo líquida, con un ensayo control realizado en ausencia del compuesto a cribar y, a continuación, se determina la capacidad del compuesto para actuar como agonista o antagonista de la acción del TIMP-4 humano.

Ejemplos de antagonistas potenciales de TIMP-4 humano, además de los anteriormente identificados, incluyen un anticuerpo, o en algunos casos, un oligonucleótido, el cual se une al polipéptido. Si no, un antagonista potencial puede ser una forma mutada del TIMP-4 humano que reconoce los sustratos naturales pero es inactiva y, de ese modo, previene la acción del TIMP-4 humano.

Los antagonistas potenciales del TIMP-4 humano también incluyen construcciones antisentido preparadas usando tecnología antisentido. La tecnología antisentido se puede usar para controlar la expresión del gen a través de la formación de triple hélice o ARN o ADN antisentido, ambos métodos se basan en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la porción codificadora 5’ de la secuencia de polinucleótido, la cual codifica los polipéptidos maduros de la presente invención, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de entre aproximadamente 10 y 40 pares de bases en longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para ser complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 6:3.073 (1979); Cooney *et al.*, *Science*, 241:456 (1988); y Dervan *et al.*, *Science*, 251:1.360 (1991)), previniendo así la transcripción y la producción del TIMP-4 humano. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el TIMP-4 humano (antisentido - Okano, *J. Neurochem.*, 56:560 (1991); *Oligodeoxy-*

ES 2 281 898 T3

nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Ratón, FL (1988)). Los oligonucleótidos anteriormente descritos también se pueden repartir a células de modo que se pueda expresar el ARN o ADN antisentido *in vivo* para inhibir la producción de TIMP-4 humano.

5 Otro antagonista potencial de TIMP-4 humano es una pequeña molécula que se une a y ocupa el sitio activo del TIMP-4 humano previniendo así que el TIMP-4 humano interactúe con las MMPs de modo que se previene la actividad biológica normal. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas como péptido, por ejemplo, una molécula unida a péptido.

10 Los antagonistas de TIMP-4 humano se pueden emplear para reparar tejido y remodelar, por ejemplo, cuando se desea la destrucción del tejido cicatriz. En algunas situaciones, se puede desear la renovación o remodelación aumentada del tejido conectivo, por ejemplo, en la resorción del tejido cicatriz; en la involución uterina post parto; en la remodelación de depósitos fibróticos en el pulmón, hígado o articulaciones. Para controlar apropiadamente la renovación de las proteínas de la matriz extracelular en estas situaciones se requerirá un equilibrio entre las MMPs y el TIMP-4 humano para controlar apropiadamente la degradación.

15 Se pueden emplear los polipéptidos y las agonistas o antagonistas que son también polipéptidos de acuerdo con la presente invención mediante la expresión de tales polipéptidos *in vivo*, lo cual con frecuencia se denomina "terapia genética".

20 Por tanto, por ejemplo, las células de un enfermo se pueden modificar por ingeniería genética con un polinucleótido (ADN o ARN) *ex vivo*, con las células modificadas por ingeniería genética a continuación se proporcionan a un enfermo a tratar con el polipéptido. Tales métodos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden modificar por ingeniería genética mediante procedimientos conocidos en la técnica mediante el uso de una partícula retrovírica que contiene ARN codificador de un polipéptido de la presente invención.

25 Igualmente, las células se pueden modificar por ingeniería genética *in vivo* para la expresión de un polipéptido *in vivo* mediante, por ejemplo, procedimientos conocidos en la técnica. Tal como se conoce en la técnica, se puede administrar a un enfermo una célula productora para la producción de una partícula retrovírica que contiene ARN codificador del polipéptido de la presente invención para modificar por ingeniería genética células *in vivo* y para la expresión del polipéptido *in vivo*. Estos y otros métodos para la administración de un polipéptido de la presente invención mediante tal método deberían estar claros para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente invención. Por ejemplo, el vehiculizante de expresión para la modificación por ingeniería genética de células puede ser a parte de un retrovirus, por ejemplo, un adenovirus que se puede usar para modificar por ingeniería genética las células *in vivo* después de la combinación con un vehiculizante de reparto adecuado.

30 Los polipéptidos y agonistas o antagonistas de la presente invención se pueden emplear en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo incluye, pero no se limita a: disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debería adecuarse al modo de administración.

35 La invención también proporciona una paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociados a tal(es) recipiente(s) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la producción, el uso y la venta de los compuestos farmacéuticos o productos biológicos, dicho aviso refleja la aprobación por la agencia de la producción, uso o venta para la administración humana. Además, las composiciones farmacéuticas se pueden emplear junto con otros compuestos terapéuticos.

40 Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de una manera conveniente tal como por vías tópicas, intravenosas, intraarticulares, intratumorales, intraperitoneales, intramusculares, subcutáneas, intranasales o intradérmicas. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad que es eficaz para tratar y/o la profilaxis de la indicación específica. En general, las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad de al menos aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal y en la mayoría de los casos se administrarán en una cantidad no en exceso de aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal por día y preferentemente la dosificación es entre aproximadamente 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal diariamente, teniendo en cuenta las vías de administración, los síntomas, etc.

45 Las secuencias de la presente invención también son valiosas para la identificación cromosómica. La secuencia se guía específicamente y puede hibridar con una localización particular en un cromosoma humano individual. Sin embargo, hay una necesidad actual de identificar los sitios particulares en el cromosoma. Pocos reactivos de señalización cromosómica basados en los datos de secuencias actuales (polimorfismo de repetición) están actualmente disponibles para señalar la localización cromosómica. El mapeo de ADN en cromosomas de acuerdo con la presente invención es una primera etapa importante en correlación con aquellas secuencias con genes asociados con la enfermedad.

50 Brevemente, se puede hacer el mapeo de las secuencias en cromosomas preparando cebadores de PCR (preferentemente 15-25 pb) a partir del ADNc. El análisis informático de la región no traducida 3' se usa para seleccionar rápidamente los cebadores que no abarcan más de un exón en el ADN genómico para evitar complicar el proceso

de amplificación. A continuación, se usan estos cebadores para la selección por PCR de híbridos celulares somáticos que contienen cromosomas humanos individuales. Únicamente aquellos híbridos que contienen el gen humano correspondiente al cebador producirán un fragmento amplificado.

5 El mapeo por PCR de los híbridos celulares somáticos es un procedimiento rápido para asignar un ADN particular a un cromosoma particular. Usando la presente invención con los mismos cebadores de oligonucleótido, se puede conseguir la sublocalización con paneles de fragmentos de cromosomas específicos o conjuntos de grandes clones genómicos de una manera análoga. Otras estrategias de mapeo que se pueden usar igualmente para hacer el mapeo en su cromosoma incluyen la hibridación *in situ*, el precibado con cromosomas ordenados por flujo marcados y la
10 preselección por hibridación con genotecas de ADNc específico de cromosoma de construcción.

La hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, del Inglés “Fluorescence *In Situ* Hybridization”) de clones de ADNc con una proliferación cromosómica de metafase se puede usar para proporcionar una localización cromosómica precisa en una etapa. Esta técnica se puede usar con ADNc tan corto como 500 ó 600 bases; sin embargo, los clones mayores
15 de 2.000 pb tienen una mayor similitud de unión a una localización cromosómica única con suficiente intensidad de señal para la detección simple. La FISH requiere el uso de los clones a partir de los cuales se derivó EST (del Inglés “Expressed Sequence Tag”), y cuanto mayor mejor. Por ejemplo, 2.000 pb es bueno, 4.000 es mejor y más de 4.000 probablemente no es necesario para conseguir buenos resultados en un porcentaje razonable del tiempo. Para una revisión de esta técnica, véase Verma *et al.*, *Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques*, Pergamon Press,
20 Nueva York (1988).

Una vez que se ha mapeado una secuencia en una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma puede estar correlacionado con los datos del mapa genético. Tales datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man* (disponible en línea de la “Johns Hopkins University Welch
25 Medical Library”). A continuación se identifica la relación entre los genes y las enfermedades que se han mapeado en la misma región cromosómica a través de análisis de unión. (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes).

A continuación, es necesario determinar las diferencias en el ADNc o la secuencia genómica entre los individuos afectados y no afectados. Si se observa una mutación en algunos o en todos de los individuos afectados pero no en ninguno de los individuos normales, entonces la mutación parece ser el agente causativo de la enfermedad.
30

Con la resolución actual de las técnicas de mapeo físico y mapeo genético, un ADNc precisamente localizado en una región cromosómica asociada con la enfermedad podría ser uno de entre 50 y 500 genes causativos potenciales. (Esto asume la resolución de mapeo de 1 megabase y un gen por 20 kb).
35

Se pueden usar los polipéptidos, sus fragmentos u otros derivados, o análogos de los mismos, o células que los expresan como inmunogen para producir anticuerpos para los mismos. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. La presente invención también incluye anticuerpos quiméricos, de cadena sencilla y humanizados, así como fragmentos Fab, o el producto de una genoteca de expresión de Fab. Se pueden usar
40 diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de tales anticuerpos y fragmentos.

Los anticuerpos generados frente a los polipéptidos correspondientes a una secuencia de la presente invención se pueden obtener mediante inyección directa de los polipéptidos en un animal o mediante la administración de los polipéptidos a un animal, preferentemente no humano. A continuación, el anticuerpo así obtenido se unirá a los propios
45 polipéptidos. De esta manera, se puede usar incluso una secuencia que codifica únicamente un fragmento de los polipéptidos para generar anticuerpos que se unen a los polipéptidos nativos completos. A continuación, tales anticuerpos se pueden usar para aislar el polipéptido del tejido que expresa ese polipéptido.

Para la preparación de los anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de línea celular continuos. Los ejemplos incluyen: la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, *et al.*, 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).
50

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (documento de Patente U.S. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla para los productos polipeptídicos inmunogénicos de esta invención. Además, se pueden usar ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados para los productos polipeptídicos inmunogénicos de esta invención.
55

La presente invención se describirá más en referencia a los siguientes Ejemplos; sin embargo, se entiende que la presente invención no se limita a tales Ejemplos. Todas las partes o cantidades, al menos que se especifique lo contrario, están en peso.
60

Para facilitar el entendimiento de los siguientes Ejemplos se describirán ciertos métodos y/o términos que se dan con frecuencia.
65

Los “plásmidos” se designan por una p minúscula precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos iniciales de la presente memoria o bien están comercialmente disponibles, disponibles públicamente sobre

ES 2 281 898 T3

unas bases no restringidas o se pueden construir a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con los procedimientos publicados. Además, los plásmidos equivalentes a los descritos son conocidos en la técnica y serán claros para aquellos con un conocimiento normal en la técnica.

5 “Digestión” de ADN se refiere a la escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa únicamente en ciertas secuencias en el ADN. La diversas enzimas de restricción usadas en la presente memoria están comercialmente disponibles y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requerimientos se usaron puesto que serían conocidas para aquellos con un conocimiento normal en la técnica. Con propósitos analíticos, generalmente se usa 1 μg de plásmido o fragmento de ADN con aproximadamente 2 unidades de enzima en aproximadamente 20 μl de disolución tampón. Con el propósito de aislar fragmentos de ADN para la construcción de plásmido, generalmente se digieren entre 5 y 50 μg de ADN con entre 20 y 250 unidades de enzima en un volumen mayor. Los tampones apropiados y las cantidades de sustrato para enzimas de restricción particulares están especificadas por el fabricante. Normalmente se usan tiempos de incubación de aproximadamente 1 hora a 37°C, pero pueden variar de acuerdo con las instrucciones del distribuidor. Después de la digestión la reacción se somete a electroforesis directamente sobre un gel de poliacrilamida para aislar el fragmento deseado.

La separación por tamaño de los fragmentos escindidos se realiza usando gel de poliacrilamida al 8 por ciento descrito por Goeddel, D. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 8:4.057 (1980).

20 “Oligonucleótidos” se refiere a o bien un polideoxinucleótido de cadena sencilla o a dos cadenas de polideoxinucleótido complementarias que se pueden sintetizar químicamente. Tales oligonucleótidos sintéticos no tienen fosfato 5' y, por tanto, no se ligará a otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético se ligará a un fragmento que no se haya desfosforilado.

25 “Ligación” se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácido nucleico de doble cadena (Maniatis, T., *et al.*, *Id.*, p. 146). Al menos que se proporcione lo contrario, la ligación se puede llevar a cabo usando tampones y condiciones conocidos con 10 unidades de ADN ligasa de T4 (“ligasa”) por 0,5 μg de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de ADN a ligar.

30 Al menos que se indique lo contrario, la transformación se realizó tal como se describe en el método de Graham, F. y Van der Eb, A., *Virology*, 52:456-457 (1973).

Ejemplo 1

35 *Expresión bacteriana y purificación de TIMP-4 humano*

La secuencia de ADN codificadora de TIMP-4 humano, ATCC N° 75946, inicialmente se amplifica usando cebadores de oligonucleótido de PCR correspondientes al 5' y las secuencias de la proteína TIMP-4 humana procesada (menos la secuencia peptídica señal) y las secuencias 3' vector para el gen TIMP-4. Se añadieron nucleótidos adicionales correspondientes al TIMP-4 humano a las secuencias 5' y 3' respectivamente. El cebador de oligonucleótido 5' tiene la secuencia 5' GCCAGAGGATCCTGCAGCTGCGCCCCGGCGCAC 3' que contiene un sitio de enzima de restricción BamH1 seguido de 21 nucleótidos de la secuencia codificadora de TIMP-4 humano comenzando desde el supuesto aminoácido terminal del codón de la proteína procesada. La secuencia 3' 5' CGGCTTCTAGAACTAGGGCTGAAC GATGTCAAC 3' contiene un sitio XbaI y está seguido por 18 nucleótidos del TIMP-4 humano. Los sitios de enzima de restricción corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión bacteriano pQE-9 (Qiagen, Inc. 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311). pQE-9 codifica la resistencia antibiótica (Amp^r), un origen de replicación bacteriano (ori), un operador promotor regulable por IPTG (P/O), un sitio de unión a ribosoma (RBS, del Inglés “Ribosome Binding Site”), una etiqueta de 6-His y sitios de enzima de restricción. A continuación, se digirió el pQE-9 con BamH1 y XbaI. Las secuencias amplificadas se ligaron en pQE-9 y se insertaron en el marco con la secuencia codificadora para la etiqueta de histidina y la RBS. A continuación, se usó la mezcla de ligación para transformar la cepa de *E. coli* m15/pREP4 disponible de Qiagen por el procedimiento descrito en Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989). m15/pREP4 contiene copias múltiples del plásmido pREP4, el cual expresa el represor lacI, el aclarado del P/O que conduce a la expresión genética incrementada. Los transformantes se identifican por su capacidad de desarrollarse en placas con LB y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. Se aisló el ADN plásmido y se confirmó mediante análisis de restricción. Los clones que contenían las construcciones deseadas se desarrollaron durante toda la noche (O/N) en cultivo líquido en medios LB complementados tanto con Amp (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como con Kan (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$). El cultivo (O/N) se usa para inocular un gran cultivo en una relación entre 1:100 y 1:250. Las células se desarrollaron a una densidad óptica 600 (O.D.⁶⁰⁰) de entre 0,4 y 0,6. A continuación, se añadió IPTG (“Isopropil-B-D-tiogalacto piranosida”) hasta una concentración final de 1 mM. IPTG induce al inactivar el represor lacI, el aclarado del P/O que conduce a la expresión genética incrementada. Las células se desarrollaron unas 3 a 4 horas extras. A continuación, se recogieron las células mediante centrifugación. Se solubilizó el precipitado celular en el agente caotrópico guanidina HCl 6 molar. Después de la aclaración, se purificó el TIMP-4 humano solubilizado a partir de esta disolución mediante cromatografía en una columna de Níquel-Quelato bajo condiciones que permitían la unión ajustada por proteínas que contienen la etiqueta de 6-His (Hochuli, E. *et al.*, *J. Chromatography*, 411:177-184 (1984). Se eluyó el TIMP-4 humano (puro al 90%) de la columna en guanidina HCl 6 molar pH 5,0 y con el propósito de la renaturalización se ajustó a guanidina HCl 3 molar, fosfato de sodio 100 mM, glutatona 10 mmolar (reducida) y glutatona 2 mmolar (oxidada). Después de la incubación en esta disolución durante 12 horas la proteína se sometió a diálisis con fosfato de sodio 10 mmolar.

ES 2 281 898 T3

Ejemplo 2

Expresión de TIMP-4 humano recombinante en células COS

5 La expresión de TIMP-4 HA humano está derivada de un vector pcDNAI/Amp (Invitrogen) que contiene: 1) origen de replicación de SV40, 2) gen de resistencia a ampicilina, 3) origen de replicación de *E. coli*, 4) promotor de CMV seguido por una región “polylinker”, un intrón de SV40 y un sitio de poliadenilación. Un fragmento de ADN codificador del precursor entero de TIMP-4 humano y una etiqueta de HA fusionadas en el marco a su extremo 3’ se clonó en la región “polylinker” del vector, por lo tanto, la expresión proteica recombinante está dirigida por el
10 promotor de CMV. La etiqueta de HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe tal como se ha descrito previamente (I. Wilson, H. Niman, R. Heighten, A. Cherenson, M. Connolly y R. Lerner, 1984, *Cell* 37:767). La fusión de etiqueta de HA a la proteína diana permite la fácil detección de la proteína recombinante con un anticuerpo que reconoce el epítipo HA.

15 La estrategia de construcción de plásmido se describe a continuación:

Se construyó la secuencia de ADN ATCC N° 75946, que codifica el TIMP-4 humano, mediante PCR usando dos cebadores: el cebador 5’ 5’ GCCAGAGGATCCGCCACCATGCCTGGGAGCCCTCGGCC 3’ contiene un sitio BamHI seguido de 21 nucleótidos de la secuencia codificadora de TIMP-4 humano comenzando desde el codón
20 de iniciación; la secuencia 3’ 5’ CGGTTCTAGAATCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGGTAGGCTGAAC GATG 3’ contiene secuencias complementarias a un sitio XbaI, codón de parada de traducción, etiqueta de HA y los últimos 18 nucleótidos de la secuencia codificadora de TIMP-4 humano (sin incluir el codón de parada). Por lo tanto, el producto de PCR contiene un sitio BamHI, la secuencia codificadora de TIMP-4 humano seguida por etiqueta de HA fusionada en el marco, un codón de parada de la terminación de traducción próximo a la etiqueta de HA y un sitio
25 XbaI. El fragmento de ADN amplificado por PCR y el vector, pcDNAI/Amp, se digirieron con enzimas de restricción BamHI y XbaI y se ligaron. La mezcla de ligación se transformó en la cepa SURE de *E. coli* (disponible por Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037) el cultivo transformado se cultivó sobre placas con medios de ampicilina y se seleccionaron las colonias resistentes. Se aisló el ADN plásmido de los transformantes y se examinó mediante análisis de restricción para la presencia del fragmento correcto. Para la expresión del TIMP-
30 4 humano recombinante, se sometieron a transfección células COS con el vector de expresión mediante el método de DEAE-DEXTRANO (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)). Se detectó la expresión de la proteína TIMP-4 humano HA mediante el método de radiomarcaje e inmunoprecipitación (E. Harlow, D. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). Se marcaron las células durante 8 horas con ³⁵S-cisteína dos días después de la transfección.
35 A continuación, se recogieron los medios de cultivo y las células se sometieron a lisis con detergente (tampón RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, SDS al 0,1%, DOC al 0,5%, Tris 50 mM, pH 7,5)(Wilson, I. *et al.*, Id. 37:767 (1984)). Se precipitaron tanto el lisado celular como los medios de cultivo con un anticuerpo monoclonal específico a HA. Se analizaron las proteínas precipitadas sobre geles de SDS-PAGE.

40 Ejemplo 3

Clonación y expresión de TIMP-4 usando el sistema de expresión de baculovirus

Se amplificó la secuencia de ADN codificadora de la proteína TIMP-4 completa, ATCC N° 75946, usando cebadores de oligonucleótido de PCR correspondientes a las secuencias 5’ y 3’ del gen.
45

El cebador 5’ tiene la secuencia 5’ GCCAGAGGATCCATGCCTGGGAGCCCTCGGCC 3’ y contiene un sitio de enzima de restricción BamHI (en negrita) justo detrás de los primeros 21 nucleótidos del gen de TIMP-4 (el codón de iniciación para la traducción “ATG” está subrayado).
50

El cebador 3’ tiene la secuencia 5’ CGGCTTCTAGAACTAGGGCTGAACGATGTCAAC 3’ y contiene el sitio de escisión para la endonucleasa de restricción XbaI y 18 nucleótidos complementarios a la secuencia no traducida 3’ del gen TIMP-4. Se aislaron las secuencias amplificadas a partir de un gel de agarosa al 1% usando un kit comercialmente disponible (“GeneClean”, BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). A continuación, se digirió el fragmento con las endonucleasas
55 BamHI y XbaI y, a continuación, se purificó de nuevo sobre un gel de agarosa al 1%. Este fragmento se designó F2.

Se usó el vector pA2 (modificación del vector pVL941, tratado más adelante) para la expresión de la proteína TIMP-4 usando el sistema de expresión de baculovirus (para revisión véase: Summers, M.D. y Smith, G.E. 1987, *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin N° 1.555). Este vector de expresión contiene el promotor de polihedrina fuerte del virus de polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV, del Inglés “*Autographa californica* nuclear Polyhedrosis Virus”) seguido de los sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción BamHI y XbaI. El sitio de poliadenilación del virus de simio (SV, del Inglés “Simian Virus”) 40 se usa para la poliadenilación eficiente. Para una fácil selección de los virus recombinantes se inserta el gen beta-galactosidasa de *E. coli* en la misma orientación que el promotor de polihedrina seguido de la señal de poliadenilación del gen de polihedrina. Las secuencias de polihedrina están flanqueadas a ambos lados por secuencias víricas para la recombinación homóloga mediada por célula del ADN vírico de tipo natural sometido a transfección conjunta. Se podrían usar muchos otros vectores de baculovirus en lugar de pRG1 tal como pAc373, pVL941 y pAcIM1 (Luckow, V.A. y Summers, M.D., *Virology*, 170:31-39).
65

ES 2 281 898 T3

Se digirió el plásmido con las enzimas de restricción BamHI y XbaI. A continuación, se aisló el ADN a partir de un gel de agarosa al 1% usando el kit comercialmente disponible ("GeneClean" BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). Este ADN vector se designa V2.

5 El fragmento F2 y el plásmido V2 se ligaron con la ADN ligasa T4. A continuación, las células HB101 de *E. coli* se transformaron y se identificaron las bacterias que contenían el plásmido (pBacTIMP-4) con el gen TIMP-4 usando las enzimas BamHI y XbaI. Se confirmó la secuencia del fragmento clonado mediante secuenciación de ADN.

10 Se sometió a transfección conjunta 5 μg del plásmido pBacTIMP-4 con 1,0 μg de un baculovirus linearizado comercialmente disponible ("ADN de baculovirus BaculoGold™", Pharmingen, San Diego, CA.) usando el método de lipofección (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 84:7.413-7.417 (1987)).

15 Se mezclaron 1 μg de ADN vírico BaculoGold™ y 5 μg del plásmido pBacTIMP-4 en un pocillo estéril de una placa microtiter que contenía 50 μl de medio de Grace libre de suero (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). Más tarde se añadieron 10 μl de Lipofectina más 90 μl de medio de Grace, se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió gota a gota la mezcla de transfección a las células de insecto Sf9 (ATCC CRL 1711) sembradas en una placa de cultivo de tejido de 35 mm con 1 ml de medio de Grace sin suero. La placa se inclinó atrás y adelante para mezclar la disolución recién añadida. A continuación, se incubó la placa durante 5 horas a 27°C. Después de 5 horas se extrajo la disolución de transfección de la placa y se añadió 1 ml de medio de insecto de Grace complementado con suero de ternera fetal al 10%. La placa se volvió a poner en un incubador y se continuó el cultivo a 27°C durante cuatro días.

20 Después de cuatro días se recogió el sobrenadante y se realizó un ensayo en placa similar al descrito por Summers y Smith (*supra*). Como modificación se usó un gel de agarosa con "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg) lo cual permite un fácil aislamiento de las placas teñidas de azul. (También se puede encontrar una descripción detallada de un "ensayo en placa" en la guía del usuario para el cultivo celular de insecto y la baculovirología distribuida por Life Technologies Inc., Gaithersburg, páginas 9-10).

30 Cuatro días después de la dilución en serie, se añadieron los virus a las células y se cogieron con la punta de una pipeta Eppendorf las placas teñidas de azul. A continuación se resuspendió el agar que contenía los virus recombinantes en un tubo Eppendorf que contenía 200 μl de medio de Grace. Se extrajo el agar mediante una breve centrifugación y se usó el sobrenadante que contenía los baculovirus recombinantes para infectar células Sf9 sembradas en platos de 35 mm. Cuatro días después se recogieron los sobrenadantes de estos platos de cultivo y, a continuación, se almacenaron a 4°C.

35 Las células Sf9 se desarrollaron en medio de Grace complementado con FBS inactivado por calor al 10%. Las células se infectaron con el baculovirus recombinante V-TIMP-4 a una multiplicidad de infección (MDI) de 2. Seis horas después se extrajo el medio y se reemplazó con medio SF900 II menos metionina y cisteína (Life Technologies Inc., Gaithersburg). 42 horas después se añadieron 5 μCi de ^{35}S -metionina y 5 μCi de ^{35}S cisteína (Amersham). Las células se incubaron más durante 16 horas antes de que se recogieran mediante centrifugación y se visualizaron las proteínas marcadas mediante SDS-PAGE y autorradiografía.

Ejemplo 4

45 *Patrón de expresión de TIMP-4 humano en tejidos humanos*

50 Se desnaturalizaron 20 μg del ARN total de cada uno de los anteriores tejidos y se corrieron sobre un gel de agarosa con formaldehído al 1,2% y se transfirieron por capilaridad sobre un filtro de nailon durante toda la noche. El ARN se inmovilizó sobre el filtro por entrecruzamiento por UV. Se preparó una sonda cebador al azar a partir del inserto EcoRI-XhoI de la secuencia parcial de ácido nucleico de TIMP-4 y se usó para sondar la transferencia mediante hibridación durante toda la noche en tampón Church con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ADN de esperma de arenque desnaturalizado como agente bloqueador. El lavado se realizó de manera secuencial con 2 x SSC/SDS al 0,1% y 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 65 grados Celsius. Las señales de tamaño fueron ladder de ARN de BRL y bandas de ARN ribosómico 18S y 28S. Figura 3.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 5 (a) polinucleótidos que codifican al menos la forma madura del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida tal como la mostrada en la Figura 1;
- 10 (b) polinucleótidos que tienen la secuencia codificadora tal como la mostrada en la Figura 1 que codifica al menos la forma madura del polipéptido;
- 15 (c) polinucleótidos que codifican el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos la forma madura del polipéptido codificado por el ADNc contenido en ATCC 75946;
- (d) polinucleótidos que tienen la secuencia codificadora del ADNc contenido en ATCC 75946 codificador de al menos la forma madura del polipéptido;
- 20 (e) polinucleótidos que codifican un fragmento de un polipéptido codificado por un polinucleótido de uno cualquiera del punto (a) al (d), en los que el fragmento inhibe la actividad de la metaloproteinasa;
- (f) polinucleótidos cuya cadena complementaria híbrida bajo condiciones estrictas con un polinucleótido tal como el definido en uno cualquiera del punto (a) al (d) y los cuales codifican un polipéptido que inhibe la actividad de la metaloproteinasa; y
- 25 (g) polinucleótidos idénticos al menos al 95% a un polinucleótido como el definido en uno cualquiera del punto (a) al (d) y los cuales codifican un polipéptido que inhibe la actividad de la metaloproteinasa;

o la cadena complementaria de tal polinucleótido.

30 2. El polinucleótido de la reivindicación 1, el cual es ADN

3. El ADN de la reivindicación 2, el cual es ADN genómico.

4. El polinucleótido de la reivindicación 1, el cual es ARN.

35 5. Un vector que contiene el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. El vector de la reivindicación 5, en el cual el polinucleótido se une operativamente a las secuencias de control de expresión permitiendo la expresión en células huésped procariotas o eucariotas.

40 7. Una célula huésped modificada por ingeniería genética con el vector de la reivindicación 5 ó 6.

8. Un proceso para producir un polipéptido codificado por el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el cultivo de la célula huésped de la reivindicación 7 y la recuperación del polipéptido codificado por dicho polinucleótido a partir del cultivo.

9. Un proceso para producir células capaces de expresar un polipéptido codificado por el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo la modificación por ingeniería genética de células *in vitro* con el vector de la reivindicación 5 ó 6.

50 10. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u obtenible mediante el proceso de la reivindicación 8.

11. El polipéptido de la reivindicación 10, en el que dicho polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en:

- 55 (a) la secuencia de aminoácidos del polipéptido mostrado en la Figura 1;
- (b) la secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido mostrado en la Figura 1;
- 60 (c) la secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por el ADNc contenido en ATCC 75946;
- (d) la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro codificado por el ADNc contenido en ATCC 75946;
- 65 (e) la secuencia de aminoácidos de un fragmento del polipéptido de uno cualquiera del punto (a) al (d), en la que el fragmento inhibe la actividad de la metaloproteinasa; y

ES 2 281 898 T3

(f) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por un polinucleótido idéntico al menos al 95% al polinucleótido mostrado en la Figura 1, en la que el polipéptido inhibe la actividad de la metaloproteinasas.

12. Un anticuerpo específicamente unido al polipéptido de la reivindicación 11(a) a (e).

13. Un antagonista del polipéptido de la reivindicación 11, en el que el antagonista es el anticuerpo de la reivindicación 12 o una construcción antisentido que híbrida específicamente con un polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1(a) a 1(f) o de las reivindicaciones 2 a 4 hasta donde se vuelven a remitir a las reivindicaciones 1(a) a 1(f).

14. Un proceso para identificar antagonistas y agonistas de TIMP-4 que comprende:

(a) combinar células, el polipéptido de la reivindicación 10, una MMP, un compuesto a cribar y una mezcla de reacción que contenga un sustrato capaz de degradación por la MMP, en el que se marca dicho sustrato;

(b) medir la concentración de la marca liberada del sustrato; y

(c) determinar si el compuesto aumenta o bloquea la liberación de la marca del sustrato.

15. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el vector de la reivindicación 5 ó 6, el polipéptido de la reivindicación 10, el anticuerpo de la reivindicación 12 y/o el antagonista de la reivindicación 13 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Una composición de diagnóstico que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o el anticuerpo de la reivindicación 12.

17. Un proceso para diagnosticar una enfermedad o susceptibilidad a enfermedad relacionada con una mutación en la secuencia de ácido nucleico de TIMP-4 en un ácido nucleico obtenido a partir de un sujeto, que comprende:

(a) poner en contacto dichos ácidos nucleicos con una sonda que comprende el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 bajo condiciones de hibridación, y

(b) determinar una mutación en la secuencia de ácidos nucleico de TIMP-4.

18. Un proceso de diagnóstico para analizar la presencia de un polipéptido de TIMP-4 en una muestra obtenida a partir de un huésped, que comprende:

(a) poner en contacto dicha muestra con el anticuerpo de la reivindicación 12; y

(b) determinar la cantidad de anticuerpo unido así y de ese modo detectar el polipéptido de TIMP-4.

19. El uso del polipéptido de la reivindicación 10, el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el vector de la reivindicación 5 ó 6 para la preparación de una composición farmacéutica para la prevención de la invasión tumoral y la angiogénesis y posterior metástasis, para el tratamiento de enfermedades artríticas, enfermedades de resorción de hueso, para la prevención de la destrucción de colágeno aumentada que se da conjuntamente con la diabetes, las clases recesivas de epidermolisis bulosa distrófica, enfermedad periodontal y consecuencias relacionadas de la producción gingival de colagenasa, para la inhibición de la liberación de colagenasa de PMNL después de la infiltración celular a la encía inflamada, incluyendo combatir la mayor susceptibilidad de los enfermos de diabetes la enfermedad periodontal, para el tratamiento de la ulceración corneal, para prevenir la metástasis celular tumoral, para el tratamiento de alveolitis restenosis, asma, soriasis, glomerulosclerosis o choque séptico.

20. El uso del antagonista de la reivindicación 13 y/o el polinucleótido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para la preparación de una composición farmacéutica para reparar el tejido y remodelar el tejido cicatriz.

21. El anticuerpo de la reivindicación 12, el cual es un anticuerpo policlonal.

22. El anticuerpo de la reivindicación 12, el cual se selecciona entre el grupo que consiste en:

(a) un anticuerpo monoclonal;

(b) un anticuerpo quimérico;

(c) un anticuerpo humanizado;

(d) un anticuerpo de cadena sencilla; y

(e) un fragmento Fab.

ES 2 281 898 T3

23. El anticuerpo de la reivindicación 12, el cual está marcado.

24. El anticuerpo de la reivindicación 23, en el cual la marca se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 5 (a) una enzima;
- (b) una marca fluorescente; y
- 10 (c) una marca radioactiva.

25. El anticuerpo de la reivindicación 12, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a dicho polipéptido en una transferencia tipo "Western" o en un tipo ELISA o en ambos.

26. Una célula que produce el anticuerpo de la reivindicación 12.

27. Un hibridoma que produce el anticuerpo de la reivindicación 12.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

I ATGCCCTGGGAGCCCTCGGCCCGGGCCCAAGCTGGGTGCTGTT
 M P G S P R P A P S W V L L
 42 GCTGGGCTGCTGGCGTTGCTGCGGCCCGGGGCTGGGTG
 L R L L A L L R P P G L G
 83 AGGCATCCAGCTGGGCCCCGGGGCACCCTCAGCAGCACATC
 E A C S C A P A H P Q Q H I
 124 TGCCACTGGGCACHTGTGATTGGGGCCAAAATCTCCAGIGA
 C H S A L V I R A K I S S E
 165 GAAGGTAGTTCGGGOCAGTGCAGACCCTGCTGACACTGAAA
 K V V P A S A D P A D T E
 206 AAATGCTCCGGTATGAAATCAAACAGATAAAGATGTTCAA
 K M L R Y E I K Q I K M F K
 247 GGGTTGAGAAAGTCAAGGATGTTTCAGTATATCTATACGCC
 G F E K V K D V Q Y I Y T P
 288 TTTTGACTCTTCCCTCTGTTGGTGGTAAACTAGAAAGCCACA
 F D S S L C G V K L E A N
 329 GCCAGAAGCAGTATCTCTTACTGGTTCAGGTCCCTCAGTGAT
 S Q K Q Y L L T G Q V L S D
 370 GGAAAAGTCTTCATCCATCTGTGCAACTACATCGAGCCCTG
 G K V F I H L C N Y I E P W
 411 GGAGGACCTGTCCCTGGTGGCAGAGGGAAAGTCTGAATCATC
 E D L S L V Q R E S L N H
 452 ACTACCATCTGAACCTGTGGCTGCCAAATCACCACCTGCTAC
 H Y H L N C G C Q I T T C Y
 493 ACAGTACCCCTGTACCATCTCGGCCCTAACGAGTGCCTCTG
 T V P C T I S A P N E C L W
 534 GACAGACTGGCTGTGGAACGAAAGCTCTATGGTTACCAGG
 T D W L L E R K L Y G Y Q
 575 CTCAGCATTATGTCGTATGAAGCATGTTGACGGCACCTGC
 A Q H Y V C M K H V D G T C
 616 AGCTGGTACCGGGGGCACCTGCCTCTCAGGAAGGAGTTTGT
 S W Y R G H L P L R K E F V
 657 TGACATGGTTCAGCCCTAG **FIG. 1**
 D I V Q P

TIMP.ms f (TIMP2 Humano)	1	MGAAARTLRL	ALGLLLLATL	LRP...A.DA	CSCSPVHPQQ	AFCNADVVIR	50
TIMP.ms f (TIMP4 Humano)		MPSPPRAPS	WVLLRLLAL	LRPPGLG.EA	CSCAPAHQQ	HICHSALVIR	
TIMP.ms f (TIMP3 Humano)	MTP	WGLIIVLLGS	WSLGDWGAEA	CTCSPSHPD	AFCNSDIVIR	
TIMP.ms f (TIMP1 Humano)		MAPFEPLASG	ILLLLWLIAP	SR.....A	CTCVPPHPQT	AFCNSDLVIR	
Consenso		-----	---L--L---	-----A	C-C-P-HPQ-	--C-----VIR	
TIMP.ms f (TIMP2 Humano)	51	AKAVSEKEVD	SGNDIYGNPI	KRIQYEIKQI	KMFKGPE...	..KDIEFIYT	100
TIMP.ms f (TIMP4 Humano)		AKISSEKVP	ASADP.ADTE	KMLRYEIKQI	KMFKGFVK.	..KDVQYIYT	
TIMP.ms f (TIMP3 Humano)		AKVVGKLVK	EG.....PF	GTLVYTIKQM	KMYRGFTKM.	..PHVQYIHT	
TIMP.ms f (TIMP1 Humano)		AKFVGTPEVNOTT	LYQRYEIKMT	KMYKGFQALG	DAADIRFVYT	
Consenso		AK-----V-	-----	----Y-IK--	KM--G----	-----T	
TIMP.ms f (TIMP2 Humano)	101	APSSAVCGVS	LDVGGKKEYL	IAGKAEGDGK	MHITLCDFIV	PWDTLSTTQK	150
TIMP.ms f (TIMP4 Humano)		PFDSLCGVK	LEANSQKQYL	LTGQVLSDGK	VFIHLCNYIE	PWEDLSLVQR	
TIMP.ms f (TIMP3 Humano)		EASESLCGLK	LEVN.KYQYL	LTGRVY.DGK	MYTGLCNFVE	RWDQLTLSQR	
TIMP.ms f (TIMP1 Humano)		PAMESVCGYF	HRSHNRSEEF	LIAGKLDGGL	LHITTCSFVA	PWNSLSLAQR	
Consenso		-----CG--	-----	-----DG-	-----C----	-W--L---Q-	
TIMP.ms f (TIMP2 Humano)	151	KSLNHRYSQMG	C.ECKITRCP	MIPCYISSPD	ECLWMDWVTE	KNINGHQAKF	200
TIMP.ms f (TIMP4 Humano)		ESLNHHYHLN	C.GCQITTCY	TVPCTISAPN	ECLWTDWLE	RKLYGYQAQH	
TIMP.ms f (TIMP3 Humano)		KGLNYRYHLG	C.NCKIKSCY	YLPFCFVTSKN	ECLWTDMLSN	FGYPGYQSKH	
TIMP.ms f (TIMP1 Humano)		RGFTKTYTVG	CEECTVFPCL	SIPCKLQSGT	HCLWTDQLLQ	GSEKGFQSRH	
Consenso		-----Y---	C--C-----C-	--PC-----	-CLW-D-----	-----G-Q----	
TIMP.ms f (TIMP2 Humano)	201	FACIKRSDGS	CAW..YRGAA	PPKQEFLDIE	DP		232
TIMP.ms f (TIMP4 Humano)		YVCMKHVDGT	CSW..YRGHL	PLRKEFVDIV	QP		
TIMP.ms f (TIMP3 Humano)		YACIRQKGGY	CSW..YRGWA	PPDKSIINAT	DP		
TIMP.ms f (TIMP1 Humano)		LACLPREPGL	CTWQSLRSQI	A.....			
Consenso		--C-----G-	C-W---R---	-----			

FIG. 2

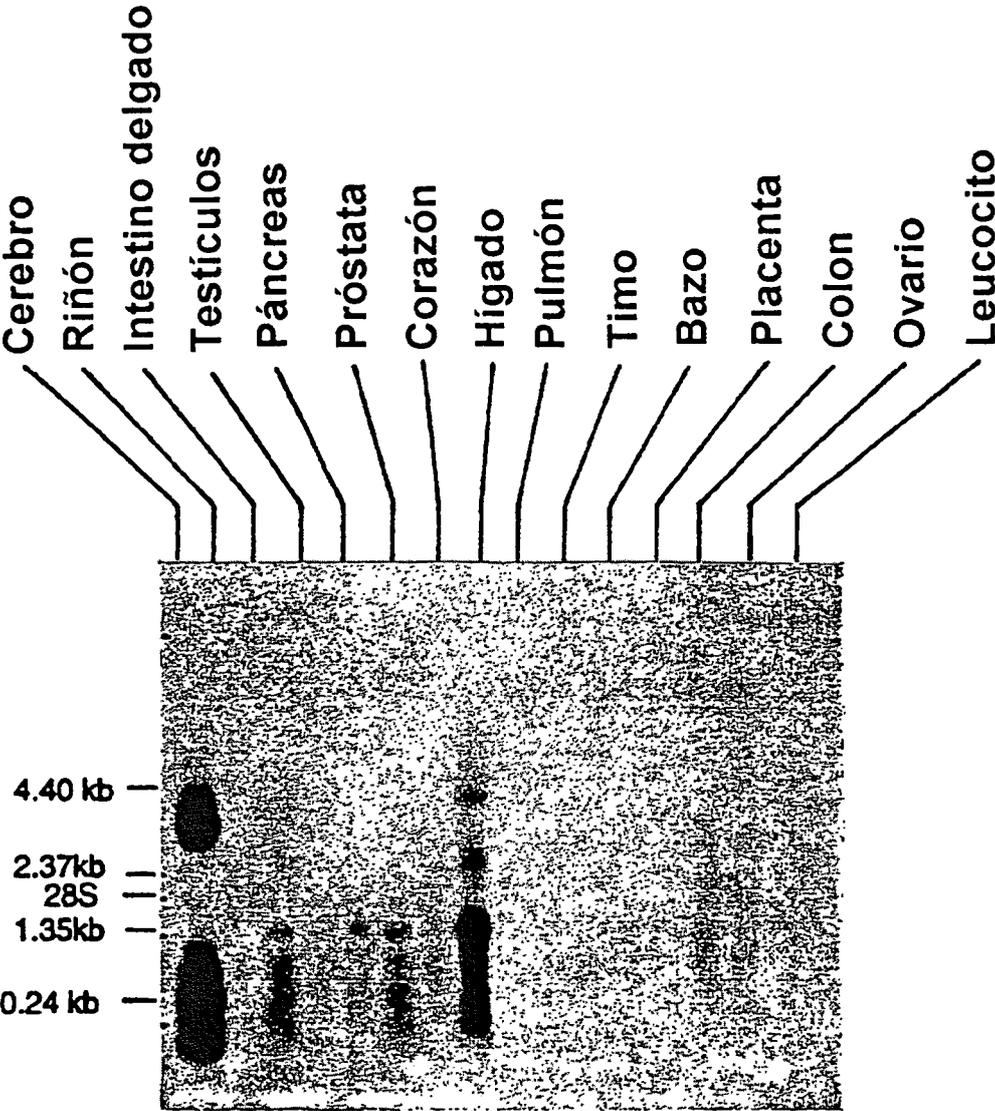


FIG. 3

ES 2 281 898 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: GREENE, *ET AL.*
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: TIMP-4 humano
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIA2: 2
- 10 (iv) DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI, STEWART Y
OLSTEIN
- 15 (B) CALLE: 6 BECKER FARM ROAD
- (C) CIUDAD: ROSELAND
- (D) ESTADO: NEW JERSEY
- 20 (E) PAÍS: EE.UU.
- (F) CÓDIGO POSTAL: 07068
- (v) FORMA DE LECTURA INFORMÁTICA:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: DISQUETE DE 3,5 PULGADAS
- (B) ORDENADOR: IBM PS/2
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS
- (D) PROGRAMA: WORD PERFECT 5.1
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: presentado con la presente memoria
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- 40 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: FERRARO, GREGORY D.
- 45 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.134
- (C) REFERENCIA/NÚM. DE EXPEDIENTE: 325800-278
- (ix) INFORMACIÓN PARA TELECOMUNICACIÓN:
- 50 (A) TELÉFONO: 201-994-1700
- (B) TELEFAX: 201-994-1744

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 675 PARES DE BASES
- (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- 60 (C) CATENARIEDAD: SENCILLA
- (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1

ES 2 281 898 T3

5
10
15
20

ATGCCTGGGA	GCCCTCGGCC	CGCGCCAAGC	TGGGTGCTGT	TGCTGCGGCT	GCTGGCGTTG	60
CTGCGGCCCC	CGGGGCTGGG	TGAGGCATGC	AGCTGCGCCC	CGGCGCACCC	TCAGCAGCAG	120
ATCTGCCACT	CGGCACFTGT	GATTTCGGGC	AAAATCTCCA	GTGAGAAGGT	AGTTCCGGCC	180
AGTGCAAGACC	CTGCTGACAC	TGAAAAAATG	CTCCGGTATG	AAATCAAACA	GATAAAGATG	240
TTCAAAGGGT	TTGAGAAAGT	CAAGGATGTT	CAGTATATCT	ATACGCCTTT	TGACTCTTCC	300
CTCTGTGGTG	TGAAACTAGA	AGCCAAACAGC	CAGAAGCAGT	ATCTCTTGAC	TGGTCAGGTC	360
CTCAGTGATG	GAAAAGTCTT	CATCCATCTG	TGCAAGTACA	TCGAGCCCTG	GGAGGACCTG	420
TCCTTGGTGC	AGAGGGAAAG	TCTGAATCAT	CACTACCATC	TGAACTGTGG	CTGCCAATC	480
ACCACCTGCT	ACACAGTACC	CTGTACCATC	TCGGCCCCTA	ACGAGTGCCCT	CTGGACAGAC	540
TGGCTGTTGG	AACGAAAGCT	CTATGGTTAC	CAGGCTCAGC	ATTATGTCTG	TATGAAGCAT	600
CITGACTTCA	CCTGCAGCTG	GTACCGGGGC	CACCTGCCTC	TCAGGAAGGA	GTTTGTGAC	660
ATXGTTCAGC	CCTAG					675

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 224 AMINOÁCIDOS

25 (B) TIPO: AMINOÁCIDO

(C) CATENARIEDAD:

(D) TOPOLOGÍA: LINEAL

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 281 898 T3

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

55

60

65