



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 292 242**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/19 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99923088 .1**

(86) Fecha de presentación : **14.05.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1076703**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **21.02.2001**

(54) Título: **Utilizaciones terapéuticas de polipéptidos homólogos de IL-17.**

(30) Prioridad: **15.05.1998 US 85579 P**
23.12.1998 US 113621 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

(72) Inventor/es: **Chen, Jian;**
Filvaroff, Ellen;
Goddard, Audrey;
Gurney, Austin, L.;
Li, Hanzhong y
Wood, William, I.

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

Utilizaciones terapéuticas de polipéptidos homólogos de IL-17.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la identificación y aislamiento de ADN, utilizaciones terapéuticas y la producción recombinante de polipéptidos novedosos que tienen identidad en la secuencia con la citoquina IL-17 y antígeno 8 asociado con el linfocito T citotóxico (CTLA-8) designado en la presente invención como polipéptidos PRO1122.

Antecedentes de la invención

Se ha descrito que la citoquina interleuquina 17 (IL-17) estimula las células epiteliales, endoteliales y fibroblásticas para secretar, tales como IL-6, IL-8, y el factor estimulador de colonias de granulocitos, así como la prostaglandina E2. Aunque la expresión de IL-17 se limita a las células T activadas, el receptor de IL-17 está expresado ampliamente, una propiedad que concuerda con las actividad pleiotrópicas de IL-17. Además, se ha observado que cuando se cultiva en presencia de IL-17, los fibroblastos podrían mantener la proliferación de maduración preferencial de CD34+ en neutrófilos. Como resultado, IL-17 podía ser un potenciador temprano o incluso un mantenedor de la reacción inflamatoria dependiente de células T y/o un elemento de la red de citoquinas que conecta el sistema inmune a la hematopoyesis. Ver, Yao *et al.*, J. Immunol., 155(12): 5483-5486 (1995); Fossiez *et al.* J. Exp. Med. 183(6): 2593-2603 (1996); Kennedy *et al.*, J. Interferon Cytokine Res., 16(8): 611-617 (1996).

Más generalmente, todas las proteínas novedosas son de interés. Las proteínas extracelulares juegan un papel importante en la formación, diferenciación y mantenimiento de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, la proliferación, migración, diferenciación, o interacción con otras células, está habitualmente dirigido por la información recibida de otras células y/o el medio inmediato. Esta información es transmitida frecuentemente por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que, a su vez, son recibidos e interpretados por diversos receptores celulares o proteínas unidas a membrana. Estos polipéptidos secretados o moléculas de señalización pasan normalmente a través del mecanismo secretor celular para alcanzar su sitio de acción en el medio extracelular.

Las proteínas secretadas tienen diversas aplicaciones industriales, incluyendo productos farmacéuticos, diagnóstico, biosensores y biorreactores. La mayoría de fármacos de proteínas disponibles en la actualidad, tales como agentes trombolíticos, interferones, interleuquinas, eritropoyetinas, factores estimuladores de colonias, y varias otras citoquinas, son proteínas secretoras. Sus receptores, que son proteínas de membrana, también tienen potencial como agentes terapéuticos o diagnóstico.

Se están realizando esfuerzos tanto en la industria como a nivel académico para identificar nuevas proteínas secretadas nativas. Muchos esfuerzos están centrados en el cribado de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero para identificar las secuencias codificantes para proteínas secretadas novedosas. Algunos ejemplos de procedimientos y técnicas se describen en la literatura [véase, por ejemplo, Klein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 7108-7113 (1996); Patente de Estados Unidos No. 5.536.637]. Los resultados de dichos esfuerzos se presentan en la presente invención.

La interleuquina-17 es una citoquina derivada de célula T descrita recientemente, las funciones biológicas de la cual están sólo empezando a entenderse. Spriggs *et al.*, J. Clin. Immunol. 17: 366 (1997); Broxmeyer, H.E., J. Exp. Med. 183: 2411 (1996). Cuando IL-17 se identificó inicialmente como un clon de ADNc de linfoma de célula T de roedor, se reconoció que tenía una secuencia similar a un marco de lectura abierto de un virus herpes de primate, *Herpesvirus saimiri*, Rouvier *et al.*, J. Immunol. 150: 5445 (1993), Yao *et al.*, Immunity 3:811 (1995) [Yao-1], Fossiez *et al.*, J. Exp. Med. 183: 2593 (1996). Posteriormente, se ha confirmado que esta proteína viral tiene muchas, si no todas, las actividades inmunoestimuladoras observadas para la IL-17 huésped. Fleckenstein y Desrosiers, "Herpesvirus saimiri and Herpesvirus ateles", en The Herpesvirus, I.B. Roizman, ed., Plenum Publishing Press, Nueva York, p. 253 (1982), Biesinger, B.I. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 89: 3116 (1992).

La IL-17 humana es una proteína homodimérica, unida por enlaces disulfuro, de 20-30 kDa, con una glicosilación variable. Yao-1, *supra*; Fossiez *et al.*, *supra*. Es codificado por un marco de lectura abierto de 155 aminoácidos que incluye una secuencia señal de secreción N-terminal de 19-23 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de IL-17 sólo es similar a la proteína de *Herpesvirus* descrita anteriormente y no muestra una identidad significativa con las secuencias de otras citoquinas u otras proteínas. Adicionalmente, el ARNm que codifica IL-17 sólo se ha detectado en células T CD4+ memoria activadas y células PBMC estimuladas por PMA/ionomicina.

A pesar de su distribución limitada en tejidos, IL-17 muestra actividades biológicas pleiotrópicas en varios tipos de células, tales como fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales. Spriggs, M.K., *supra*; Broxmeyer, H.E., *supra*. Se ha observado que IL-17 estimula la producción de muchas citoquinas: TNF- α e IL-1 β de macrófagos [Jovanovic *et al.*, J. Immunol. 160: 3513 (1998)]; IL-6, IL-8 y la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1) de fibroblastos humanos. Fossiez *et al.* *supra*, Yao *et al.*, J. Immunol. 155: 5483 (1995) [Yao-2]; factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSM) y prostaglandinas (PGE-2) forman sinoviocitos, Fossiez *et al.*, *supra*. A través de la inducción

de una serie de citoquinas, IL-17 es capaz de mediar un amplio rango de respuestas, principalmente proinflamatoria y hematopoyética. Esto ha conducido a sugerir que IL-17 puede jugar un papel crucial en la iniciación o mantenimiento de una respuesta inflamatoria. Jovanovic *et al.*, *supra*.

En concordancia con el amplio rango de efectos de IL-17, se ha observado que el receptor de la superficie celular para IL-17 está ampliamente expresado en muchos tejidos y tipos de células. Yao *et al.*, Cytokine 9: 794 (1997) [Yao-3]. Aunque la secuencia de aminoácidos del receptor hIL-17 (866 aminoácidos) predice una proteína con un único dominio transmembrana y un dominio intracelular largo de 525 aminoácidos, la secuencia del receptor es única y no es similar a la de cualquiera de los receptores de la familia de receptores de citoquina/factor de crecimiento. Esto acoplado con la falta de similitud del propio IL-17 con otras proteínas conocidas indica que IL-17 y su receptor pueden ser parte de una familia nueva de proteínas y receptores de señalización.

Se ha observado además que IL-17, mediante señalización intracelular, estimula el influxo transitorio de Ca^{2+} y una reducción en [AMPC]_i en macrófagos humanos. Jovanovic *et al.*, *supra*. Los fibroblastos y los macrófagos tratados con IL-17 inducen la activación de NF- κ B, Yao-1, *supra*, Jovanovic *et al.*, *supra*, mientras que los macrófagos tratados con el mismo activan NF- κ B y proteínas quinasas activadas por mitógeno. Shalom-Barek *et al.*, J. Biol. Chem. 273: 27467 (1998).

La presente descripción describe la clonación y caracterización de dos proteínas novedosas, denominadas PRO1931 (IL-17B) y PRO1122 (IL-17C) y variantes activas de las mismas, que son similares en las secuencias de aminoácidos a IL-17. La presente invención se refiere al último, PRO1122 (IL-17C). WO 99/61617 que es relevante para la valoración de la novedad también se refiere al mismo polipéptido, designado en la misma como IL-21.

Descripción resumida de la invención

Los Solicitantes han identificado un clon de ADNc que codifica un polipéptido novedoso que tiene una identidad de secuencia con IL-17, en el que el polipéptido se designa en la presente invención como "PRO1122".

Un aspecto de la presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, se refiere a la utilización de un polipéptido PRO1122 aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia con la secuencia de los residuos de aminoácidos aproximadamente 1 o aproximadamente 19 a aproximadamente 197, ambos inclusive, de la figura 3 (SEC ID No: 3). En un aspecto preferido, el polipéptido comprende los residuos de aminoácidos aproximadamente 1 o aproximadamente 19 a aproximadamente 197, ambos inclusive, de la figura 3 (SEC ID No: 3).

En un aspecto, tal y como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a la utilización de un polipéptido PRO1122 aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia con la secuencia de

ES 2 292 242 T3

aminoácidos codificada por el ADNc de proteína humana depositada con la ATCC el 22 de diciembre de 1998 bajo el No. de Depósito de ATCC 203552.

En una realización preferida, el polipéptido PRO1122 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por el inserto de ADNc del vector depositado el 22 de diciembre de 1998 bajo el No. de Depósito de ATCC 203552 (DNA62377-1381-1).

En un aspecto específico, la presente invención utiliza un polipéptido PRO1122 aislado sin la secuencia de señal N-terminal y/o la metionina de iniciación. Los procesos para la producción del mismo también se describen en la presente invención, donde estos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante adecuada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido PRO1122 y la recuperación del polipéptido PRO1122 del cultivo celular.

En aún otra realización, tal y como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a antagonistas de un polipéptido PRO1122 nativo. En un aspecto particular, el antagonista es un anticuerpo anti-PRO1122.

En aún otra realización, tal y como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a una composición que comprende un antagonista de polipéptido PRO1122 tal y como se ha definido anteriormente en la presente invención, combinado con un portador. Preferiblemente, el portador es farmacéuticamente aceptable.

En aún otra realización, tal y como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a la utilización de un polipéptido PRO1122, o un antagonista del mismo tal y como se ha descrito anteriormente en la presente invención, que puede ser un anticuerpo anti-PRO1122, para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una condición que es sensible al polipéptido PRO1122 o un agonista o antagonista del mismo (por ejemplo, anti-PRO1122). En un aspecto particular, la presente invención se refiere a la utilización de un polipéptido PRO1122 o un antagonista del mismo en un procedimiento para tratar un trastorno cartilaginoso degenerativo.

En otra realización adicional, la presente invención se refiere a moléculas antagonistas de PRO1122.

En otra realización adicional, tal y como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a una composición terapéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un antagonista de PRO1122 de la misma combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID No: 1) derivada de los nucleótidos 42-581 de SEC ID NO: 2. También se muestra en la figura 1 el péptido señal, un sitio de N-glicosilación, una región que tiene una identidad en la secuencia con IL-17, el peso molecular, y el pI aproximado.

La figura 2 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 2) que contiene la secuencia de nucleótidos de un ADNc de PRO1931 de secuencia nativa (nucleótidos 42-581 de SEC ID No: 2), en la que la secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 2) es un clon designado en la presente invención como "UNQ516" y/o "DNA59294-1381".

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID No: 3) derivada de los nucleótidos 50-640 de SEC ID No: 4. También se muestra las localizaciones aproximadas del péptido señal, un patrón de cremallera de leucinas en una región que tiene identidad en la secuencia con IL-17. También se muestran el peso aproximado en daltons, y el pI aproximado.

La figura 4 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 4) que contiene la secuencia de nucleótidos de un ADNc de PRO1122 de secuencia nativa (nucleótidos 50-640 de SEC ID No: 1), en la que la secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 4) es un clon designado en la presente invención como "UNQ561" y/o "DNA62377-1381-1". También se muestran la secuencia complementaria y las secuencias de aminoácidos deducidas.

La figura 5 muestra DNA47332 (SEC ID No: 5), un fragmento de ADN virtual utilizado en el aislamiento de DNA59294 (SEC ID No: 2).

La figura 6 muestra DNA49665 (Incyte EST 1347523) (SEC ID No: 7), un fragmento virtual utilizado en el aislamiento de DNA62377 (SEC ID No: 4).

La figura 7A muestra una alineación entre las secuencias de proteínas codificadas por DNA59624 (IL17-B) (SEC ID No: 1), DNA62377 (IL17-C) (SEC ID No: 3) e IL-17 (SEC ID No: 11). Las secuencias de señal putativas están subrayadas, los sitios potenciales de glicosilación unidos a N están doblemente subrayados, y los residuos de triptófano y cisteína conservados están marcados con asteriscos. IL-17, IL-17B e IL-17C comparten una identidad de aminoácidos entre sí del 26-28%. La figura 7B muestra una alineación entre sólo la proteína codificada de DNA59624 (SEC ID No: 1) y DNA62377 (SEC ID No: 3).

La figura 8 es un análisis de transferencia de ARN de IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1). La transferencia northern representa ARNm de tejidos humanos (Clontech) hibridado a una sonda IL17B humana radiomarcada de forma

específica tal como se describe en el Ejemplo 8. Los marcadores de tamaño de ARN se muestran en la izquierda. En la parte inferior se muestra una rehibridación de la misma transferencia con una sonda de ADNc de β -actina humana.

5 Las figuras 9A-9B muestran gráficos de barras que representan las actividades biológicas de IL17 (SEC ID No: 11), IL17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) e IL17C (UNQ561) (SEC ID No: 3). La figura 9A muestra células de fibroblastos de prepucio humano (HFF) cultivadas con la proteína de fusión Fc de control, IL-17, IL-17B.Fc (SEC ID No: 12) o IL-17C.Fc (SEC ID No: 13) a 100 ng/ml durante 18 horas y se ensayó el medio condicionado para IL-6 (SEC ID No: 14), tal como se describe en el Ejemplo 10. La figura 9B muestra la línea de células leucémicas humanas, THP1, que se trató con las mismas citoquinas (100 ng/ml) que anteriormente bajo las mismas condiciones en las que se ensayaron los sobrenadantes para el nivel de liberación de TNF- α . Los resultados se expresan como la media $\pm$ SE de las determinaciones por triplicado de un experimento representativo.

15 La figura 10 es una medición en el tiempo que representa la dependencia de la liberación de TNF- α activada por IL17B e IL17C de células THP1. En la figura 10A, las células THP1 se incubaron con 100 ng/ml (2,2 nM) de IL17B.Fc (SEC ID No: 12) o IL17C.Fc (SEC ID No: 13) de 0,5 a 32 horas, se recogió el medio condicionado, y se cuantificó la concentración de TNF- α tal como se describe en el Ejemplo 10. En la figura 10B, las células THP1 se trataron con la IL-17B.Fc e IL-17C.Fc a un intervalo de concentración de 0 a 120 nM durante 18 horas y se determinó la liberación de TNF- α .

20 La figura 11 es una inmunoprecipitación de ECD de IL-17R (SEC ID No: 15) con IL-17 (SEC ID No: 11), IL17B (SEC ID No: 1) e IL-17C (SEC ID No: 3). El ECD del receptor de IL-17 etiquetado con His se expresó en células 293 y se marcó metabólicamente ^{35} S tal como se describe en el Ejemplo 11. El sobrenadante se recuperó y se utilizaron gránulos de Ni-NTA para precipitar con afinidad ECD de IL-17R etiquetado con His (SEC ID No: 15) en el sobrenadante (banda 1). En la figura 11A, IL-17 (SEC ID No: 11), IL-17B.Fc (SEC ID No: 12) e IL-17C.Fc (SEC ID No: 13), o las proteínas de fusión Fc de control se incubaron con el sobrenadante y se añadieron gránulos de proteína-A-agarosa para precipitar las proteínas de fusión Fc. Para la reacción de inmunoprecipitación de IL-17, se incluyeron anticuerpos anti-IL-17. La figura 11B muestra los resultados de un experimento de unión competitiva, en el que la inmunoprecipitación de ECD de IL-17R (SEC ID No: 22) por IL-17 (SEC ID No: 11) se realizó en presencia de un exceso de cinco veces de IL-17B.his (SEC ID No: 23) y proteínas de control etiquetada con his. Los precipitados en la figura 11A y la figura 11B se analizaron mediante electroforesis en geles NuPAGE (4-12% Bis-Tris). Los marcadores de peso molecular se indican en la izquierda de cada panel.

35 La figura 12 muestra el análisis FACS de la unión de IL-17B.Fc (SEC ID No: 12) e IL-17C.Fc (SEC ID No: 13) a células THP-1. Las células THP-1 se incubaron con IL-17B.Fc (A) o IL-17C.Fc (B) o proteínas de fusión Fc de control en PBS (5% de suero de caballo) y seguido de la adición de anticuerpos secundarios anti-Fc conjugados con FITC.

40 La figura 13 muestra el efecto de IL-17 (SEC ID No: 11) en el cartílago articular. Se cultivaron explantes de cartílago con la concentración indicada de IL-17 sola (sólido) o en presencia de IL-1 α a la concentración indicada (tramada) (SEC ID No: 25) o IL1ra (antagonista del receptor de IL-1, R&D Systems, 1 μ g/ml) (SEC ID No: 26) durante 72 horas. La liberación de proteoglicanos (PG) en el medio (panel superior) indica la ruptura de la matriz. La síntesis de la matriz se determinó mediante la incorporación de ^{35} S-sulfato en el tejido (panel inferior).

45 La figura 14 muestra el efecto de IL-17 (SEC ID No: 11) en la liberación de óxido nítrico. Los explantes se trataron con IL-17 (10 ng/ml) sola (columnas de la izquierda) o en presencia de IL-1 α (10 ng/ml) (SEC ID No: 25) (columnas de la derecha). Después de 48 horas, se ensayó la concentración de nitrito en el medio.

50 La figura 15 muestra el efecto de NO en cambios inducidos por IL-17 en el metabolismo de la matriz. Los explantes se trataron con IL-17 (5 ng/ml) (SEC ID No: 11) sola (+) o con un inhibidor irreversible de óxido nítrico sintasa, NOS (L-NIO, Caymen Chemical, 0,5 mM). Después de 72 horas de tratamiento, se ensayó el medio para (A) nitrito y (B) proteoglicanos (PGs). (C) La síntesis de proteoglicanos se determine mediante la incorporación de ^{35} S-sulfato en el tejido.

55 La figura 16 muestra el efecto de la inhibición de NO en cambios inducidos por IL-1 α en el metabolismo de proteoglicanos (PG). Los explantes de cartílago articular se trataron con IL-1 α (5 ng/ml) (SEC ID No: 25) sola (+) o con inhibidores de NOS (LNIO o L-NIL) (L-NIL, inhibidor de NOS reversible, Caymen Chemical) o IL-1ra (antagonista del receptor de IL-1, R&D Systems, 1 μ g/ml) (SEC ID No: 26). Después de 72 horas de tratamiento, se ensayó el medio para (A) concentración de nitrito y (B) cantidad de proteoglicanos. (C) La síntesis de la matriz se determine mediante la incorporación de ^{35} S-sulfato en el tejido.

60 La figura 17 muestra el efecto de UNQ516 (SEC ID No: 1) en el cartílago articular. Los explantes se trataron con UNQ561 al 1% ó 0,1% en ausencia (3 columnas de más a la izquierda) o la presencia (tres columnas de más a la derecha) de IL-1 α (SEC ID No: 25) a 10 ng/ml, y la síntesis de proteoglicanos (PG) y la producción de nitritos se determinaron tal como se describe en el Ejemplo 16.

La figura 18 muestra el efecto de UNQ561 (SEC ID No: 3) en el cartílago articular. Los explantes se trataron con LTNQ561 al 1% ó 0,1% en ausencia (tres columnas de más a la izquierda) o presencia (tres columnas de más a la derecha).

derecha) de IL-1 α (+) (10 ng/ml) (SEC ID No: 25). La liberación y síntesis de proteoglicanos (PG) se muestran como el control de la cantidad anterior.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

Los términos “polipéptido PRO1122” y “PRO1122” cuando se utilizan en la presente invención engloba a PRO1122 de secuencia nativa y a las variantes polipéptido del mismo (que más adelante también se definen en la presente). El polipéptido PRO1122 puede aislarse a partir de una serie de orígenes, tales como a partir de tipos de tejido humano o de algún otro origen, o prepararse mediante procesos de recombinación o sintéticos.

Un “polipéptido PRO1122 de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido PRO1122 derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos PRO1122 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido PRO1122 de secuencia nativa” comprende específicamente formas secretadas o truncadas naturales de un polipéptido PRO1122 (por ejemplo, formas solubles que contienen, por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme (“spliced”) alternativas) y variantes alélicas naturales de un polipéptido PRO1122.

En una realización de la presente invención, el polipéptido PRO1122 de secuencia nativa que se utiliza es un polipéptido PRO1122 de secuencia nativa madura o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 ó 19 a 197 de la figura 3 (SEC ID No: 3). Además, aunque el polipéptido PRO1122 descrito en la figura 3 (es decir, UNQ561) se observa que empieza con un residuo de metionina designado como posición 1 de los aminoácidos, es concebible y posible que se pueda utilizar otro residuo de metionina situados en dirección 5' o dirección 3' desde la posición 1 de los aminoácidos en la figura 3 como residuo de aminoácido de partida.

El término “UNQ561” se refiere a la proteína PRO1122 de secuencia nativa específica descrita en la figura 3. Opcionalmente, el polipéptido PRO1122 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por el inserto de ADNc del vector DNA62377-1381-1, bajo el número de depósito de ATCC 203552.

La “variante de PRO1122” significa un polipéptido PRO1122 “activo” tal y como se define a continuación que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido PRO1122 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de residuos 1 o aproximadamente 19 a 197 mostrada en la figura 3 (SEC ID No: 3), para un polipéptido PRO1122 de secuencia nativa de longitud completa o madura. Entre dichas variantes de polipéptido PRO1122 se incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO1122 en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden, se sustituyen o se eliminan, en el extremo N- o C-terminal o en el interior de la secuencia de la figura 3 (SEC ID No: 3). Habitualmente, una variante de polipéptido PRO1122 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la figura 3 (SEC ID No: 3), con o sin el péptido señal (por ejemplo, con péptido señal, los residuos de aminoácidos del 1 a 197 de la SEC ID No: 3, sin péptido señal aproximadamente 19 a 197 de la SEC ID No: 3). Las variantes proporcionadas en la presente invención excluyen las secuencias de PRO1122 de secuencia nativa, así como los polipéptidos y ácidos nucleicos descritos en la presente invención con los que los polipéptidos PRO1122 comparten el 100% de identidad y/o que ya son conocidos en la técnica.

El término “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” en relación a las secuencias de aminoácidos de PRO1122 identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácido en una secuencia de polipéptido PRO1122, después de alinear las secuencias y de introducir espacios, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento, con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos, puede conseguirse de varias maneras que se encuentran dentro del conocimiento en la técnica, por ejemplo, utilizando software de ordenador disponible públicamente, tal como software aALIGN, ALIGN-2, Megalin (DNASTAR) o BLAST

(por ejemplo, Blast, Blast-2, WU-Blast-2)). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, los valores de % de identidad utilizados en la presente invención se generan utilizando WU-BLAST2 (Çaltschul *et al.*, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se ajustan a los valores por defecto. Aquellos que no se ajustan a los valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables se fijan a los siguientes valores: espacio de solapamiento (“overlap span”) = 1, fracción de solapamiento (“overlap fraction”) = 0,125, umbral de palabra (“word threshold”) T = 11, y matriz de puntuación (“scoring matrix”) = BLOSUM 62. Para el objetivo de la presente invención, un valor del % de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos que se emparejan entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO1122 de interés y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara el polipéptido PRO1122 de interés) según se determina mediante WU-BLAST-2 entre (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO1122 de interés.

El término “aislado” cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Preferiblemente, el polipéptido aislado está libre de la asociación con todos los componentes con los que se asocia de forma natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con utilizaciones diagnósticas o terapéuticas para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido PRO1122 no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta en la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

La “astringencia” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente, es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones astringentes” o “condiciones de astringencia elevada”, tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquellas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de astringencia elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las “condiciones moderadamente astringentes” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluye la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación

durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario, para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

El término “epítipo etiquetado” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido PRO1122, o secuencia del dominio del mismo, fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo frente al que se puede fabricar un anticuerpo, o que se puede identificar por algún otro agente, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido 1122. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 residuos).

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “inmuno adhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es otra a parte del reconocimiento y sitio de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-polipéptido PRO1122 individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas, y neutralizantes), composiciones de anticuerpo anti-PRO1122 con especificidad poliepitópica, anticuerpos anti-PRO1122 de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-PRO1122. El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

“Activo” o “actividad” para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de PRO1122 que retiene las actividades biológica y/o inmunológica de polipéptido PRO1122 nativo o natural. Más detalladamente, actividad “biológica” se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) provocada por un PRO1122 nativo o natural diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un PRO1122 nativo o natural y una actividad “inmunológica” se refiere sólo a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un PRO1122 nativo o natural. Una actividad biológica preferida incluye, por ejemplo, la liberación de TNF- α de células THP1.

“Trastorno cartilaginoso degenerativo” describe un grupo de trastornos que se caracterizan principalmente por la destrucción de la matriz del cartílago. Algunas patologías adicionales incluyen la producción de óxido nítrico y una irrupción elevada de proteoglicanos. Entre los trastornos de ejemplo que se comprenden en esta definición se incluyen, por ejemplo, artritis (por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriática), sepsis, colitis ulcerosa, psoriasis, esclerosis múltiple, diabetes tipo I, artritis de células gigantes, lupus eritematoso sistémico y síndrome de Sjögren.

El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido PRO1122 nativo descrito en la presente invención. De forma similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido PRO1122 nativo descrito en la presente invención. Entre las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas se incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos PRO1122 nativos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, etc. agonistas o antagonistas, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO1122 puede comprender poner en contacto un polipéptido PRO1122 con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido PRO1122.

“Anticuerpos” (Abs) e “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de la especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles elevados por mielomas. El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, sin limitación, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada.

Los términos “tratar”, “tratamiento” y “terapia”, tal y como se utilizan en la presente invención, se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva. Un ejemplo de “terapia preventiva” es la prevención de la condición o trastorno patológico menos marcado. Entre aquéllos que necesitan el tratamiento se incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno así como aquéllos que son propensos a padecer el trastorno o aquéllos a los que se debe prevenir el trastorno.

La administración “crónica” se refiere a la administración del agente o agentes en un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo largo de tiempo. La administración “intermitente” es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es bastante cíclico en su naturaleza.

El término “mamífero”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de deporte o de compañía, tales como ganado (por ejemplo, vacas), caballos, perros, ovejas, cerdos, conejos, cabras, gatos, etc. En una realización preferida de la presente invención, el mamífero es humano.

La administración “combinada con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” es la cantidad mínima de agente activo (por ejemplo, PRO1122, antagonista o agonista del mismo) que es necesaria para proporcionar un beneficio terapéutico a un mamífero. Por ejemplo, una “cantidad terapéuticamente efectiva” para un mamífero que padece o es propenso a padecer o para prevenirlo de padecer un trastorno cartilaginoso degenerativo es la cantidad que induce, mejora o en cualquier caso provoca una mejora de los síntomas patológicos, la progresión de la enfermedad, condiciones fisiológicas asociadas con o resistencia a sucumbir a un trastorno caracterizado principalmente por la destrucción de la matriz del cartílago.

Los “portadores”, tal y como se utiliza en la presente invención, incluyen portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero expuestos a los mismos en las dosis y concentraciones utilizadas. Frecuentemente, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada en el pH. Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diabodies; anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, Protein Engin. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticas, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un sitio único de unión a antígeno y un fragmento “Fc” residual, una nomenclatura que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de reticularse con el antígeno.

“Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDRs confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fv por la adición de una serie de residuos en el carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de invertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varias de éstas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, donde estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido ($V_H - V_L$). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Un anticuerpo "aislado" es el que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilidades de diagnóstico y terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

La palabra "marcador" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El "marcador" puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas que se engloban en la presente invención se incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, polivinilalcohol y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido PRO1122 o un anticuerpo para el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

Una "molécula pequeña" se define en la presente invención como que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

El término "modular" significa afectar (por ejemplo, regular por incremento, regular por disminución o, en cualquier caso, controlar) el nivel del mecanismo de señalización. Entre los procesos celulares bajo el control de la transducción de señal se incluyen, pero no se limitan a, la transcripción de genes específicos, funciones celulares normales, tales como metabolismo, proliferación, diferenciación, adhesión, apoptosis y supervivencia, así como procesos anormales, tales como la transformación, bloqueo de la diferenciación y metástasis.

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Polipéptido PRO1122 de longitud completa

La presente invención identifica y aísla secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como PRO1122. En particular, los Solicitantes han identificado y aislado ADNc que codifica los polipéptidos PRO 1031 (por ejemplo, UNQ516, IL-17B, SEC ID No: 1) y PRO1122 (por ejemplo, UNQ561, IL-17C, SEC ID No: 3), tal y como se describe con mayor detalle en los Ejemplos siguientes. Utilizando los programas informáticos de alineación de secuencias BLAST y FastA, los solicitantes hallaron que varias partes de los polipéptidos PRO1031 y PRO1122 que tienen identidad de secuencia con IL-17. Por consiguiente, actualmente se cree que los polipéptidos PRO1031 y PRO1122 descritos en la presente solicitud son miembros recientemente identificados de la familia de citoquinas y, de este modo, pueden estar implicados en la inflamación y/o la función del sistema inmune. El último es la materia de la presente invención.

Tal y como se ha presentado anteriormente, el término “PRO1122” se refiere a la secuencia nativa y las variantes, mientras que el término “UNQ561” se refiere a la secuencia de aminoácidos específica de la figura 3 (SEC ID No: 3) y/o las proteínas codificadas por el ADNc depositado en la American Type Culture Collection, bajo el número de Depósito 203552.

Tal y como se describe en los siguientes Ejemplos, se ha depositado el clon de ADNc designado en la presente invención como DNA62377-1381-1 con la ATCC. La secuencia de nucleótidos real del clon se puede determinar fácilmente por un experto en la materia mediante la secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos de rutina del sector. La secuencia de aminoácidos prevista se puede determinar a partir de la secuencia de aminoácidos utilizando técnicas de rutina. Para el polipéptido PRO1122 y el ácido nucleico codificante descrito en la presente invención, los Solicitantes han identificado lo que se cree que es el marco de lectura mejor identificable con la información de secuencias disponible en ese momento.

B. Variantes de PRO1122

Además del polipéptido PRO1122 de secuencia nativa de longitud completa descrito en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de PRO1122. Las variantes de PRO1122 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica PRO1122, o mediante la síntesis del polipéptido PRO1122 deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del polipéptido PRO1122, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la membrana.

Las variaciones en el PRO1122 de secuencia nativa de longitud completa o en varios dominios del polipéptido PRO1122 descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente USA 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido PRO1122 que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO1122 en comparación con el PRO1122 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido PRO1122. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del polipéptido PRO1122 con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizadas en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de forma sistemática y probando en las variantes resultantes la actividad (tal como en cualquiera de los ensayos *in vitro* descritos en los siguientes Ejemplos) mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

En la presente invención se proporcionan fragmentos de polipéptido PRO1122. Dichos fragmentos se pueden truncar en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa o de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO1122.

Los fragmentos de PRO1122 se pueden preparar mediante cualquiera del grupo de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de PRO1122 mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Además, otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores del extremo 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de polipéptido PRO1122 comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO1122 nativo mostrado en la figura 3 (SEC ID No: 3).

En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones de ejemplo en la Tabla 1, o tal y como se describen posteriormente en referencia a las clases de aminoácidos, se introducen y se criban los productos.

TABLA 1

	Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
5	Ala (A)	Val; leu; ile	Val
10	Arg (R)	Lys; gln; asn	Lys
	Asn (N)	Gln; his; lys; arg	Gln
	Asp (D)	Glu	Glu
15	Cys (C)	Ser	Ser
	Gln (Q)	Asn	Asn
	Glu (E)	Asp	Asp
20	Gly (G)	Pro; ala	Ala
	His (H)	Asn; gln; lys; arg	Arg
25	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
	Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
30	Lys (K)	Arg; gln; asn	Arg
	Met (M)	Leu; phe; ile	Leu
35	Phe (F)	Leu; val; ile, ala; tyr	Leu
	Pro (P)	Ala	Ala
	Ser (S)	Thr	Thr
40	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	tyr; phe	Tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
45	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

50 Las modificaciones sustanciales en la identidad funcional o inmunológica del polipéptido PRO1122 se llevan a cabo mediante la selección de las sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el conjunto de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 55 (1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr;
- 60 (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- 65 (6) aromática: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para fabricar el ADN variante que codifica PRO 1031 se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter *et al.*, Nucl. Acids. Res., 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids. Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells *et al.*, Gene, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

El análisis de aminoácido por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido de este grupo, ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

C. Modificaciones de PRO1122

Las modificaciones covalentes de polipéptidos PRO1122 están incluidas en el alcance de la presente invención tal y como se definen en las reivindicaciones. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un polipéptido PRO1122 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales de un polipéptido PRO1122. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular PRO1122 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO1122, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspártico, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO1122 incluido en el alcance de la presente invención, tal y como se define en las reivindicaciones, comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en el polipéptido PRO1122 de secuencia nativa y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido PRO1122 de secuencia nativa. Adicionalmente, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

La adición de sitios de glicosilación a los polipéptidos PRO1122 se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos de los mismos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina al polipéptido PRO1122 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO1122 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO1122 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido PRO1122 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259-306 (1981).

La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido PRO1122 se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación químicas son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et al.* *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge, *et al.* *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato del polipéptido se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura *et al.* *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de PRO1122 comprende la unión del polipéptido PRO1122 a uno del conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

Los polipéptidos PRO1122 también se puede modificar de manera que forman una moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido PRO1122, respectivamente, fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo. En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un polipéptido PRO1122 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo terminal amino o carboxilo del polipéptido PRO1122. La presencia de dichas formas epítipo etiquetadas de un polipéptido PRO1122 se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el polipéptido PRO1122 se purifique fácilmente mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido-Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin *et al.*, Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de α -rubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido PRO1122 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión podría ser a una región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido PRO1122 en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de USA No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

En otra realización adicional, los polipéptidos PRO1122 también se pueden modificar de manera que forman una molécula quimérica que comprende un polipéptido PRO1122 fusionado a una cremallera de leucinas. En la técnica se han descrito varios polipéptidos de cremalleras de leucinas. Véase, por ejemplo, Landschulz *et al.*, Science 240: 1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe *et al.*, FEBS Letters 344: 1991 (1994); Maniatis *et al.*, Nature 341: 24 (1989). Se cree que la utilización de una cremallera de leucinas fusionada a un polipéptido PRO1122 puede ser deseable para ayudar en la dimerización o trimerización de polipéptido PRO1122 soluble en solución. Los expertos en la materia entenderán que la cremallera de leucina se puede fusionar al extremo N- o C-terminal de la molécula PRO1122.

D. Preparación de PRO1122

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de PRO1122 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO1122. Naturalmente, se prevé que se pueden utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar polipéptidos PRO1122. Por ejemplo, la secuencia de PRO1122, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes de polipéptidos PRO1122 de forma separada y combinar utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir un polipéptido PRO1122 de longitud completa.

1. Aislamiento de ADN que codifica PRO1122

El ADN que codifica un polipéptido PRO1122 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO1122 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN que codifica PRO1122 humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica PRO1122 también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, procedimientos sintéticos automatizados, síntesis de oligonucleótidos).

Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para un polipéptido PRO1122 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar genes es utilizar la metodología de

PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una librería de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívocas para que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ^{32}P , biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la *astringencia moderada* y la *astringencia elevada*, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear a otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en las bases de datos públicas, tales como el Banco de Genes, u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen en la presente invención (por ejemplo, a través de la alineación de secuencias utilizando programas informáticos de software, tales como ALIGN, DNASTAR, BLAST, BLAST-2, INHERIT y ALIGN-2 que utiliza varios algoritmos para medir la homología).

El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores y procesar intermedios de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción de polipéptido PRO1122 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un técnico en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

Los procedimientos de transfección son conocidos por el técnico en la materia, por ejemplo, CaPO_4 y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento de calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas u otras células que contienen barreras de pared celular sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal y como describe Shaw *et al.*, Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transformaciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en la levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policondones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown *et al.*, Methods in enzymology, 185:527-537 (1990) y Manssur *et al.*, Nature, 336. 348-352 (1988).

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ácido nucleico (por ejemplo, ADN) en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* Ka12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa huésped para fermentaciones de producto de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente

a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vivo*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican PRO1122. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nature, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt *et al.* J. Bacterial., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Nelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilótropas se seleccionan del género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylophilic, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO1122 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, *Spodoptera high5*, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO. Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se estima que está dentro de la técnica.

3. Selección y utilización de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica el polipéptido deseado PRO1122 se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un experto en la materia.

El polipéptido PRO1122 se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el PRO1122 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o enterotoxinaII estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, líder de la invertasa de levadura, líder del factor alfa (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o líder de fosfatasa ácida, el líder de la *C. Albicans* glucoamilasa (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como líderes secretorios virales.

Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levaduras, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióti-

cos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

5 Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica PRO1122, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7:141 (1979); Tschemper
10 *et al.*, Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

15 Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica PRO1122 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por un conjunto de potenciales células huésped son conocidos. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, Nature, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel,
20 Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido PRO1122.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen
25 los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

30 Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657.

35 La transcripción de PRO1122 desde vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del polio, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica un polipéptido PRO1122 por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que
45 actúan en cis, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias de potenciador se conocen actualmente de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una
50 posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de PRO1122, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN's o ADN's eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica PRO1122.

60 En Gething *et al.*, Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de polipéptidos PRO1122 en cultivos de células recombinantes de vertebrados.

65 4. Detección de la amplificación/expresión de los genes

La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm

[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basadas en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN, cadenas dobles híbridadas de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la cadena doble está unida a una superficie, de manera que tras la formación de la cadena doble en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la cadena doble.

Alternativamente, la expresión génica se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y se puede preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido PRO1122 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN que codifica PRO1122 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

5. Purificación de polipéptido

Las formas de PRO1122 se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisados de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión de polipéptidos PRO1122 se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como un ciclo congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica, o agentes para lisar células.

Se puede desear purificar PRO1122 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefrosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo del polipéptido PRO1122. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteína y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el polipéptido PRO1122 concreto producido.

E. Utilizaciones para PRO1122

Las secuencias de nucleótidos (o sus complementarias) que codifican polipéptidos PRO1122 tienen varias aplicaciones en la disciplina de la biología molecular, incluyendo utilidades como sondas de hibridación, en el mapeo de cromosomas y genes y en la generación de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico que codifica PRO1122 también será útil para la preparación de polipéptidos PRO1122 mediante las técnicas recombinantes descritas en la presente invención.

La secuencia de nucleótidos DNA62377-1381-1 de longitud completa (SEC ID No: 4) o la secuencia de nucleótidos que codifica PRO1122 de secuencia nativa y longitud completa, o partes de las mismas, se pueden utilizar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el gen de PRO1122 de longitud completa o para aislar incluso otros genes (por ejemplo, aquellos que codifican variantes naturales de PRO1122 o el mismo de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de nucleótidos para PRO1122 descrita en la figura 4 (SEC ID No: 4). Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación se pueden derivar de la secuencia de nucleótidos DNA62377-1381-1 de la SEC ID No: 4 tal como se muestra en la figura 4 o de las secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de ADN que codifica PRO1122 de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen de PRO1122 utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación se pueden marcar con una serie de marcadores, incluyendo radionucleótidos, tales como ³²P o ³⁵S, o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de los sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen de PRO1122 de la presente invención se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar a qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen con mayor detalle en los siguientes Ejemplos.

Cualquier secuencia EST descrita en la presente solicitud (o fragmento de la misma) se puede utilizar de forma similar como sondas, utilizando los procedimientos descritos en la presente invención.

Entre otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de PRO1122 se incluyen oligonucleótidos antisentido o sentido que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de cadena única (ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm de PRO1122 diana (sentido) o ADN de PRO1122 (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido, según la presente invención, comprende un fragmento de la región codificante de ADN de PRO1122. Dicho fragmento comprende generalmente por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a

30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basado en una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen Cancer Res., 48:2659, 1988 y van der Krol *et al.*, BioTechniques 6:958, 1988.

5 La unión de oligonucleótidos sentido y antisentido a secuencias de ácidos nucleicos diana da lugar a la formación de cadenas dobles que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno de los diferentes medios, que incluyen la degradación aumentada de las cadenas dobles, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o mediante cualquier otro medio. De este modo, los oligonucleótidos antisentido se pueden utilizar para bloquear la expresión de proteínas PRO1122. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además
10 oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones a azúcares, tales como las descritas en WO 91/06629) y en los que dichas uniones a azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones a azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero mantienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

15 Entre otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido se incluyen aquellos nucleótidos que están unidos covalentemente a grupos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros grupos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácidos nucleicos diana, tal como poli-(L-lisina). Además, los agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos se pueden unir a oligonucleótidos sentido
20 o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido para la secuencia de nucleótidos diana.

Los oligonucleótidos sentido o antisentido se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante cualquier procedimiento de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, transfección de
25 ADN mediada por CaPO₄, electroporación, o mediante la utilización de vectores de transferencia de genes, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido antisentido o sentido se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, *in vivo* o *ex vivo*. Entre los vectores retrovirales adecuados se incluyen, pero no se limitan a, los derivados de retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de copia doble designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

Los oligonucleótidos sentido o antisentido también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión ligando, tal y como se describe en WO 91/04753. Entre las moléculas de unión ligando se incluyen, pero no se limitan a, receptores de la superficie
35 de las células, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie de las células. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión ligando para unirse a su correspondiente molécula o receptor, ni bloquea la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

40 Alternativamente, un oligonucleótido sentido o antisentido se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal y como se describe en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia preferiblemente en el interior de la célula mediante una lipasa endógena.

45 Las sondas también se pueden utilizar en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para la identificación de secuencias de PRO1122 estrechamente relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido PRO1122 también se pueden utilizar para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica el polipéptido PRO1122 y para el análisis genético de individuos
50 con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden mapear a un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de unión contra marcadores cromosómicos conocidos, y el cribado de hibridación con bibliotecas.

Cuando las secuencias codificantes para PRO1122 codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el polipéptido PRO1122 funciona como un receptor), el polipéptido PRO1122 se puede utilizar en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos procedimientos, se pueden identificar inhibidores de la interacción de unión receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión también se pueden utilizar para cribar inhibidores o agonistas de péptidos o moléculas pequeñas de la interacción de unión. Además, el receptor polipéptido PRO1122 se puede utilizar para aislar el ligando o ligando correlativos. Los ensayos de cribado se pueden diseñar para encontrar compuestos candidatos que imitan la actividad biológica de un PRO1122 nativo o un receptor para PRO1122. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribar con un alto rendimiento bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar pequeñas moléculas como fármacos candidatos. Entre las pequeñas moléculas contempladas se incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, incluyendo ensayos
65 de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido PRO1122 o cualquiera de sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales no humanos transgénicos o animales no humanos “knock out” que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal no humano transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual se introdujo en el animal o en un antecesor del animal en estado prenatal, por ejemplo, una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica el polipéptido PRO1122 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica PRO1122 según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica PRO1122. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, se marcarían células concretas para la incorporación del transgén de PRO1122 con potenciadores específicos de tejido. Se pueden utilizar animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica PRO1122 introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria, para examinar el efecto de la expresión aumentada de ADN que codifica PRO1122. Dichos animales se pueden utilizar como animales de prueba para reactivos pensados para conferir protección de, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. Según este aspecto de la invención, el tratamiento de un animal con el reactivo y la reducción de la incidencia de la condición patológica, en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial en la condición patológica.

Alternativamente, se pueden utilizar homólogos no humanos de PRO1122 para construir un animal “knock out” con PRO1122 que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica PRO1122 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica PRO1122 y el ADN genómico alterado que codifica PRO1122 introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica PRO1122 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica PRO1122 según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica PRO1122 se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madres embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992)]. A continuación, se inyectan las células seleccionadas en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152]. A continuación, se puede implantar un embrión quimérico en un animal criado hembra pseudoembarazada adecuado y el embrión se lleva a término para crear un animal “knock out”. La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y utilizar para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knock out se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido PRO 1122.

El ácido nucleico que codifica los polipéptidos PRO1122 también se pueden utilizar en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células para conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. La “terapia génica” incluye tanto la terapia génica convencional en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una vez o repetitiva de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Se pueden utilizar los ADNs y ARNs antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. También se ha observado que los oligonucleótidos antisentido cortos se pueden importar en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su captación limitada por la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos diéster cargados negativamente por grupos no cargados.

Existe una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped deseado. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen la utilización de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico, etc. Entre las técnicas de transferencia génica *in vivo* preferidas actualmente se incluyen la transfección con vectores virales (habitualmente retrovirales) y la transfección mediada por liposoma-proteínas de cubierta viral (Dzau *et al.*, *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácidos nucleicos con un agente que marca las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie de la célula o la célula diana, un ligando para un receptor en las células diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie de la célula asociada con endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, proteínas que dirigen la localización intracelular y el aumento de la vida media intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por receptor se describe en, por ejemplo, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica, véase Anderson *et al.*, *Science* 256, 808-813 (1992).

Los polipéptidos PRO1122 descritos en la presente invención también se pueden utilizar como marcadores del peso molecular para electroforesis de proteínas.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifica los polipéptidos PRO1122 o fragmentos de las mismas descritas en la presente invención son útiles para la identificación de cromosomas. En este aspecto, existe una necesidad actual para identificar nuevos marcadores de cromosomas, ya que actualmente hay disponibles relativamente pocos reactivos marcadores de cromosomas, en base a los datos reales de secuencias disponibles. Cada molécula de ácido nucleico de PRO1122 de la presente invención se puede utilizar como marcador de cromosomas.

Los polipéptidos PRO1122 y las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención también se pueden utilizar para la caracterización de tejidos, donde los polipéptidos PRO1122 de la presente invención se pueden expresar diferencialmente en un tejido en comparación con otro. Las moléculas de ácidos nucleicos de PRO1122 se utilizarán para generar sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

Los polipéptidos PRO1122 de la presente invención también que poseen actividad biológica en relación con la de IL-17 se pueden utilizar *in vivo* con fines terapéuticos e *in vitro*. Los expertos en la materia sabrán cómo utilizar los polipéptidos PRO1122 de la presente invención para dichos objetivos.

PRO1122 se puede utilizar en ensayos con los polipéptidos con los que tiene identidad para determinar las actividades relativas. Por consiguiente, los resultados se pueden aplicar.

La alineación de la secuencia de aminoácidos prevista de IL-17B (por ejemplo, UNQ516) (SEC ID No: 1) y IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3) con la secuencia conocida de IL-17 (SEC ID No: 11) muestra que ésta es una familia de secuencias relacionadas con una identidad de aminoácidos del 26-28% entre los tres miembros (figura 7). Los tres polipéptidos contienen una secuencia hidrofóbica en el extremo N-terminal que se espera que funcione como secuencia señal secretora de 18-20 aminoácidos, dando un rango de tamaño previsto para los miembros de esta familia de 155 a 197 aminoácidos (PM maduro de 17 a 20 kDa). La alineación de la figura 7 muestra varios aminoácidos conservados, incluyendo un residuo de triptófano y 5 cisteínas en el extremo C-terminal de la mitad de proteínas.

El ácido nucleico que codifica PRO1122 o fragmentos del mismo también se puede utilizar para localizaciones cromosómicas. Por ejemplo, la localización cromosómica de IL-17B (UNQ516 (SEC ID No: 1) e IL-17C (UNQ561 (SEC ID No: 3) se determinó utilizando cebadores Taqman y sondas diseñadas en las regiones 3' no traducidas de la IL-17B e IL-17C, se realizó mediante PCR con un panel Stanford Radiation Hybrid Panel G3. La IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) se mapeó en el cromosoma humano 5q32-34, mientras que IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3) se localizó en el cromosoma 16q24. El propio IL-17 humano se halló en el cromosoma 2q31. Rouvier *et al*, M Immunol. 150: 5445 (1993).

Con el aislamiento y la caracterización de los dos nuevos parientes de IL-17, los Solicitantes han establecido y expandido el papel potencial de esta familia de citoquinas que pueden jugar en las respuestas inmune proinflamatoria y otras respuestas. Los tres miembros de la familia, IL-17 (SEC ID No: 11), IL-17B (SEC ID No: 1) e IL-17C (SEC ID No: 3) están relacionados modestamente en la estructura primaria con aproximadamente un 27% de identidad global de aminoácidos incluyendo 5 residuos de cisteína conservados (figura 7). Los tres miembros de la familia comparten un conjunto de características - tienen una longitud de 150-200 residuos de aminoácidos, se secretan de las células a través de una secuencia señal de secreción hidrofóbica, y se expresan como homodímeros unidos a disulfuro que en algunos casos parecen estar glicosilados.

Aunque los miembros de la misma familia de genes se basan en la similitud de la secuencia de aminoácidos, las tres proteínas se expresan en tejidos diferentes y están dispersadas en el genoma. Se ha observado la expresión de IL-17 (SEC ID NO: 11) sólo en células T activadas, Fossiez *et al.*, J Exp. Med. 183: 2593 (1996), Yao *et al.*, J. Immunol. 155: 5483 (1995) [Yao-3], mientras que en la presente invención se demuestra que IL-17B (DNA59294 (SEC ID No: 2) se expresa en el páncreas, intestino delgado y estómago normales de un humano adulto (figura 8). Sin embargo, el patrón de expresión de IL-17C (DNA62377) (SEC ID No: 4) es mucho más limitado, ya que la expresión confirmada en otros tejidos no se ha descubierto aún.

Las caracterizaciones descritas en la presente invención demuestran que las actividades biológicas de IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) y IL17-C (UNQ561) (SEC ID No: 3) son considerablemente diferentes de las actividades establecidas para IL-17 (SEC ID No: 11). La IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) e IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3) no consiguen ninguna inducir la producción de IL-6 en fibroblastos de prepucio humano (Ejemplo 10) (Figura 9A). Esto contrasta con la notable inducción conocida para IL-17 (SEC ID No: 11). Yao *et al.*, Immunity 3:811 (1995) [Yao-1]. Yao *et al.*, J. immunol. 155: 5483 (1995) [Yao-3]. En cambio, IL-17B (SEC ID No: 1) e IL-17C (SEC ID NO: 3) inducen cada una la liberación de TNF- α de la línea celular monoclónica, THP-1, mientras que IL-17 tiene sólo un efecto muy pequeño (figura 9B). La liberación estimulada de TNF- α en células THP-1 por IL-17B (SEC ID No: 1) e IL-17C (SEC ID No: 3) es dependiente del tiempo y la concentración, (ejemplo 10) (figura 10), siendo IL-17B (SEC ID No: 1) aproximadamente 10 veces más potente que IL-17C (SEC ID No: 3) [EC₅₀ = 2,4 nM para IL-17B frente a 25 nM para IL-17C].

Los diferentes efectos biológicos de IL-17 (SEC ID No: 11) en comparación con IL-17B o C (SEC ID Nos: 1 y 3) sugiere que pueden actuar a través de un receptor de superficie celular diferente (o algunos componentes del receptor

que difieren) del receptor IL-17 conocido. Yao *et al.*, Cytokine 9:794 (1997) [Yao-3]. En un esfuerzo por examinar directamente la cuestión de la especificidad del receptor, los Solicitantes han demostrado que tanto IL-17B (SEC ID No: 1) como IL-17C (SEC ID No: 3) no consiguen unirse al ECD del receptor de IL-17 (SEC ID No: 16) (figura 11A) y tampoco consiguen competir por la unión de IL-17 (SEC ID No: 11) a su ECD del receptor (SEC ID No: 16) (figura 11B). IL-17B (SEC ID No: 1) y IL-17C (SEC ID No: 3) se unen a la superficie de células THP-1 cuando tienen actividad (figura 12). La interacción es específica por lo menos hasta el grado de que una proteína de fusión Fc de control no consigue unirse a estas células. Los resultados sugieren que podría haber un grupo de receptores que se unen y transducen la señal de la familia de citoquinas IL-17, un modelo receptor/ligando que se ha hallado para muchas familias de citoquinas y factores de crecimiento.

Las citoquinas nuevas descritas en la presente invención, PRO1031 (por ejemplo, 516) y PRO1122 (por ejemplo, UNQ561), difieren de IL-17 (SEC ID NO: 11) en sus patrones de expresión y actividades biológicas. La expresión diferencial acoplada con la falta de interacción con el receptor de IL-17 sugiere un papel extenso para la familia IL-17 en la respuesta inmune proinflamatoria.

F. Anticuerpos anti-PRO1122

La presente invención utiliza además anticuerpos anti-PRO1122. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos anti-PRO1122 utilizados en la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido PRO1122 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante para una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, pero no se limitan a hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes se pueden utilizar se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin una gran experimentación.

2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos anti-PRO1122 pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido PRO1122 o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o se utilizan células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, soportan un nivel de expresión elevado estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) páginas, 51-63].

A continuación, en el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se puede ensayar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un polipéptido PRO1122. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o

mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

5 Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar [Goding, *supra*]. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

10 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

15 Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente U.S.A. No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la presente invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede situar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de ningún modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias homólogas murinas [Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *supra*] o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina. Dicho polipéptido de no inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la presente invención, o se pueden sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

30 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

35 Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

40 3. Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos anti-PRO1122 utilizados en la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo destinatario) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del destinatario se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo destinatario ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

60 Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos se indican frecuentemente como residuos "importados", que se adquieren de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, Science, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la

práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner *et al.*, J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)]. De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece estrechamente a los observados en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reajuste de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes U.S.A. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, BioTechnology 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, Nature 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, Nature Biotechnology 14, 845-51, (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

4. Terapia de profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpos (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente descripción también se pueden utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente peptídico quimioterapéutico. Ver WO 81/01145) en un fármaco anticancerígeno activo. Ver, por ejemplo, WO 88/07378 y Patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento se incluyen, pero no se limitan a, glicosidasa, glucosa oxidasa, lisozima humana, glucuronidasa humana, alcalina fosfatasa útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arisulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticancerígeno 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas (por ejemplo, carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-atanitcarboxipeptidasas útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas divisoras de carbohidratos, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útil para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasas, tales como penicilin Vamidasa o penicilin G amidasa, útil para convertir fármacos derivados derivativos en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidas en la técnica como "abzimas", se pueden utilizar para convertir los profármacos de la presente invención en fármacos activos libres (ver, por ejemplo, Massey. Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal como se describen en la presente invención para la liberación de la abzima a una población de células tumorales.

Las encimas se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-PRO1122 mediante técnicas bien conocidas en el sector, tales como la utilización de agentes de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno del anticuerpo unido a por lo menos de una parte funcionalmente activa de una enzima se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature 312: 604-608 (1984)).

5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para un polipéptido PRO1031, el otro es para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína o receptor o subunidad del receptor de la superficie celular.

Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Millstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra,

CH2, y regiones CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

Según otro enfoque descrito en WO 96/27011, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte de la región de CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico a la cadena o cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeños (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando uniones químicas. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierten en Fab' -tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de un anticuerpo biespecífico totalmente humanizado $F(ab')_2$. Cada fragmento de Fab' se secretó de forma separada de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra tumores de mama humana dianas.

Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992), en los que los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diabody" descrito por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Ver Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tun *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes en una proteína "Pro" determinada de la presente invención. Alternativamente, un brazo de proteína anti-"PRO" se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptor de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa la proteína "PRO" particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos a células que expresan un polipéptido "PRO" particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a "PRO" y un brazo que se une a un agente citotóxico o un radionúcleo quelante, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido "PRO" y además se une al factor tisular (TF).

6. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto,

por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente U.S.A. No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/300373; EP 03089]. Se considera que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente U.S.A. No. 4.676.980.

7. Diseño de la función efectora

Se puede desear modificar el anticuerpo utilizado en la presente invención con respecto a la función efectora con el fin de aumentar la eficacia del anticuerpo. Por ejemplo, el residuo o residuos de cisteínas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, J. Exp. Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf *et al.* Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo se puede diseñar para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis complementaria y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989).

8. Inmunoconjugados

La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma, o una toxina de molécula pequeña), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados se ha descrito anteriormente. Entre las toxinas de proteínas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de mordica charantia, curcína, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, saporina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Entre las toxinas de moléculas pequeñas se incluyen, por ejemplo, caliqueamicinas, maitansinoides, palitoxina y CC1065. Hay un conjunto de radionúcleos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos son ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridiliditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoyl)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuesto de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionúcleos al anticuerpo. Ver WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcado de tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado no enlazado de la circulación utilizando un agente clarificador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúcleo).

9. Inmunoliposomas

Los anticuerpos descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las Patentes U.S. Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la Patente U.S.A. No. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal y como se describen en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) mediante la reacción de intercambio de enlaces disulfuro. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina). Véase Gabizon *et al.*, J. Nacional Cancer Inst., 81(19): 1484 (1989).

10. Composiciones farmacéuticas de anticuerpos

Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido PRO1122 identificado en la presente invención, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos anteriormente en la presente invención, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos en forma de composiciones farmacéuticas.

Si el polipéptido PRO1122 es intracelular y los anticuerpos completos se utilizan como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, las lipofecciones o liposomas se pueden utilizar también para liberar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, las moléculas de péptidos se pueden diseñar de manera que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad particular en tratamiento, preferiblemente aquéllas con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquinas, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo deseado.

Los principios activos también se pueden introducir en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización por interfase, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

Las formulaciones a utilizar en la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre algunos ejemplos de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol), poliláctidos (Patente U.S.A. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LU-PRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten la liberación de moléculas durante aproximadamente 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias razonables para la estabilización dependiendo de los mecanismos implicados. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización apropiada de aditivos, y el desarrollo de composiciones de matrices de polímero específicas.

G. Utilizaciones de anticuerpos anti-PRO1122

Los anticuerpos anti-PRO1122 de la presente invención tienen varias utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PRO1122 se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico para polipéptidos PRO1122, por ejemplo, detectando la expresión en células, tejidos específicos o suero. Se pueden utilizar varias técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la técnica, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directo o indirecto y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) páginas 147-158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico se pueden marcar con un grupo detectable. El grupo detectable debería ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser un radioisótopo, tal como ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como alcalina fosfatasa, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al grupo detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter *et al.*, Nature, 144: 945 (1962); David *et al.*, Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain *et al.*, J. Immunol. Meth., 40: 219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407 (1982).

Los anticuerpos anti-PRO1122 también son útiles para la purificación por afinidad de polipéptidos PRO1122 de un cultivo de células recombinantes o de origen natural. En este proceso, los anticuerpos contra un polipéptido PRO1122 se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando procedimientos

conocidos en la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el anticuerpo PRO1122 a purificar, y posteriormente se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra a excepción del polipéptido PRO1122, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el polipéptido PRO1122 del anticuerpo.

H. Antagonistas/agonistas de PRO1122

La descripción comprende procedimientos de cribado de compuestos para identificar aquellos que mimetizan el polipéptido PRO1122 (agonistas) o previenen el efecto del polipéptido PRO1122 (antagonistas). Los ensayos de cribado para los fármacos candidatos se diseñan para identificar compuestos que se unen o complejan con los polipéptidos 1122 codificados por los genes identificados en la presente invención, o que en cualquier caso, interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de un cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de molécula pequeña.

Los ensayos se pueden realizar en una serie de formatos, incluyendo ensayos de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos, y ensayos basados en células, que están bien caracterizadas en la técnica. Por ejemplo, para cribar antagonistas y/o agonistas de señalización de PRO1122, la mezcla de ensayo se incuba en condiciones mediante las cuales, pero por la presencia del agente farmacológico candidato, PRO1122 induce la liberación TNF- α de células THP-1 con una actividad de referencia. Alternativamente, la actividad ensayada puede ser la liberación de óxido nítrico (NO) y proteoglicanos de cartílagos articulares tratados con IL17 y/o IL1 α .

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido PRO1122 codificado por el gen identificado en la presente invención o el fármaco candidato se inmovilizan en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente se realiza generalmente mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido PRO1122 y secado. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido PRO1122 a inmovilizar, para anclarlo a la superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, que se puede marcar mediante un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se extraen los componentes no reaccionados, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados a la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que tuvo lugar la formación del complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la formación de complejo, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interacciona con, pero no sin unirse, a un polipéptido PRO1122 concreto codificado por un gen identificado en la presente invención, su interacción con esa polipéptido se puede ensayar mediante procedimientos conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, coimmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorizar mediante la utilización de sistemas genéticos basados en levaduras descritos por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991) tal como se describe por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno actuando como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro actúa como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en las levaduras descrito en las publicaciones anteriores (referido generalmente como "el sistema de dos híbridos") saca ventaja de esta propiedad y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de la interacción de proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromatogénico para β -galactosidasa. En Clontech se encuentra disponible comercialmente un equipo completo (MATCHMAKERTM) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Este sistema también se puede extender para mapear dominios de proteínas implicados en las interacciones de proteínas específicas así como para precisar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido PRO1122 identificado en la presente invención y otros componentes intra o extracelulares, se pueden ensayar de la siguiente manera: se prepara habitualmente una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para utilizar como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal como se ha descrito anteriormente en la presente invención. La formación de un complejo en

la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

Los antagonistas se pueden detectar mediante la combinación del polipéptido PRO1122 y un antagonista potencial con los receptores de polipéptido PRO1122 unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido PRO1122 se puede marcar, por ejemplo, mediante radiactividad, de manera que el número de moléculas de polipéptidos PRO1122 unidas al receptor se puede utilizar para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor se puede identificar mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, "panning" de ligando y clasificación de FACS. Coligan *et al.* Current Protocols in Immun., 1(2): Capítulo 5 (1991). Preferiblemente, la clonación de la expresión se utiliza cuando el ARN poliadenilado se prepara a partir de una célula sensible al polipéptido PRO1122 y se divide en grupos una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO1122. Las células transfectadas que se desarrollan sobre portamuestras de vidrio se exponen a polipéptido PRO1122 marcado. El polipéptido PRO1122 se puede marcar mediante una variedad de medios que incluyen la yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Tras la fijación e incubación, los portamuestras se someten a análisis autoradiográfico. Los grupos positivos se identifican y los sub-grupos se preparan y se retransfectan utilizando un proceso de subagrupación y recibiendo interactivos, obteniendo finalmente un único clon que codifica el receptor putativo.

Como enfoque alternativo para la identificación del receptor, el polipéptido PRO1122 marcado se puede unir por fotoafinidad con la membrana celular o preparaciones de extractos que expresan la molécula receptora. El material reticulado se resuelve mediante PAGE y se expone a la película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor se puede escindir, dividir en fragmentos de péptidos, y someter a la microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamíferos o una preparación de membrana que expresa el receptor se incubarían con polipéptido PRO1122 marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría eliminar la capacidad del compuesto para aumentar o bloquear esta interacción.

Más ejemplos específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con polipéptido PRO1122, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos y las versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido PRO1122 que reconoce el receptor pero no transmite el efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido PRO1122.

Otro potencial antagonista de polipéptido PRO1122 es una construcción de ADN o ARN antisentido preparada utilizando tecnología antisentido, cuando, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN antisentido actúa para bloquear directamente la traducción del ARNm mediante la hibridación a ARNm marcado y evitando la traducción en la proteína. La tecnología antisentido se puede utilizar para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o ADN o ARN antisentido, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia del polinucleótido, que codifica los polipéptidos PRO1122 maduros de la presente invención, se utiliza para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice - véase Lee *et al.*, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science, 241: 456 (1988); Dervan *et al.*, Science, 251: 1360 (1991)), evitando así la transcripción y la producción del polipéptido PRO1122. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida al ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido PRO1122 (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también se pueden liberar a las células, de manera que el ARN o ADN antisentido se pueden expresar *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido PRO1122. Cuando se utiliza ADN antisentido, se prefieren oligodesoxiribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Entre los antagonistas potenciales se incluyen pequeñas moléculas que se unen al sitio activo, el sitio de unión al receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de unión pertinente del polipéptido PRO1122, bloqueando de esta manera la actividad biológica normal del polipéptido PRO1122. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, preferiblemente péptidos solubles y compuestos orgánicos o inorgánicos no péptídicos sintéticos.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la división específica de ARN. Las ribozimas actúan mediante la hibridación específica de secuencia al ARN diana complementario, seguido de la división endonucleolítica. Los sitios de división específica de la ribozima en un ARN potencial diana se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994) y publicación de PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en la formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción debería ser de cadena única y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de las bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que induce la formación de la triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases Hoogsteen, que generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una cadena de una cadena doble. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación de PCT No. WO 97/33551, *supra*.

I. Utilizaciones diagnósticas

Otra utilización de los compuestos descritos de la presente invención (por ejemplo, variantes PRO1122 y anticuerpos anti-PRO1122) descritos en la presente invención es ayudar a diagnosticar si un trastorno está dirigido, en cierto grado, por la señalización modulada por PRO1122.

Se puede llevar a cabo un ensayo de diagnóstico para determinar si un trastorno concreto (por ejemplo, trastorno cartilaginoso degenerativo) está dirigido por la señalización de PRO1122, utilizando las siguientes etapas: (1) cultivar células o tejidos de prueba que expresan PRO1122; (2) administrar un compuesto que puede inhibir la señalización modulada por PRO1122; y (3) medir los efectos fenotípicos mediados por PRO1122 en las células de prueba. Las etapas se pueden llevar a cabo utilizando técnicas estándar teniendo en cuenta la presente invención. Por ejemplo, las técnicas estándar se pueden utilizar para aislar células o tejidos y el cultivo *in vivo*.

Los compuestos de diferente grado de selectividad son útiles para diagnosticar el papel de PRO1122. Por ejemplo, se pueden utilizar compuestos con PRO112, además de otra forma de molécula adaptadora, como compuesto de prueba inicial para determinar si una de las diferentes moléculas adaptadoras dirige el trastorno. A continuación, los compuestos selectivos se pueden utilizar para eliminar adicionalmente el posible papel de otras proteínas adaptadoras en la conducción del trastorno. Los compuestos de prueba deberían ser más potentes en la inhibición de la actividad de señalización intracelular que en la acción de un efecto citotóxico (por ejemplo, una IC_{50}/LD_{50} superior a uno). La IC_{50} y LD_{50} se pueden medir mediante técnicas estándar, tales como un ensayo MTT o mediante la medición de cantidad de LDH liberada. El grado de IC_{50}/LD_{50} de un compuesto debería tenerse en cuenta en la evaluación del ensayo diagnóstico. Generalmente, cuando mayor es la proporción más relativa es la información. Los controles apropiados que tienen en cuenta el posible efecto citotóxico de un compuesto, tal como el tratamiento de las células no asociadas con un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, células de control) con un compuesto de prueba, también se pueden utilizar como parte del ensayo diagnóstico. Los procedimientos de diagnóstico de la presente invención implican el cribado de agentes que modulan los efectos de PRO1122 sobre los trastornos cartilaginosos degenerativos. Entre los ejemplos de técnicas de detección se incluyen el marcado radioactivo y la inmunoprecipitación (U.S.A. 5.385.915).

Por ejemplo, se pueden utilizar anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, para detectar cualitativa y cuantitativamente la expresión de proteínas codificadas por los genes relacionados con la enfermedad ("productos génicos marcadores"). El anticuerpo preferiblemente está equipado con un marcador detectable, por ejemplo fluorescente, y la unión se puede monitorizar mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en el sector.

La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos génicos marcadores se puede realizar, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Para este objetivo, se extrae una muestra histológica del paciente y se aplica un anticuerpo marcado a la misma, preferiblemente mediante el recubrimiento con anticuerpo de la muestra biológica. Este procedimiento también permite la determinación de la distribución del producto génico marcador en el tejido examinado. Será evidente para los expertos en la materia que hay disponibles una amplia variedad de procedimientos histológicos fácilmente disponibles para la detección *in situ*.

J. Composiciones farmacéuticas

El PRO1122 o antagonistas del mismo (por ejemplo, anticuerpos), así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos anteriormente en la presente invención se pueden utilizar como agente terapéuticos. Dichos agentes terapéuticos se formulan según los procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, mediante los cuales el PRO1122, antagonista o agonista del mismo se combina en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

En el caso de anticuerpos antagonistas de PRO1122, si la proteína codificada por el gen amplificado es intracelular y todos los anticuerpos se utilizan como inhibidores, se prefieren anticuerpos internalizantes. Sin embargo, también se pueden utilizar lipofecciones o liposomas para liberar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas péptido que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia de proteínas diana. Dichos polipéptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir mediante tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893 [1993]).

Las formulaciones terapéuticas se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del principio activo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las

dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta a tratar, preferiblemente aquéllos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citoquina o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo deseado.

Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tienen un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica.

Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen políesteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente U.S.A. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y y etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación controlada se ha realizado satisfactoriamente con la hormona del crecimiento humano (rhGH), interferón- (rhIFN-), interleuquina-2, y MN rgp 120. Jonson *et al.*, Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora *et al.*, Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere Systems", en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell y Newman, eds, (Plenum Press: Nueva York, 1995), páginas 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y Patente U.S.A. No. 5.654.010.

Las formulaciones de liberación controlada de estas proteínas se pueden desarrollar utilizando polímero de ácido poli-láctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplio rango de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, se pueden aclarar rápidamente en el interior del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar de meses a años dependiendo de su peso molecular y la composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), M. Chasin y R. Langer (Eds), páginas 1-41.

Mientras polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se desnaturalizan o agregan como resultado de la exposición a una humedad de 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear varias estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización de aditivos apropiados, y el desarrollo de composiciones de matrices de polímero específicas.

K. Procedimientos de tratamiento

Se considera que los compuestos de la presente invención se pueden utilizar para tratar varias condiciones, incluyendo las caracterizadas por la sobreexpresión y/o activación de los genes asociados a las enfermedades identificados en la presente invención. La presente invención proporciona los usos relacionados para los polipéptidos PRO1122 y

antagonistas, así como antagonistas para su uso en dichos procedimientos, ambos tal y como se definen en las reivindicaciones. Entre los ejemplos de condiciones o trastornos a tratar con dichos anticuerpos y otros compuestos que incluyen, pero no se limitan a, moléculas antisentido, etc., se incluyen trastornos inflamatorios e inmunogénicos, especialmente los caracterizados por la ruptura de la matriz del cartílago, tales como la artritis (por ejemplo, osteoartritis, artritis psoriática, artritis reumatoide) u otras enfermedades inflamatorias degenerativas.

Los agentes activos de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos, se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intraocular, intralesional, oral, tópica o por inhalación o a través de la liberación controlada.

Otras pautas terapéuticas se pueden combinar con la administración del PRO1122, o antagonistas, por ejemplo, anticuerpos de la presente invención.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación de un agente activo (por ejemplo, un anticuerpo) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal y como se han definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente se administra con objetivos preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente y la discreción del médico de asistencia. El agente se administra de forma adecuada al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

Las dosificaciones y concentración deseada del fármaco de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo de la utilización particular prevista. La determinación de la dosificación o la ruta de administración apropiadas están dentro del conocimiento de un técnico en la materia. Los experimentos con animales proporcionan unas directrices fiables para la determinación de las dosis eficaces para terapia humana. El escalado entre especies de dosis eficaces se puede llevar a cabo siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds., Pergamon Press, Nueva York, 1989, páginas 42-46.

Cuando se utiliza la administración *in vivo* de un polipéptido PRO1122 o agonista o antagonista del mismo, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente 1 µg/kg/día hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, dependiendo de la ruta de administración. En la literatura se proporciona una guía relacionada con las dosis concretas y los procedimientos de liberación; ver, por ejemplo, las Patentes U.S.A. Nos. 4.657.760; 5.206.344 o 5.225.212. Está dentro del alcance de la presente invención que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la liberación de una manera diferente a la de otro órgano o tejido. Además, las dosis se pueden administrar mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Para administraciones repetitivas durante varios días o más largas, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otras pautas de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

L. Artículos de fabricación

Se puede proporcionar un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un marcador. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es habitualmente un polipéptido PRO1122, antagonista o agonista del mismo. El marcador en el recipiente o asociado con el mismo indica que la composición se utiliza para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Pueden incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con objetivos ilustrativos, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

Ejemplos

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. El origen de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo del documento, por los números de acceso de la ATCC pertenece a la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

Ejemplo 1 base

Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO1031 humano

5 Se utilizaron secuencias del dominio extracelular (ECD) (incluyendo la señal de secreción, si existe) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos de proteínas pública Swiss-Prot para buscar bases de datos de etiquetas de secuencias expresadas (EST). Las bases de datos de EST incluían bases de datos públicas de EST (por ejemplo, Banco de Genes, Merck/Wash U.) y una base de datos de ADN de EST privada (LIFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST-
10 2 (Altshul *et al.* Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)) como comparación de las secuencias de proteínas de ECD con una traducción de 6 marcos de la secuencia de EST. Aquellas comparaciones que daban lugar a un resultado BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o superior que no codificaba proteínas conocidas se agruparon y ensamblaron en las secuencias de ADN de consenso con el programa “phrap” (Phil Green, Universidad de Washington, Seattle, Washington).

15 Un fragmento de secuencia virtual inicial (ensamblaje de consenso) se ensambló en relación a otras secuencias de EST utilizando phrap. La secuencia de ADN de consenso inicial se extendió utilizando ciclos repetidos de BLAST y phrap para extender la secuencia de consenso tanto como sea posible utilizando los orígenes de secuencias EST descritas anteriormente. Los resultados de este ensamblaje se muestran en la figura 5 (SEC ID No: 5), también referido
20 como DNA47332.

Se examinó adicionalmente una secuencia que comprende el ensamblaje de consenso W74558 (clon 344649) (SEC ID No: 6). La secuencia se obtuvo del consorcio IMAGE y se analizó. Lennon *et al.*, Genomics 33:151 (1996). La secuenciación de ADN produjo la secuencia de ADN de longitud completa para PRO1031 [designado en la presente invención como DNA59294-1381] (SEC ID No: 2) y la secuencia de proteínas derivada de PRO1031 (UNQ516) (SEC ID No: 1).

La secuencia de nucleótidos completa de DNA59294-1381 se muestra en la figura 2 (SEC ID No: 2). El clon DNA59294-1381 contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación traduccional aparente en las
30 posiciones de nucleótidos 42-44 y extremo en el codón de finalización en las posiciones de nucleótidos 582-584 (figura 2) (SEC ID No: 2). El precursor del polipéptido predicho tiene 180 aminoácidos de longitud (figura 1) (SEC ID No: 1). La proteína PRO1031 (UNQ5.16) de longitud completa mostrada en la figura 2 (SEC ID No: 1) tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 20437 y un pI de aproximadamente 9,58. El clon DNA59294-1381 (SEC ID No: 2) se ha depositado con la ATCC y se le ha asignado el número de depósito 209866. En el caso de cualquier
35 irregularidad o error en la secuenciación con las secuencias proporcionadas en la presente invención, se entiende que los clones depositados contienen la secuencia correcta para DNA59624 (SEC ID No: 2). Además, las secuencias proporcionadas en la presente invención son el resultado de técnicas de secuenciación conocidas.

El análisis de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO1031 de longitud completa (UNQ516) (SEC ID No: 1) sugiere que es una citoquina nueva.

El análisis adicional de la secuencia de aminoácidos de SEC ID No: 2 revela que el péptido señal putativo está en aproximadamente los aminoácidos 1-20 de SEC ID No: 2. Un sitio de N-glicosilación están en aproximadamente los aminoácidos 75-78 de SEC ID No: 2. Una región que tiene una identidad en la secuencia con IL-17 está en
45 aproximadamente los aminoácidos 96-180. Los correspondientes nucleótidos se pueden determinar de forma rutinaria dadas las secuencias proporcionadas en la presente invención.

Ejemplo 1

Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO1122 humano

Se buscó una base de datos de ADN de etiquetas de secuencias expresadas (EST) (LIFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) y se identificó una EST. La EST fue Incyte 1347533 (SEC ID No: 7), también llamada DNA49665. En base a DNA49665 (SEC ID No: 7), se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar mediante PCR
55 una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para utilizar como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa para el PRO1122 [por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

60 Los cebadores de PCR directos e inversos varían generalmente de 20 a 30 nucleótidos y se diseñan habitualmente para obtener un producto de PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de las sondas tienen habitualmente de 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia de consenso es mayor que aproximadamente de 1-1,5 kpb. Con el fin de cribar varias bibliotecas para un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante amplificación por PCR, como por Ausubel *et al.*
65 Current Protocols in Molecular Biology, con la pareja de cebadores de PCR. A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar clones que codifican el gen de interés utilizando el oligonucleótido de sonda y una de las parejas de cebadores.

ES 2 292 242 T3

Se sintetizaron cebadores para PCR (directo, inverso, de hibridación):

Cebador directo para PCR: 5'-ATCCACAGAAGCTGGCCTTCGCCG-3' (SEC ID No: 8)

Cebador inverso para PCR: 5'-GGGACGTGGATGAACTCGGTGTGG-3' (SEC ID No: 9)

Sonda de hibridación: 5'-TATCCACAGAAGCTGGCCTTCGCCGAGT GCCTGTGCAGAG-3' (SEC ID No: 10)

Con el fin de cribar diversas bibliotecas para una fuente de un clon de longitud completa, se cribó ADN de las bibliotecas mediante amplificación por PCR con la pareja de cebadores de PCR identificadas anteriormente. A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar clones que codifican el gen de PRO1122 utilizando el oligonucleótido de sonda y una de las parejas de cebadores.

El ARN para la construcción de las bibliotecas de ADNc se aisló de tejido de riñón fetal humano. Se construyeron bibliotecas de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc utilizando procedimientos estándar que utilizan reactivos comercialmente disponibles, tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligo dT que contenía un sitio NotI, se unió con adaptadores de SalI con hemiquinasa romos, se dividió con NotI, se calculó el tamaño mediante electroforesis en gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SfiI; véase, Colmes *et al.*, Science 235: 1278-1280 (1991)) en los sitios XhoI y NotI únicos.

La secuenciación de ADN de los clones aislados tal y como se ha descrito anteriormente produjo la secuencia de ADN de longitud completa para PRO1122 [designada en la presente invención como DNA62377-1381-1] (SEC ID No: 4) y la secuencia PRO122 de la proteína derivada (UNQ561) (SEC ID No: 3).

La secuencia de nucleótidos completa de DNA62377-1381-1 (SEC ID No: 4) se muestra en las figuras 4A-4B (SEC ID No: 4). El clon DNA62377-1381-1 (SEC ID No: 4) contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación traduccional aparente en las posiciones de nucleótidos 50-52 y extremo en el codón de finalización en las posiciones de nucleótidos 641-643 de SEC ID No: 4 (figuras 4A-4B). El precursor del polipéptido predicho tiene 197 aminoácidos de longitud (figura 3) (SEC ID No: 3). La proteína PRO1122 de longitud completa mostrada en la figura 3 (UNQ561) (SEC ID No: 3) tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 21765 daltons y un pI de aproximadamente 8,53. El clon DNA62377-1381-1 se ha depositado con la ATCC el 22 de diciembre de 1998 y se le ha asignado el número de depósito 203552. Se entiende que en el caso de cualquier irregularidad o error en la secuenciación con las secuencias proporcionadas en la presente invención, la secuencia correcta es la secuencia depositada. Además, todas las secuencias proporcionadas en la presente invención son el resultado de técnicas de secuenciación conocidas.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de PRO1122 de longitud completa aislado (UNQ561) sugiere que posee una similitud con IL-17, indicando de este modo que PRO1122 (UNQ561) puede ser una citoquina nueva. La figura 3 (SEC ID No: 3) también muestra las localizaciones aproximadas del péptido señal, patrón de la cremallera de leucinas, y una región que tiene identidad de secuencia con IL-17. Los nucleótidos correspondientes se pueden determinar de forma rutinaria, por ejemplo, haciendo referencia a las figuras 4A-4B.

Ejemplo 2

Utilización de ADN que codifica PRO1122 como sonda de hibridación

El siguiente procedimiento describe la utilización de una secuencia de nucleótidos que codifica PRO1122 como sonda de hibridación.

Se utiliza ADN que comprende la secuencia codificante PRO1122 de longitud completa (tal como se muestra en la figura 4, SEC ID No: 4) o un fragmento de la misma como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de PRO1122 en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano).

La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de astringencia elevada. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada del polipéptido PRO1122 a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad en la secuencia deseada con el ADN que codifica el polipéptido PRO1122 de secuencia nativa de longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en el sector.

Ejemplo 3

Expresión de polipéptidos PRO1122 en E.coli

- 5 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de polipéptidos PRO1122 mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica PRO1122 de longitud completa o un fragmento o una variante del mismo se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las
10 enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción del vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar *et.al.*, Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se defosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente
15 a un antibiótico, un promotor *trp*, una secuencia líder de polihis (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia polihis, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante de PRO1122, el finalizador transcripcional lambda, y un gen *argU*.

A continuación, la mezcla de unión se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los
20 procedimientos descritos en Sambrook *et. al.*, *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y, a continuación, se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plásmido se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

Los clones seleccionados se pueden desarrollar durante toda la noche en un medio de cultivo líquido tal como el
25 caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de la expresión se activa.

Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación.
30 El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y el polipéptido PRO1122 solubilizado se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte del polipéptido.

Ejemplo 4

35 *Expresión de polipéptidos PRO1122 en células de mamíferos*

Este ejemplo ilustra la preparación de formas glicosiladas de polipéptidos PRO1122 mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

El vector pRK5 (véase EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN que codifica PRO1122 está ligado en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN que codifica PRO1122 utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en
40 Sambrook *et. al.*, *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-PRO1122.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se desarrollan para unirse en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10
50 μg de ADN de pRK5-PRO1122 se mezcla con 1 μg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmapaya *et. al.*, Cell, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 μl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de CaCl_2 . A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 μl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO_4 , y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio nuevo
55 y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -cisteína y 200 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S - metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de giro y se carga en un gel
60 SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido PRO1122. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, se puede introducir ADN que codifica PRO1122 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Sompariyac *et. al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un matraz centrifugador y se añaden 700 μg de ADN de pRK5-PRO1122. En primer lugar, las células se concentran en el matraz centrifugador mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado en el residuo de células durante cuatro horas. Las células

ES 2 292 242 T3

se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el matraz centrifugador que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 μ g/ml de insulina bovina y 0,1 μ g/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los debris. A continuación, la muestra que contiene el polipéptido PRO1122 expresado se puede concentrar y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, el polipéptido PRO1122 puede expresarse en células CHO. El vector pRK5-PRO1122 puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio remplazarse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como la ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido PRO1122, el medio de cultivo puede remplazarse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio acondicionado. A continuación, el medio que contiene el polipéptido PRO1122 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

El polipéptido PRO1122 etiquetado con epítipo puede expresarse también en células CHO huésped. El ADN que codifica PRO1122 puede subclonarse fuera del vector pRK5. La inserción del subclón puede experimentar PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta de epítipo concreta, tal como una etiqueta de poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. La inserción de ADN que codifica PRO1122 etiquetado con poli-his puede subclonarse a continuación en un vector conductor SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal y como se ha descrito anteriormente) con el vector conductor SV40. El marcaje puede realizarse, tal y como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el polipéptido PRO1122 etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelante-Ni²⁺.

Ejemplo 5

Expresión de polipéptido PRO1122 en levadura

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de polipéptidos PRO1122 en levadura.

En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de polipéptido PRO1122 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica el polipéptido PRO1122 de interés, un péptido señal seleccionado y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular del polipéptido PRO1122. Para la secreción, el ADN que codifica el polipéptido PRO1122 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, la secuencia señal/líder secretora del factor alfa de levadura, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión del polipéptido PRO1122.

Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

El polipéptido PRO1122 recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación mediante la centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene el polipéptido PRO1122 puede purificarse adicionalmente utilizando resinas concretas de cromatografía en columna.

Ejemplo 6

Expresión de polipéptidos PRO1122 en células de insecto infectadas de Baculovirus

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de polipéptidos PRO1122 en células de insecto infectadas de Baculovirus.

El ADN que codifica PRO1122 se fusiona en dirección 5' a un epítipo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichas etiquetas de epítipo incluyen etiquetas de poli-his y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, el ADN que codifica PRO1122 o la parte deseada del ADN que codifica PRO1122 (tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con aquellas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se

recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como describe en O'Reilley *et. al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

A continuación, el polipéptido PRO1122 etiquetado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni^{2+} -quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert *et. al.*, Nature, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl_2 ; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 a 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonican dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se aclaran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de $0,45\ \mu\text{m}$. Se prepara una columna de agarosa Ni^{2+} -NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a $0,5\ \text{mL}$ por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A_{280} con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato; 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye las proteínas unidas no específicamente. Después de alcanzar la línea base a A_{280} de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un mL y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni^{2+} -NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen polipéptido PRO1122 etiquetado con His₁₀ eluido se agrupan y se dializan contra el tampón de carga. Alternativamente, la purificación del polipéptido PRO1122 etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

Ejemplo 7

Preparación de anticuerpos que se unen a polipéptidos PRO1122

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a polipéptidos PRO1122.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en el sector y están descritas, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen polipéptido PRO1122 purificado, proteínas de fusión que contienen un polipéptido PRO1122, y células que expresan polipéptido PRO1122 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse según el técnico en la materia sin una gran experimentación.

Los ratones, tal como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de PRO1122 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se estimulan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante varias semanas, los ratones también se pueden estimular con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-polipéptido PRO1122.

Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales "positivos" para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de polipéptido PRO1122. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y las células del bazo se recogen. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA para la reactividad contra polipéptido PRO1122. La determinación de células de hibridomas "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra un polipéptido PRO1122 está dentro de la técnica.

Las células de hibridomas positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones singéneos Balb/c para producir ascitis que contienen anticuerpos monoclonales anti-polipéptido PRO1122. Alternativamente, las células de hibridomas pueden desarrollarse en matraces de cultivos de tejidos o en botellas en rodillo. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los ascitos se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

Ejemplo 8

Expresión de ARN

5 Las manchas multitejido que contienen poliA+ ARN (2 µg por banda) de varios tejidos humanos se adquirieron de Clontech (Palo Alto, CA). Se utilizaron regiones de codificación completa de IL-17B humana (LINQ516) (700 pb) (SEC ID No: 17) e IL-17C (UNQ561) (1,1 kpb) (SEC ID No: 18) como sondas de hibridación. Las sondas de ADN se marcaron con [α -³²P]-dCTP mediante gránulos marcadores de ADN de "priming" aleatorio (Pharmacia Biotech). La hibridación se realizó utilizando Expresshyb (Clontech) que contenía las sondas radiomarcadas a 68°C durante 1 hora. A continuación, las manchas se lavaron con 2X SSC/solución de SDS al 0,05% a temperatura ambiente durante 40 minutos, seguido de lavados en 0,1 X SSC/solución de SDS al 0,05% a 55°C durante 40 minutos con un cambio de solución nueva. Las manchas se exponen en un fosforimager y la imagen resultante se indica en la presente invención como la figura 8.

15 Para IL-17B (SEC ID No: 1), se halló un transcrito de ARNm de 800 pb en el páncreas, intestino delgado y estómago de tejidos de humano adulto: se detectó una banda más débil en los testículos. (figura 8). Se examinó la expresión de IL-17C (SEC ID No: 2) en el mismo grupo de tejidos de humano adulto, pero no se observaron señales detectables.

Ejemplo 9

Generación de proteínas de fusión Fc/His

25 Las secuencias codificantes de IL17B (SEC ID No: 17) e IL17C (SEC ID No: 18) se amplificaron por PCR y se subclonaron en los sitios EcoRI y SmaI de pBPH.His.c para generar una etiqueta GHHHHHHHHH C-terminal (SEC ID No: 19) o los sitios EcoRI y Stu de pBPH.IgG para generar una fusión C-terminal con la región Fc de IgG1 humana. Los vectores pBPH.His.c y pBPH.IgG son derivados del vector de expresión de baculovirus pVL1393 (Pharmingen). Se construyó una proteína de Fc de control o con etiqueta his de forma similar a la unión C-terminal de la proteína asociada a la pancreatitis (175 aminoácidos) a la parte Fc de la IgG1 humana o etiqueta his8.

30 Las proteínas de fusión se expresaron en células H5 utilizando el procedimiento recomendado por el fabricante (Invitrogen). Bevemente, las construcciones de ADN se cotransfectaron con ADN de Baculovirus BaculoGold (Pharmingen) en una proporción 7:1 en células Sf9 adherentes. Las células se incubaron a 28°C durante 4 días y se recogió el sobrenadante. El sobrenadante de transfección se amplificó y se sometió a purificación de afinidad mediante gránulos de proteína A-sefarosa (Pharmacia) para las proteínas de fusión Fc o gránulos de Ni-NTA agarosa (QIAGEN) para proteínas etiquetada con His.

35 Para examinar la expresión de las proteínas, se realizó un análisis por SDS-PAGE sobre las proteínas recombinantes purificadas por afinidad en condiciones reductoras y no reductoras, seguido de tinción de plata.

Ejemplo 10

Inducción de la liberación de IL-6 y TNF- α

45 Utilizando el procedimiento descrito en Yao *et al.*, J. Immunol. 155: 5483 (1995) (Yao-2) para la liberación de IL-6 (SEC ID No: 14), se cultivaron células de fibroblastos de prepucio humano (ATCC CRL-2091) en medio MEM (FBS al 10%) con la citoquina de prueba. Después de la incubación durante 18 horas a 37°C y CO₂ al 5%, se ensayaron los medios condicionados para IL-6 utilizando un kit de ELISA (R&D Systems). Para la secreción de TNF- α , se cultivaron células THP-1 monocíticas de leucemia humana en medio RPMI (FBS al 10%) con citoquina de prueba. Después de la incubación durante 18 horas a 37°C y CO₂ al 5%, se cuantificó el TNF- α en los medios condicionados (SEC ID No: 20) utilizando un kit de ensayo ELISA (R&D Systems).

55 Las células de fibroblasto de prepucio humano (ATCC) se cultivaron por separado en medio MEM (FBS al 10%) en presencia de IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) e IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3). Después de la incubación durante 18 horas a 37°C y CO₂ al 5%, se ensayaron los medios condicionados para IL-6 (SEC ID No: 14) utilizando un kit de ELISA (R&D Systems). A diferencia del nivel elevado de IL-6 (SEC ID No: 14) inducida por IL-17 (SEC ID No: 11), tanto IL-17B (SEC ID No: 1) como IL17C (SEC ID No: 3) no consiguieron estimular la secreción de IL-6 (SEC ID No: 14) en células de fibroblasto (figura 9A).

60 Utilizando el procedimiento descrito en Yao *et al.*, Cytokine 9: 794 (1997) (Yao-3) se utilizó una línea de células monocíticas leucémicas humanas, THP-1, para ensayar para la estimulación de la liberación de TNF- α (SEC ID No: 20) por IL-17 (SEC ID No: 11), UNQ516 (SEC ID No: 1) y UNQ561 (SEC ID No: 3) mediante el cultivo en medio RPMI (FBS al 10%). Después de la incubación durante 18 horas a 37°C y CO₂ al 5%, se cuantificó el TNF- α (SEC ID No: 19) en los medios condicionados utilizando un kit de ensayo ELISA (R&D Systems). Aunque IL-17 (SEC ID No: 11) sólo indujo un nivel bajo de TNF- α (SEC ID No: 19) en células THP-1, tanto IL-17B como IL-17C (como proteínas de fusión Fc) estimularon la producción de TNF- α en células THP-1 (figura 9B). Una proteína de fusión Fc de control no tuvo efectos.

Con el fin de caracterizar adicionalmente la estimulación de la liberación de TNF- α por IL-17B e IL-17C, se ensayó la dependencia de la respuesta con el transcurso del tiempo y la concentración en células THP-1. La figura 10 ilustra que IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) e IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3) estimulan la liberación de TNF- α (SEC ID No: 19) de forma dependiente del tiempo y la concentración. La EC₅₀ para la estimulación por IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) es 2,4 nM, mientras que para IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3), 25 nM.

Mientras que las preparaciones de IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) e IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3) utilizadas en estos experimentos contenían niveles indetectables de endotoxina (menos de 1 EU/ml), se realizaron experimentos de control adicionales para confirmar que la liberación de TNF- α (SEC ID No: 19) de células THP-1 era real y no artificial. Las actividades de IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) e IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3) no quedaron afectadas por el tratamiento con polimixina B y se anularon mediante tratamiento térmico, apoyando adicionalmente la idea de que las propias proteínas eran responsables de las actividades y no cualquier endotoxina contaminante.

Ejemplo 11

Unión del receptor de IL-17

Clonación del ECD del receptor de hIL-17

Con el fin de clonar el ECD del receptor de IL-17 humano, se designaron dos cebadores oligonucleótidos en los extremos 5' y 3' de ECD de IL-17R (SEC ID No: 15) en base a la secuencia publicada. Yao *et al.*, *supra* (Yao-3). Las dos sondas tenían las siguientes secuencias:

cebador 1: 5'-CTG TAC CTC GAG GGT GCA GAG-3' (SEC ID No: 20)

cebador 2: 5'-CTC AAG CTT GGG TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG CCA CAG GGG CAT
GTA GTC C-3' (SEC ID No: 21)

Los cebadores anteriores se utilizaron en reacciones de PCR para amplificar el ADNc de longitud completa de una biblioteca de ADNc de testículo humano con ADN polimerasa Pfu Turbo (Promega). Se introdujo una etiqueta his en C-terminal mediante PCR a través de la adición de nucleótidos que codifican ocho histidinas al cebador del extremo 3'. A continuación, se subclonó el producto de la PCR en un vector plásmido de expresión pRK5B. El análisis de la secuencia confirmó que la inserción contiene un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular (1-320 aminoácidos) del receptor hIL-17 publicado (SEC ID No: 15).

Inmunoprecipitación del ECD de IL-17R

La actividad diferencial de IL-17 cuando se comparó con IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) e IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3) sugirió que se podrían unir y activar diferentes receptores de la superficie celular. Con el fin de ensayar si IL-17B (UNQ516) (SEC ID No: 1) o IL-17C (UNQ561) (SEC ID No: 3) se unen directamente al receptor, se transfectó un plásmido de expresión que contenía la IL-17R (etiquetada con his en C-terminal) (SEC ID No: 22) en células 293 utilizando el reactivo de transfección SuperFect (Quiagen). El marcaje metabólico de células 293 se realizó 16 horas después de la transfección utilizando 50 μ Ci/ml de mezcla [³⁵S]-Cys/Met durante 6 horas. Se recogió el medio condicionado y se concentró (Centricon-10, Amicon). Para examinar la expresión del ECD de IL-17R (SEC ID No: 15), se utilizaron gránulos de Ni-NTA (Quiagen) para precipitar por afinidad el ECD de IL-17R etiquetado con his (SEC ID No: 22) del medio condicionado.

El medio condicionado se diluyó en tampón RIPA (NP40 al 1%, desoxicolato sódico al 0,5%, SDS al 0,1% en PBS), se incubó con IL-17 (SEC ID No: 11) y las proteínas de fusión Fc durante toda la noche a 4°C. Se añadieron gránulos de proteína A-agarosa (Pierce) para precipitar las proteínas de fusión Fc. Los precipitados se lavaron tres veces para precipitar las proteínas de fusión Fc. Los precipitados se lavaron tres veces en tampón RIPA, se desnaturalizaron en tampón de muestra SDS y se realizó la electroforesis sobre geles Bis-Tris Nu-PAGE al 4-12% (Novex). Para la inmunoprecipitación de IL-17 (SEC ID No: 11), se añadió anticuerpo anti-IL17 (R&D Systems). En un experimento de unión competitiva, la inmunoprecipitación del ECD de IL-17R (SEC ID No: 15) por IL-17 (SEC ID No: 11) se realiza en presencia de un exceso molar de 5 veces de IL-17B.his (SEC ID No: 23), IL-17C.his (SEC ID No: 24) y la proteína etiquetada con his de control.

El ECD de IL-17R (SEC ID No: 15) migró como una banda de 60 kD cuando se purificó a través de su etiqueta de histidina (figura 11A, banda 1). Además, el ECD de IL-17R (SEC ID No: 15) también se precipitó combinado con IL-17 (SEC ID No: 11) (carril 3). Sin embargo, tanto IL-17B (SEC ID No: 1) como IL-17C (SEC ID No: 3) no consiguieron competir por la unión de IL-17 (SEC ID No: 11) al ECD del receptor de IL-17 (SEC ID No: 15) (figura 11B, carriles 15 y 16).

Ejemplo 12

Análisis de la unión a células THP-1 mediante Clasificador de Células activado por Fluorescencia (FACS)

5 Se preincubaron células THP-1 (5×10^5) en PBS que contenía un 5% de suero de caballo a 4°C durante 30 minutos para bloquear la unión no específica. Se añadieron IL-17 (SEC ID No: 11), IL-17B.fc (SEC ID No: 12), IL-17C.Fc (SEC ID No: 13) o Fc de control ($1 \mu\text{g}$ de cada una) y se incubaron con las células THP-1 en un volumen de 0,25 ml sobre hielo durante 1 hora. Para el experimento de unión de IL-17, se añadieron secuencialmente anticuerpo primario anti hIL-17 (dilución 1:100) y anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado a FITC (Jackson Immunology Lab, dilución 1:100) con una incubación de 30-60 minutos y lavados intensos antes de cada adición. Para las proteínas de fusión Fc, las células se tiñeron con IgG de cabra anti-humano conjugado con FITC (específico de Fc, Jackson Immunology Lab, dilución 1:100). Después de lavados intensos, se analizaron un mínimo de 5000 células utilizando FACscan (Becton Dickinson).

15 El resultado del procedimiento anterior fue que las proteínas de fusión Fc de tanto IL-17B (SEC ID No: 12) como IL-17C (SEC ID No: 13) mostraron unión a células THP-1 en comparación con una proteína de fusión Fc de control (figura 13).

Ejemplo 13

Purificación de polipéptidos PRO1122 utilizando anticuerpos específicos

20 Los polipéptidos PRO1122 nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en las técnicas de purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifica el polipéptido pro-PRO1122, el polipéptido PRO1122 maduro, o el polipéptido pre-PRO1122 mediante cromatografía de inmutafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO1122 de interés. En general, una columna de inmutafinidad se construye mediante el acoplamiento covalente del anticuerpo anti-PRO1122 a una resina de cromatografía activada.

30 Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en la Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Asimismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de los fluidos de ascitis de ratón mediante la precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica, tal como la SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Dicha columna de inmutafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido PRO1122 mediante la preparación de una fracción a partir de células que contienen polipéptido PRO1122 en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de toda la célula o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por adición de detergente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido PRO1122 soluble que contiene una secuencia señal puede secretarse en una cantidad útil en el medio en el que crecen las células.

45 Una preparación que contiene polipéptido PRO1122 soluble se pasa por la columna de inmutafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorbancia preferencial del polipéptido PRO1122 (por ejemplo, tampones de fuerza iónica elevada en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión anticuerpo-polipéptido PRO1122 (por ejemplo, un tampón de pH bajo, tal como aproximadamente un pH de 2-3, o una alta concentración de caótopo, tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido PRO1122.

Ejemplo 14

Cribado de fármacos

55 La presente invención es particularmente útil para cribar compuestos mediante la utilización de polipéptidos PRO1122 o fragmentos de unión de los mismos en cualquier variedad de técnica de cribado de fármacos. El polipéptido fragmento de PRO1122 utilizado en dicha prueba puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, adsorbido en una superficie celular o situado intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármacos utiliza células huésped eucariotas o procariotas, las cuales se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO1122 o un fragmento. Los fármacos se criban contra dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, tanto en forma viable como fija, se pueden utilizar para ensayos de unión estándar. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido PRO1122 o un fragmento y el agente que se está probando. Alternativamente, se puede examinar la disminución en la formación del complejo entre el polipéptido PRO1122 y su célula diana o receptores diana causada por el agente que se está probando.

65 De este modo, la presente invención proporciona procedimientos de cribado para fármacos o cualquier otro agente que puede afectar a una enfermedad o un trastorno asociados al polipéptido PRO1122. Estos procedimientos comprenden el contacto de dicho agente con un polipéptido PRO1122 o fragmento del mismo y el ensayo (I) para la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO1122 o un fragmento, o (II) para la presencia de un complejo entre

el polipéptido PRO1122 o un fragmento y la célula, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En dichos ensayos de unión competitiva, el polipéptido PRO1122 o un fragmento está normalmente marcado. Después de una incubación adecuada, el polipéptido PRO1122 o un fragmento libres se separan de la forma unida, y la cantidad de marca libre o no complejada es una medida de la capacidad del agente concreto para unirse al polipéptido PRO1122 o para interferir en el complejo polipéptido PRO1122/célula.

Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona un alto rendimiento cribando compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a un polipéptido y se describe en detalle en WO 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Brevemente, una gran cantidad de compuestos de diferentes péptidos pequeños de prueba se sintetizan en un sustrato sólido, tal como agujas de plástico o alguna otra superficie. Tal y como se aplica a un polipéptido PRO1122, los compuestos de péptidos de prueba se hacen reaccionar con polipéptido PRO1122 y se lavan. Se detecta el PRO1122 unido mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. El polipéptido PRO1122 purificado también puede recurrirse directamente en placas para utilizar en las técnicas de cribado de fármacos mencionadas anteriormente. Además, se pueden utilizar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

La presente invención también contempla la utilización de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los cuales los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a polipéptidos PRO1122 específicamente compiten con un compuesto de prueba para unirse a polipéptido PRO1122 o fragmentos del mismo. De esta manera, pueden utilizarse los anticuerpos para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO1122.

Ejemplo 15

Diseño racional de fármacos

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés (es decir, un polipéptido PRO1122) o de pequeñas moléculas con las cuales interactúan, por ejemplo, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se puede utilizar para fármacos de moda que son formas más activas o estables del polipéptido PRO1122 o que potencian o interfieren con la función del polipéptido PRO1122 *in vivo* (c.f. Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

En un enfoque, la estructura tridimensional del polipéptido PRO1122, o de un complejo polipéptido PRO1122-inhibidor, se determina mediante cristalografía de rayos X, mediante modelación por ordenador o, más habitualmente, mediante una combinación de los dos enfoques. Deben comprobarse la forma y las cargas del PRO1122 para elucidar la estructura y para determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Con menor frecuencia, podría obtenerse la información útil con respecto a la estructura del PRO1122 mediante la modelación basada en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural pertinente se utiliza para diseñar moléculas análogas de tipo polipéptido PRO1122 o para identificar inhibidores eficaces. Entre los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos se pueden incluir moléculas que han mejorado la actividad o la estabilidad, tal como se muestra por Braxton y Wells, *Biochemistry*, 31: 7796-7801 (1992) o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos tal y como se muestra por Athauda *et al.*, *J. Biochem.*, 113: 742-746 (1993).

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado mediante un ensayo funcional, tal y como se ha descrito anteriormente y, a continuación, solucionar su estructura cristalina. Este enfoque, en principio, produce un fármaco inicial en el que puede basarse el diseño de fármacos posterior. Es posible evitar una cristalografía de toda la proteína mediante la generación de anticuerpos anti-idiotípicos (anti-ids) para un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, el sitio de unión del anti-ids se esperaría que fuera un análogo del receptor original. A continuación, el anti-ids podría utilizarse para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actuarían entonces como el fármaco inicial.

En virtud de la presente invención, se pueden fabricar cantidades suficientes del polipéptido PRO1122 para realizar dichos estudios analíticos, tales como en cristalografía de rayos-X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO1122 proporcionada en la presente invención proporcionará una guía para los usuarios de técnicas de modelación por ordenador en lugar de o adicionalmente a la cristalografía de rayos-X.

Ejemplo 16

Ensayo de explantes de cartílago articular

Introducción

Tal y como se ha mencionado anteriormente, es probable que IL-17 tenga un papel en la iniciación o mantenimiento de la respuesta proinflamatoria. IL-17 es una citoquina expresada por células CD4⁺ T_H e induce la secreción de citoquinas proinflamatorias y hematopoyéticas (por ejemplo, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, GM-CSF. Aarvak *et al.*, *J. Immunol* 162: 1246-1251 (1999); Fossiez *et al.*, *J. Exp. Med.* 183: 2593-2603 (1996); Jovanovic *et al.*, *J. Immunol.* 160:

3513-3521 (1998) en una serie de tipos de células que incluyen sinoviocitos y macrófagos. En presencia de IL-17, los fibroblastos mantienen la proliferación de progenitores hematopoyéticos CD34+ e inducen su maduración preferencial en neutrófilos. Como resultado, IL-17 puede constituir un iniciador temprano de la reacción inflamatoria dependiente de células T y puede ser parte de la red de citoquinas que conecta el sistema inmune con la hematopoyesis.

Se ha observado la expresión de IL-17 en el sinovio de pacientes con artritis reumatoide, artritis psoriática u osteoartritis, pero no en tejidos de articulaciones normales. IL-17 puede ser sinérgico con las citoquinas proinflamatorias derivadas de monocitos IL-1 β o TNF- α para inducir IL-6 y GM-CSF. Mediante la acción directa sobre los sinoviocitos, IL-17 podía aumentar la secreción de citoquinas proinflamatorias *in vivo* y, de este modo, exacerbar la inflamación y destrucción de las articulaciones.

Para entender a fondo el posible papel de IL-17, los Solicitantes han ensayado los efectos de IL-17 sobre el metabolismo de la matriz del cartílago. A la vista de los efectos catabólicos conocidos del óxido nítrico (NO) en el cartílago, y la existencia de niveles elevados de NO en las articulaciones artríticas, también se midió la producción de NO.

Procedimientos

Explantes de cartílago articular: La articulación metacarpofalángica de una cerda de 4-6 meses de vida se disecó de manera aséptica, y se extrajo el cartílago articular mediante corte en "frenad" de una forma cuidadosa, de manera que se evita el hueso subyacente. El cartílago se molió y se cultivó en masa durante por lo menos 24 horas en una atmósfera humidificada del 95% en aire y un 5% de CO₂ en medio libre de suero (SF) (DME/F12 1:1) con BSA al 0,1% y antibióticos. Después de lavar tres veces, se pusieron alicuotas de aproximadamente 80 mg de cartílago articular en tubos micrónicos y se incubaron durante por lo menos 24 horas en el medio SF anterior. A continuación, se añadieron las proteínas de prueba en un 1% solas o combinadas con IL-1 α (10 ng/ml) (SEC ID No: 25). El medio se recogió y se cambió a diferentes puntos de tiempo (0, 24, 48, 72 horas) y se ensayó para el contenido de proteoglicanos utilizando el ensayo colorimétrico con azul de 1,9-dimetilmetileno (DMB) descrito en Famdale y Buttle, Biochem. Biophys. Acta 883: 173-177 (1985). Después del marcaje (durante toda la noche) con azufre-³⁵S, los tubos se pesaron para determinar la cantidad de tejido. Después de una digestión durante toda la noche, se determinan la cantidad de proteoglicanos restante en el tejido, así como la síntesis de proteoglicanos (incorporación de ³⁵S).

Medición de la producción de NO: El ensayo se basa en el principio que el 2,3-diaminonaftaleno (DAN) reacciona con nitrito en condiciones ácidas para formar 1-(H)-naftotriazol, un producto fluorescente. Dado que el NO es metaboliza rápidamente a nitrito (NO₂⁻¹) y nitrato (NO₃⁻¹), la detección del nitrito es un medio de detección (aunque por debajo) del NO real producido. Se añaden 10 μ L de DAN (0,05 mg/mL en 0,62 M de HCl) a 100 μ L de muestra (sobrenadante del cultivo celular), se mezclan y se incuban a temperatura ambiente durante 10-20 minutos. La reacción se acaba con 5 mL de NaOH 2,8 N. La formación de 2,3-diaminonaftotriazol se midió utilizando un lector en placa fluorescente Cytoflor con una excitación a 360 nm y lectura de emisión a 450 nm. Para una medición óptima de la intensidad fluorescente, se utilizaron placas negras con bases claras.

Resultados y discusión

Se observó que IL-17 (SEC ID No: 11) aumentaba la liberación de proteoglicanos y disminuía la síntesis de los mismos (figura 13). Además, este efecto era aditivo al efecto observado a partir de IL-1 α (figura 13) (SEC ID No: 25). Los efectos de IL-17 no están mediados por la producción de óxido nítrico, ni la inhibición de la liberación de óxido nítrico aumenta la ruptura de la matriz. UNQ561 (SEC ID No: 3) aumenta la ruptura de la matriz e inhibe la síntesis de la matriz. De este modo, es probable que la expresión de PRO1122 se asocie a trastornos cartilaginosos degenerativos. Por otro lado, UNQ516 (SEC ID No: 1) aumenta la síntesis de la matriz e inhibe la liberación de óxido nítrico por los explantes de cartílago articular.

En conclusión, IL-17 contribuye probablemente a una pérdida de cartílago articular en las articulaciones artríticas y, de este modo, la inhibición de su actividad podría limitar la inflamación y la destrucción del cartílago. IL-1 e IL-17 tienen actividades similares, aunque distintas, debido a su utilización de diferentes receptores y al solapamiento en cadena abajo de los mecanismos de señalización.

Dados los hallazgos de los potentes efectos catabólicos de IL-17 sobre explantes de cartílago articular y la homología de UNQ516 y UNQ561 con IL-17, los antagonistas para cualquiera o todas estas proteínas puede ser útil para el tratamiento de condiciones inflamatorias y defectos del cartílago, tales como la artritis. Sin embargo, el hallazgo de que UNQ516 inhibe la producción de NO y aumenta la síntesis de la matriz sugiere que esta proteína y los agonistas de las misma podrían tener efectos beneficiosos en la articulación y, de este modo, pueden ser útiles por sí mismos para el tratamiento de los trastornos mencionados anteriormente.

Finalmente, se sabe que los factores de crecimiento pueden tener efectos bifásicos y que el tejido enfermo puede responder de forma diferente que el tejido normal a un factor determinado *in vivo*. Por estas razones, los antagonistas o agonistas (por ejemplo, las propias proteínas) de UNQ561 pueden ser útiles en el tratamiento de condiciones inflamatorias y trastornos de las articulaciones, tales como la artritis.

Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA, USA 20110-2209 (ATCC):

Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
DNA59294-1381	209866	14 de mayo de 1998
DNA62377-1381-1	203552	22 de diciembre de 1998

Este depósito se realizó según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. El depósito estará disponible mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por el Comisionario de Patentes y Marcas de Estados Unidos para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas del Comisionario según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente reemplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

La memoria escrita anteriormente se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención. El depósito del material de la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5536637 A [0005]
- WO 9961617 A [0011]
- EP 404097 A [0055]
- WO 9311161 A [0055]
- US 4275149 A [0058]
- US 5364934 A [0065]
- WO 8705330 A [0077]
- US 4640835 A [0079]
- US 4496689 A [0079]
- US 4301144 A [0079]
- US 4670417 A [0079]

ES 2 292 242 T3

- US 4791192 A [0079]
- US 4179337 A [0079]
- 5 • US 5428130 A [0081]
- WO 9410308 A [0082]
- WO 8905859 A [0090]
- 10 • US 4399216 A [0090]
- DD 266710 [0091]
- 15 • US 4946783 A [0091]
- EP 139383 A [0092]
- US 4943529 A [0092]
- 20 • EP 402226 A [0092]
- EP 183070 A [0092]
- 25 • EP 244234 A [0092]
- EP 394538 A [0092]
- WO 9100357 A [0092]
- 30 • US 5010182 A [0095]
- EP 362179 A [0095]
- 35 • WO 9013646 A [0095]
- EP 36776 A [0099]
- EP 73657 A [0101]
- 40 • GB 2211504 A [0102]
- EP 117060 A [0105]
- 45 • EP 117058 A [0105]
- WO 9106629 A [0114]
- WO 9010048 A [0115]
- 50 • WO 9013641 A [0116]
- WO 9104753 A [0117]
- 55 • WO 9010448 A [0118]
- US 4736866 A [0122]
- US 4870009 A [0122]
- 60 • US 4816567 A [0146] [0146] [0150]
- US 5545807 A [0151]
- 65 • US 5545806 A [0151]
- US 5569825 A [0151]

ES 2 292 242 T3

- US 5625126 A [0151]
- US 5633425 A [0151]
- 5 • US 5661016 A [0151]
- WO 8101145 A [0152]
- WO 8807378 A [0152]
- 10 • US 4975278 A [0152]
- WO 9308829 A [0157]
- 15 • WO 9627011 A [0159]
- US 4676980 A [0165] [0165]
- WO 9100360 A [0165]
- 20 • WO 92200373 A [0165]
- EP 03089 A [0165]
- 25 • WO 9411026 A [0169]
- US 4485045 A [0171]
- US 4544545 A [0171]
- 30 • US 5013556 A [0171]
- US 3773919 A [0177] [0205]
- 35 • WO 9733551 A [0191] [0192]
- US 5385915 A [0195]
- WO 9703692 A [0205]
- 40 • WO 9640072 A [0205]
- WO 9607399 A [0205]
- 45 • US 5654010 A [0205]
- US 4657760 A [0213]
- US 5206344 A [0213]
- 50 • US 5255212 A [0213]
- EP 307247 A [0240]
- 55 • WO 8403564 A [0283]
- US 60085579 B [0302] [0303]
- US 60113621 B [0302] [0303]
- 60 • US 9910733 W [0303]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 65 • **YAO** *et al. J. Immunol.*, 1995, vol. 155 (12), 5483-5486 [0002]
- **FOSSIEZ**. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183 (6), 2593-2603 [0002]

- **KENNEDY**. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1996, vol. 16 (8), 611-617 [0002]
- **KLEIN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, vol. 93, 7108-7113 [0005]
- 5 • **SPRIGGS et al.** *J. Clin. Immunol.*, 1997, vol. 17, 366 [0006]
- **BROXMEYER**, H.E. *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2411 [0006]
- **ROUVIER et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 150, 5445 [0006]
- 10 • **YAO et al.** *Immunity*, 1995, vol. 3, 811 [0006] [0135]
- **FOSSIEZ et al.** *J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2593 [0006]
- 15 • Herpesvirus saimiri and herpesvirus ateles. **FLECKENSTEIN; DESROSIERS**. *The Herpesviruses. Plenum Publishing Press*, 1982, 253 [0006]
- **BIESINGER**, B.I. *et al. Procl Natl Acad Sci. USA*, 1992, vol. 89, 3116 [0006]
- 20 • **JOVANOVIC et al.** *J. Immunol*, 1998, vol. 160, 3513 [0008]
- **FOSSIEZ et al. supra, Yao. J. Immunol., 1995, vol. 155, 5483 [0008]**
- **YAO et al. Cytokine, 1997, vol. 9, 794 [0009] [0136] [0267]**
- 25 • **SHALOM-BAREK et al. J Biol. Chem., 1998, vol. 273, 27467 [0010]**
- **ALTSCHUL et al. Methods in Enzymology, 1996, vol. 266, 460-480 [0028]**
- 30 • **AUSUBEL et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience, 1995 [0032]**
- **ZAPATA et al. Protein Engin, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0048]**
- **PLUCKTHUN**. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0054]
- 35 • **HOLLINGER et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0055] [0162]**
- **CARTER et al. Nucl. Acids Res., 1986, vol. 13, 4331 [0071]**
- 40 • **ZOLLER et al. Nucl. Acids Res., 1987, vol. 10, 6487 [0071]**
- **WELLS et al. Gene, 1985, vol. 34, 315 [0071]**
- **WELLS et al. Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 1986, vol. 317, 415 [0071]**
- 45 • **CREIGHTON**. *The Proteins* [0072]
- **CHOTHIA**. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0072]
- 50 • **T.E. CREIGHTON**. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W.H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0074]
- **APLIN; WRISTON**. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0077]
- **HAKIMUDDIN et al. Arch. Biochem. Biophys., 1987, vol. 259, 52 [0078]**
- 55 • **EDGE et al. Anal. Biochem., 1981, vol. 118, 131 [0078]**
- **THOTAKURA et al. Meth. Enzymol., 1987, vol. 138, 350 [0078]**
- 60 • **FIELD et al. Mol. Cell. Biol., 1988, vol. 8, 2159-2165 [0080]**
- **EVAN et al. Molecular and Cellular Biology, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0080]**
- **PABORSKY et al. Protein Engineering, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0080]**
- 65 • **HOPP et al. BioTechnology, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0080]**
- **MARTIN et al. Science, 1992, vol. 255, 192-194 [0080]**

- **SKINNER** *et al. J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0080]
- **LUTZ-FREYERMUTH** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0080]
- 5 • **LANDSCHULZ** *et al. Science*, 1988, vol. 240, 1759 [0082]
- **HOPPE** *et al. FEBS Letters*, 1994, vol. 344, 1991 [0082]
- **MANIATIS** *et al. Nature*, 1989, vol. 341, 24 [0082]
- 10 • **STEWART** *et al. Solid-Phase Peptide Synthesis*. W.H. Freeman Co, 1969 [0083]
- **MERRIFIELD**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0083]
- 15 • **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0085]
- **SAMBROOK** *et al. supra* [0085] [0086] [0088] [0090] [0236] [0240]
- 20 • **DIEFFENBACH** *et al. PCR Primer: A Laboratory Manua*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 [0085]
- Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach. **SAMBROOK** *et al. supra. IRL Press*, 1991 [0089]
- **SHAW** *et al. Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0090]
- 25 • **GRAHAM**; VAN DER EB. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0090]
- **VAN SOLINGEN** *et al. J Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0090]
- 30 • **HSIAO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, vol. 76, 3829 [0090]
- **KEOWN** *et al. Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0090]
- **MANSOUR** *et al. Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0090]
- 35 • Beach and Nature. *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0092]
- **FLEER** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0092]
- 40 • **LOUVENCOURT** *et al. J Bacteriol*, 1983, vol. 737 [0092]
- **VAN DEN BERG** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0092]
- **SREEKRISHNA** *et al. J basic Microbiol*, 1988, vol. 28, 265-278 [0092]
- 45 • **CASE** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5359-5263 [0092]
- **BALANCE** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0092]
- 50 • **TILBURN** *et al. Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0092]
- **YELTON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0092]
- **KELLY**; **HYNES**. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0092]
- 55 • **C. ANTONY**. *The Biochemisrty of Methylotrrophs*, 1982, 269 [0092]
- **GRAHAM** *et al. J Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0093]
- 60 • **URLAUB**; **CHASIN**. *Proc. Nail. Acad. Sci.*, 1980, vol. 77, 4216 [0093]
- **MATHER**. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0093]
- **URLAUB** *et al. Proc. Nail. Acad. Sci.*, 1980, vol. 77, 4216 [0098]
- 65 • **STINCHCOMB** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0098]
- **KINGSMAN** *et al. Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0098]

- **TSCHEMPER** *et al. Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0098]
- **JONES**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0098]
- 5 • **CHANG** *et al. Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0099]
- **GOEDEL** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0099]
- **GOEDEL**. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0099]
- 10 • **DEBOER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0099]
- **HITZEMAN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0100]
- 15 • **HESS** *et al. J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0100]
- **HOLLAND**. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0100]
- **GETHING** *et al. Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0105]
- 20 • **MANTEI** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0105]
- **THOMAS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0106]
- 25 • **DEUTSCHER**. *Methods in Enzymology*, 1990, 182 [0109]
- **SCOPES**. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag, 1982 [0109]
- **STEIN; COHEN**. *Cancer Res.*, 1988, vol. 48, 2659 [0113]
- 30 • **VAN DER KROL** *et al. Bio Techniques*, 1988, vol. 6, 958 [0113]
- **THOMAS; CAPECCHI**. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0123]
- 35 • **LI** *et al. Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0123]
- **BRADLEY**. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. IRL. Oxford, 1987, 113-152
- **ZAMECNIK** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 4143-4146 [0124]
- 40 • **DZAU** *et al. Trends in Biotechnology*, 1993, vol. 11, 205-210 [0125]
- **WU** *et al. J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0125]
- 45 • **WAGNER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0125]
- **ANDERSON** *et al. Science*, 1992, vol. 256, 808-813 [0125]
- **ROUVIER** *et al. M Immunol*, 1993, vol. 150, 5445 [0132]
- 50 • **FOSSIEZ** *et al. J Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2593 [0134]
- **YAO** *et al. J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 5483 [0134] [0135]
- 55 • **KOHLER; MILSTEIN**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0140]
- **GODING**. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, 1986, 59-103 [0141]
- **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0142]
- 60 • **BRODEUR** *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker. Inc, 1987, 51-63 [0142]
- 65 • **MUNSON; POLLARD**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0143]
- **MORRISON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0146]
- **JONES** *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0149] [0150]

ES 2 292 242 T3

- **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0149]
- **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0149]
- 5 • **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0150]
- **VERHOEYEN** *et al. Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0150]
- **HOOGENBOOM; WINTER**. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0151]
- 10 • **MARKS** *et al. J Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0151]
- **COLE** *et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. Alan R. Liss, 1985, 77 [0151]
- 15 • **BOERNER** *et al. J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0151]
- **MARKS** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0151]
- **LONBERG** *et al. Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0151]
- 20 • **MORRISON**. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0151]
- **FISHWILD** *et al. Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0151]
- 25 • **NEUBERGER**. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0151]
- **LONBERG; HUSZAR**. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0151]
- **MASSEY**. *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0154]
- 30 • **NEUBERGER** *et al. Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0155]
- **MILSTEIN; CUELLO**. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0157]
- 35 • **TRAUNECKER** *et al. EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0157]
- **SURESH** *et al. Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0158]
- **BRENNAN** *et al. Science*, 1985, vol. 229, 81 [0160]
- 40 • **SHALABY** *et al. J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0161]
- **KOSTELNY** *et al. J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0162]
- 45 • **GRUBER** *et al. J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0162]
- **TUTT** *et al. J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0163]
- **CARON** *et al. J Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0166]
- 50 • **SHOPES, B. J. Immunol., 1992, vol. 148, 2918-2922 [0166]**
- **WOLFF** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2S65 [0166]
- 55 • **STEVENSON** *et al. Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0166]
- **VITETTA** *et al. Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0169]
- **EPSTEIN** *et al. Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0171]
- 60 • **HWANG** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0171]
- **MARTIN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0172]
- 65 • **GABIZON** *et al. J National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0172]
- **MARASCO** *et al. Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0174] [0199]

ES 2 292 242 T3

- **ZOLA.** *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques.* CRC Press, Inc, 1987, 147-158 [0178]
- **HUNTER et al.** *Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0178]
- 5 • **DAVID et al.** *Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014 [0178]
- **PAIN et al.** *J. Immunol. Meth.*, 1981, vol. 40, 219 [0178]
- **NYGREN.** *J. Histochem. and Cytochem.*, 1982, vol. 30, 407 [0178]
- 10 • **FIELDS; SONG.** *Nature*, 1989, vol. 340, 245-246 [0183]
- **CHIEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0183]
- 15 • **CHEVRAY; NATHANS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 89, 5789-5791 [0183]
- **COLIGAN et al.** *Current Protocols in Immun.*, 1991, vol. 1 (2 [0185]
- **LEE et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1979, vol. 6, 3073 [0189]
- 20 • **COONEY et al.** *Science*, 1988, vol. 241, 456 [0189]
- **DERVAN et al.** *Science*, 1991, vol. 251, 1360 [0189]
- 25 • **OKANO.** *Neurochem*, 1991, vol. 546, 560 [0189]
- *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression.* CRC Press: Boca Raton, FL, 1988 [0189]
- **ROSSI.** *Current Biology*, 1994, vol. 4, 469-471 [0191]
- 30 • *Remington's Pharmaceutical Sciences.* 1980 [0200] [0202]
- **JOHNSON et al.** *Nat. Med.*, 1996, vol. 2, 795-799 [0205]
- 35 • **YASUDA et al.** *Biomed. Ther.*, 1993, vol. 27, 1221-1223 [0205]
- **HORA et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 755-758 [0205]
- Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems.
- 40 • **CLELAND.** *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach.* Penum Press, 1995, 439-462 [0205]
- Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. **LEWIS.** *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems.* Marcel Dekker, 1990, 1-41 [0206]
- 45 • The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics. **MORDENTI, J.; CHAPPELL. W. et al.** *In Toxicokinetics and New Drug Development.* Pergamon Press, 1989, 42-46 [0212]
- **ALTSHUL et al.** *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0217]
- 50 • **LENNON et al.** *Genomics*, 1996, vol. 33, 151 [0219]
- **SAMBROOK et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0223]
- 55 • **DIEFFENBACH et al.** *PCR Primer: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 [0223]
- **AUSUBLE et al.** *Current Protocols in Molecular Biology* [0224]
- **HOLMES et al.** *Science*, 1991, vol. 235, 1278-1280 [0226]
- 60 • **BOLIVAR et al.** *Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0235]
- **THIMMAPAYA.** *Cell*, 1982, vol. 31, 543 [0241]
- 65 • **SOMPARYRAC et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 12, 7575 [0243]
- **O'REILLEY et al.** *Baculovirus Expression vectors: A Laboratory Manual.* Oxford University Press, 1994

ES 2 292 242 T3

- **RUPERT** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 175-179 [0253]
- **YAO** *et al. J. Immunol.*, 1995, vol. 155, 5483 [0265]
- 5 • **YAO** *et al. supra* [0270]
- **HODGSON**. *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 19-21 [0285]
- **BRAXTON; WELLS**. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 7796-7801 [0286]
- 10 • **ATHAUDA** *et al. Biochem.*, 1993, vol. 113, 742-746 [0286]
- **AARVAK** *et al. J. Immunol.*, 1999, vol. 162, 1246-1251 [0289]
- 15 • **FOSSIEZ** *et al. J. Exp. Med.*, 1996, vol. 183, 2593-2603 [0289]
- **JOVANOVIC** *et al. J. Immunol.*, 1998, vol. 160, 3513-3521 [0289]
- 20 • **FAMDALE; BUTTLE**. *Biochem. Biophys. Acta*, 1985, vol. 883, 173-177 [0292]

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un polipéptido PRO1122 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno cartilaginoso degenerativo,
 en la que dicho polipéptido PRO1122 es un polipéptido aislado que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - (i) un polipéptido PRO1122 que consiste en la secuencia de residuos de aminoácidos 1 a 197 mostrada en la figura 3 (SEC ID No: 3),
 - (ii) un polipéptido PRO1122 que consiste en la secuencia de residuos de aminoácidos 19 a 197 mostrada en la figura 3 (SEC ID No: 3),
 - (iii) un polipéptido PRO1122 codificado por la secuencia codificante de longitud completa del ADNc depositado bajo el número de acceso de la ATCC 203552, y
 - (iv) un polipéptido PRO1122 codificado por la secuencia codificante de longitud completa del ADNc depositado bajo el número de acceso de la ATCC 203552 que carece de su péptido señal asociado,
 determinando la identidad en la secuencia de aminoácidos sobre la longitud completa del polipéptido PRO1122 de (i), (ii), (iii) o (iv), y el polipéptido aislado siendo capaz de inducir la liberación de TNF- α de células THP-1 y/o aumentar la ruptura de la matriz e inhibir la síntesis de la matriz en explantes de cartílago articular.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la identidad en la secuencia de aminoácidos es por lo menos del 90%.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que la identidad en la secuencia de aminoácidos es por lo menos del 95%.
4. Utilización según la reivindicación 1, en la que la identidad en la secuencia de aminoácidos es por lo menos del 98%.
5. Utilización según la reivindicación 1, en la que la identidad en la secuencia de aminoácidos es por lo menos del 99%.
6. Utilización según la reivindicación 1, en la que el polipéptido PRO1122 aislado comprende los aminoácidos 1 ó 19 a 197 de la figura 3 (SEC ID No: 3).
7. Utilización según la reivindicación 1, en la que el polipéptido PRO1122 está codificado por la secuencia codificante de longitud completa del ADNc depositado bajo el número de acceso de la ATCC 203552 y está con o sin su péptido señal asociado.
8. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tratamiento es el tratamiento de la artritis.
9. Antagonista de un polipéptido PRO1122, en la que dicho antagonista comprende:
 - (1) un anticuerpo anti-PRO1122 que se une específicamente a un polipéptido PRO1122 que consiste en la secuencia de residuos de aminoácidos 1 ó 19 a 197 mostrada en la figura 3 (SEC ID No: 3), o
 - (2) un antagonista de ácido nucleico dirigido contra el ácido nucleico de la figura 4 (SEC ID No: 4), que es un ácido nucleico antisentido, un oligonucleótido de ácido desoxinucleico adaptado para la formación de la triple hélice o una ribozima,
 y antagoniza la actividad del polipéptido PRO1122 que consiste en la secuencia de residuos de aminoácidos 1 ó 19 a 197 mostrada en la figura 3 (SEC ID No: 3) para inducir la liberación de TNF- α de células THP-1 y/o aumentar la ruptura de la matriz e inhibir la síntesis de la matriz en explantes de cartílago articular.
10. Composición farmacéutica terapéutica que comprende el antagonista de PRO1122 de la reivindicación 9 en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.
11. Antagonista de un polipéptido PRO1122, para utilizar en un procedimiento de tratamiento, en el que el antagonista es según se ha definido en la reivindicación 9.
12. Antagonista según la reivindicación 11, en el que el tratamiento es el tratamiento de una condición inflamatoria y/o un trastorno cartilaginoso degenerativo.

ES 2 292 242 T3

13. Antagonista según la reivindicación 12, en el que el tratamiento es el tratamiento de la artritis.

14. Utilización de un antagonista según se ha definido en la reivindicación 9, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una condición inflamatoria y/o un trastorno cartilaginoso degenerativo.

5

15. Utilización según la reivindicación 14, en la que el tratamiento es el tratamiento de la artritis.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 292 242 T3

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

FIG. 1

Figura 2

```

aggegggcag cagctgcagg ctgaccttgc agcttggcgg aatggactgg 50
cctcacaacc tgctgtttct tcttaccatt tccatcttcc tggggctggg 100
ccagcccagg agccccaana gcaagaggaa ggggcaaggg cggcctgggc 150
ccctggcccc tggccctcac caggtgccac tggacctggg gtcacggatg 200
aaaccgtatg cccgcatgga ggagtatgag aggaacatcg aggagatggg 250
ggcccagctg aggaacagct cagagctggc ccagagaaaag tgtgaggtca 300
acttgcagct gtggatgtcc aacaagagga gcctgtctcc ctggggctac 350
agcatcaacc acgaccccag ccgtatcccc gtggacctgc cggaggcacg 400
gtgcctgtgt ctgggctgtg tgaaccctt caccatgcag gaggaccgca 450
gcatggtgag cgtgccggtg ttcagccagg ttctgtgcg ccgccgcctc 500
tgcccgccac cgcctccgac agggccttgc cgcagcgcg cagtcatgga 550
gaccatcgct gtgggctgca cctgcattct ctgaatcacc tggcccagaa 600
gccaggccag cagcccagaa ccatactcct tgcacctttg tgccaagaaa 650
ggcctatgaa aagtaaacac tgacttttga aagcaag 687

```

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

Ser Val
197

FIG. 3

Figura 4

```

gccaggtgtg caggccgctc caagcccagc ctgccccgct gccgccacca 50
tgacgctcct ccccggcctc ctgtttctga cctggctgca cacatgcctg 100
gcccaccatg acccctccct cagggggcac ccccacagtc acggtacccc 150
acactgctac tcggctgagg aactgcccct cggccaggcc ccccacacc 200
tgctggctcg aggtgccaag tgggggcagg ctttgccctgt agccctggtg 250
tccagcctgg aggcagcaag ccacaggggg aggcacgaga ggccctcagc 300
tacgaccag tgcccggctgc tcgggccgga ggaggtgttg gaggcagaca 350
cccaccagcg ctccatctca ccctggagat accgtgtgga cacggatgag 400
gaccgctatc cacagaagct ggccttcgcc gagtgcctgt gcagaggctg 450
tatcgatgca cggacggggc gcgagacagc tcgctcaac tccgtgcggc 500
tgctccagag cctgctggtg ctgcgccgcc ggccctgctc ccgcgacggc 550
tcggggctcc ccacacctg ggcctttgcc ttccacaccg agttcatcca 600
cgteccccgc ggctgcacct gcgtgctgcc ccgttcagtg tgaccgccga 650
ggccgtgggg ccctagact ggacacgtgt gteccccaga gggcaccccc 700
tatttatgtg tatttatgtt tatttatatg cttcccccaa cactaccctt 750
ggggctctgg cattccccgt gtctggagga cagcccccca ctgttctcct 800
catctccagc ctcagtagtt gggggtagaa ggagctcagc acctcttcca 850
gcccttaaag ctgcagaaaa ggtgtcacac ggctgcctgt accttggtc 900
cctgtcctgc tcccggcttc ccttacccta tcaactggct caggccccgc 950
aggctgcctc ttcccaacct ccttgaagt acccctgttt cttaaacaa 1000
tatttaagtg tacgtgtatt attaaactga tgaacacatc cccaaaa 1047

```

```

ggcagcaggg accaagagag gcacgcttgc ccttttatga catcagagct 50 -
cctggttctt gctccttggg actctgggac ttacaccagt ggcacccctg 100
gctcnnnnnn nnnnnaattc ggtacgaggc tgggggttcag gcgggcagca 150
gctgcaggct gaccttgca gcttggcgaa tggactggcc tcacaacctg 200
ctgtttcttc ttaccatttc catcttcctg gggctgggccc agcccaggag 250
cccaaaaagc aagaggaagg ggcaagggcg gcctgggccc ctggtccttg 300
gccctcacca ggtgccactg gacctggtgt cacggatgaa accgtatgcc 350
cgcatggagg agtatgagag gaacatcgag gagatgttgg ccagctgag 400
gaacagttca gagctggccc agagaaagtg tgaggtcaac ttgcagctgt 450
ggatgtccaa caagaggagc ctgtctccct ggggctacag catcaaccac 500
gaccccagcc gtatccccgt ggacctccgg aggcacggtg cctgtgtctg 550
ggcttgtgtg aacccttca ccatgcagga ggaccgcagc atggtgagcg 600
tgccggtgtt cagccagggt cctgtgcgcc gccgcctctg cccgccaccg 650
ccccgcacag ggccttgccg ccagcgcgca gtcattggaga ccatcgctgt 700
gggctgcacc tgcattcttc gaatcgacct ggcccagaag ccaggccagc 750
agcccgagac catcctcctt gcacctttgt gccaaagaaag gcctatgaaa 800
agtaaacact gacttttgaa agcaaaaaaa 830

```

Figura 5

cacggatgag gaccgctatc cacagaagct ggccttcgcc gagtgcctgt 50
gcagaggctg tatcgatgca cggacggggc gcgagacagc tgcgctcaac 100
tccgtgcggc tgctccagag cctgctggtg ctgcgccgcc ggccctgctc 150
cgcgcacggc tcggggctcc ccacacctgg ggcctttgcc ttccacaccg 200
agttcatcca cgtccccgtc ggetgcacct 230

Figura 6

```

1 .....MTPGKTSLVSLLLLL
1 .....MDWPHNLLFLLTISIFLGGLQPRSPKSKRKGGQGRPGPLAPGP
1 MTLPGLLFLTWLHTCLAHHDPSLRGHPHSHGTPHCYSAEELFLGQAPPH

16 SLEAIVKAGITIPRMPGCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSD
43 HQVPLDLVSRMKPYARMEEYERNIEEMVAQLRMSSS1ELAQKCEYNLQLWM
51 LARGAKWGAQALPVALVSSLEAASHRG1HERPSATTQCPVLRPEEYLEAD

66 YYNRS1TS1PNLHARNIEDPERYP1SVIWEAKCRHLGGCLNADG1NV1DYH1MNSVPI
93 SNKRSLS1SPWGY1SI1NH1DP1SR1IPV1DLPEARCLCLGCVMPFTMQEDRS1MVSV1P
101 THQRSIS1SPWRYR1VD1TD1ED1RY1PQK1IAFAECLCRGCIDARTIGRETAALNSVR

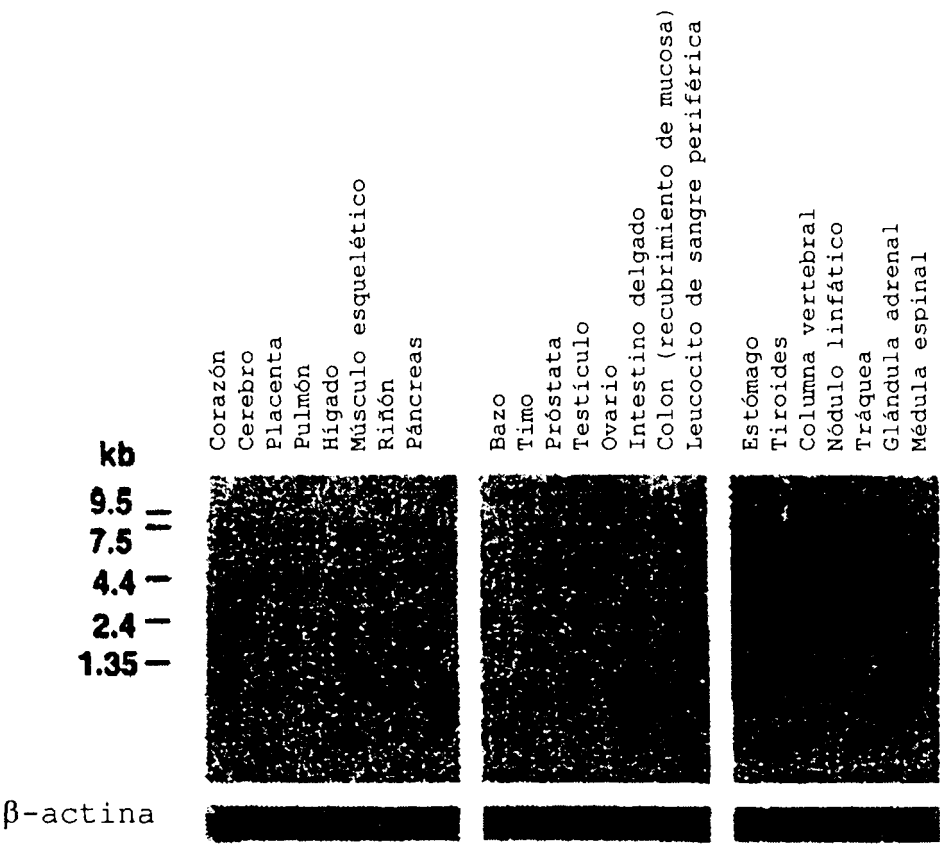
116 QQEI-LVLRRE1PHCRNS.....FRLEKIL1MSV1GGTCMT1RI1VHHVA
123 VFSQVPVRRRL...CHPPRT...GPCRCHAVMETI1AVGCTCIF.....
131 LQSLIVLRRRP...CSR1DGSG1LP1TPGAFA1HT1EF1IM1VPV1GCIC1VL1BSV...

```

59294	1	M	O	W	P	H	N	L	L	F	L	L	T	I	S	I	F	L	G	L	G	P	R	S	P	K	S	K	R	K	G	Q	G	R	P	G	P	L	A	P	G	P	-	-	-	M	O	V	P	L	
62377	1	M	T	L	L	P	G	L	L	F	L	T	W	L	H	T	C	L	A	H	H	D	P	-	S	L	R	G	H	P	H	S	H	G	T	P	H	C	Y	S	A	E	E	L	P	L	G	O	A	P	P
59294	48	D	L	V	S	R	M	K	P	Y	A	R	M	-	-	E	E	Y	E	R	N	I	E	E	M	V	A	Q	L	R	N	S	S	E	L	A	Q	R	K	C	E	V	-	-	-	N	L	Q	L	W	
62377	50	M	L	L	A	R	G	A	K	W	G	Q	A	L	P	V	A	L	V	S	S	L	E	A	A	S	H	R	G	R	K	E	R	P	S	A	T	T	Q	C	P	V	L	R	P	E	E	V	L	E	A
59294	92	M	S	N	K	R	S	L	S	P	W	G	Y	S	I	N	H	D	P	S	R	I	P	V	D	L	P	E	A	R	C	L	C	L	G	C	V	N	P	F	T	M	Q	E	D	R	S	M	V	S	V
62377	100	D	T	H	Q	R	S	I	S	P	W	R	Y	R	Y	D	T	D	E	O	R	Y	P	Q	K	L	A	F	A	E	C	L	C	R	G	C	I	D	A	R	T	G	R	E	T	A	A	L	N	S	V
59294	142	P	V	F	-	S	Q	V	P	V	R	R	R	L	C	P	P	P	-	-	-	P	R	T	G	P	C	R	Q	R	A	V	M	E	T	I	A	V	G	C	T	C	I	F							
62377	150	R	L	L	Q	S	L	L	V	L	R	R	R	P	C	S	R	O	G	S	G	L	P	T	P	G	A	F	A	F	H	T	E	F	I	N	V	P	V	G	C	T	C	V	L	P	R	S	V		

FIG. 7B

Figura 8



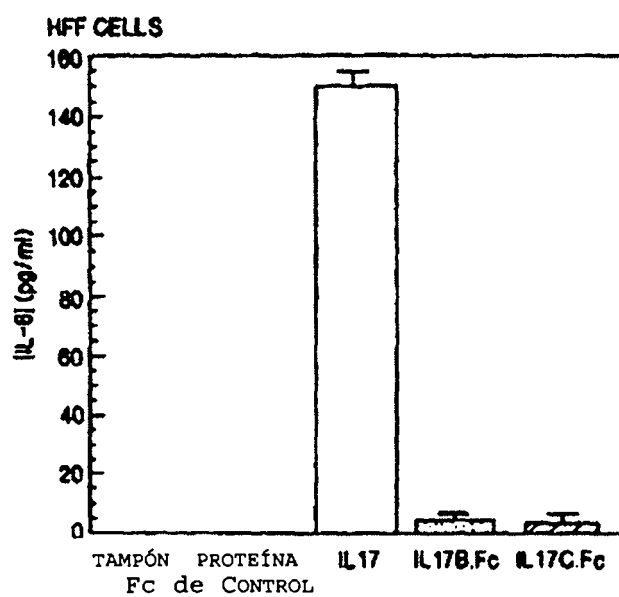


FIG. 9A

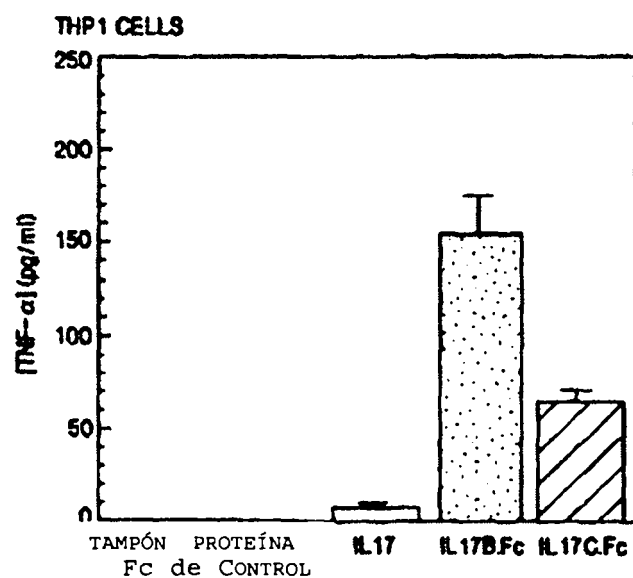
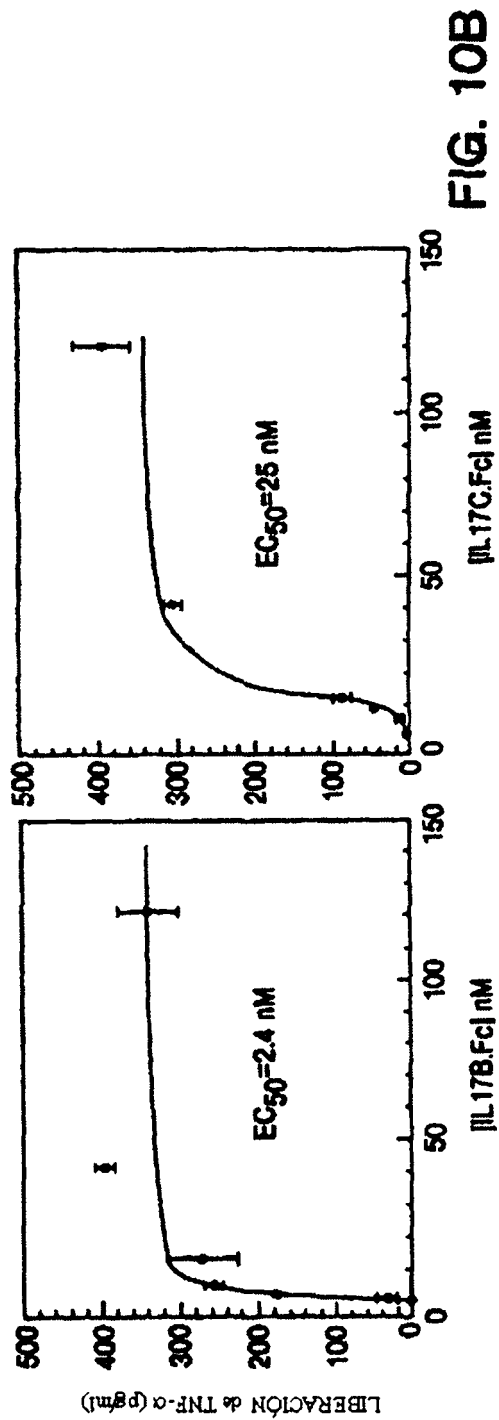
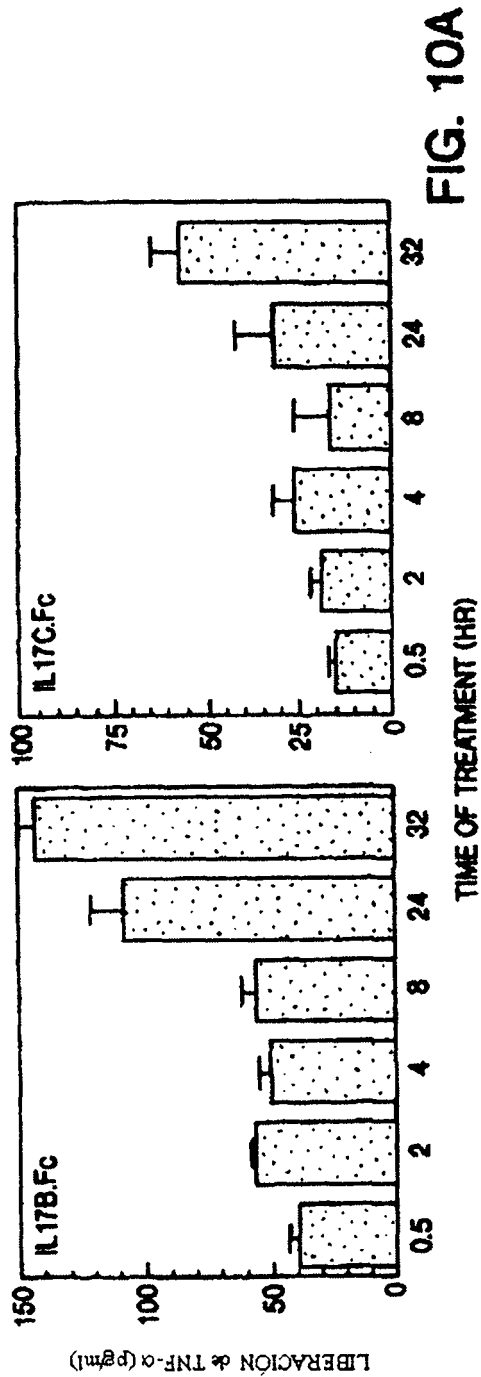


FIG. 9B



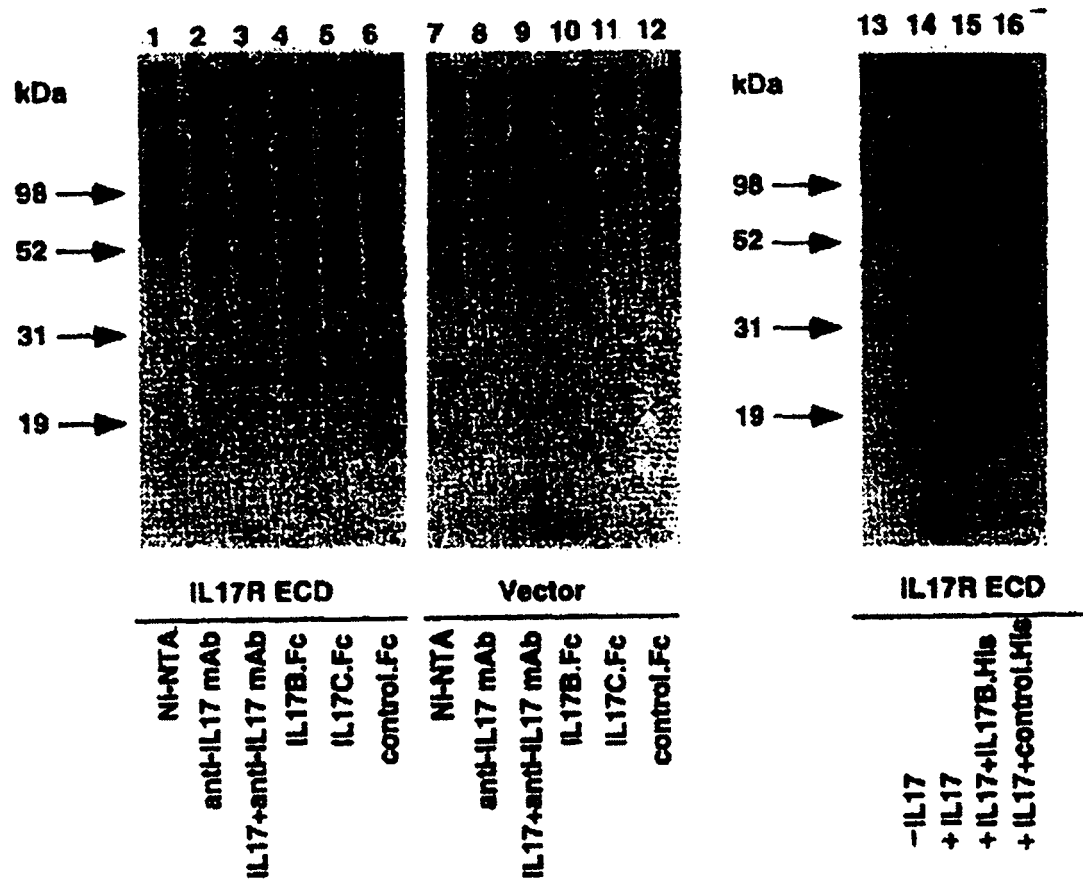


Figura 11A

Figura 11B

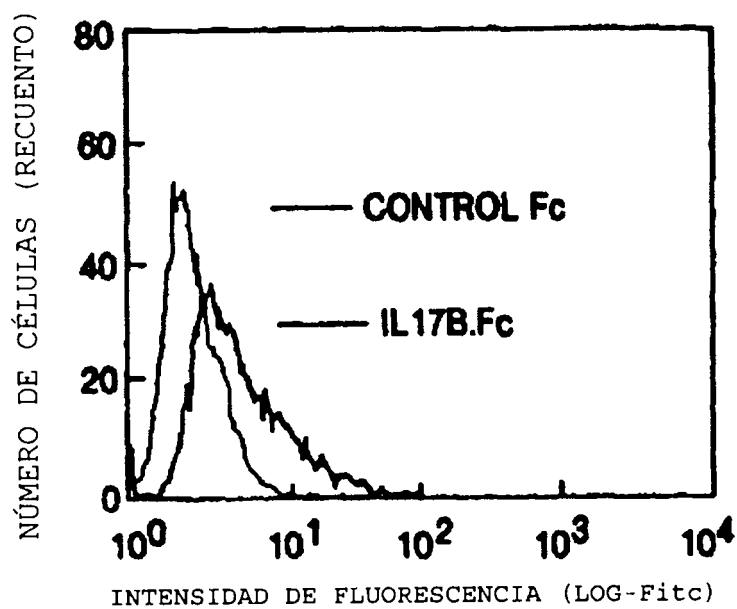


FIGURA 12A

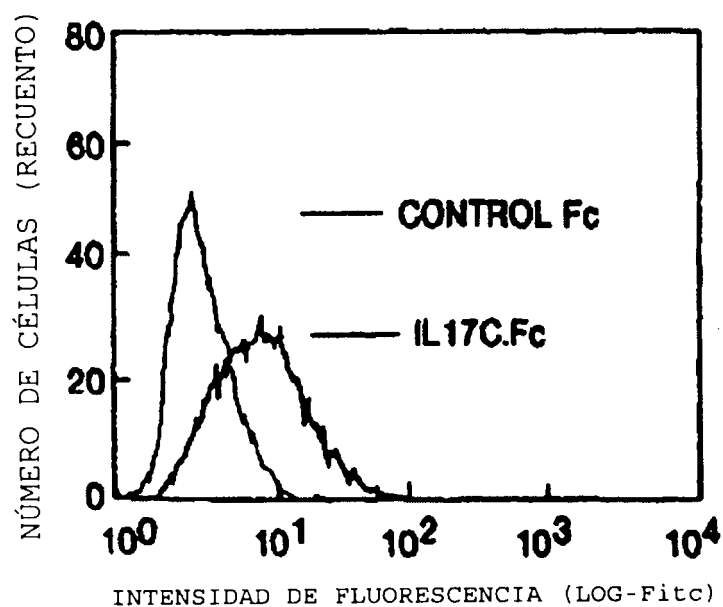


FIGURA 12B

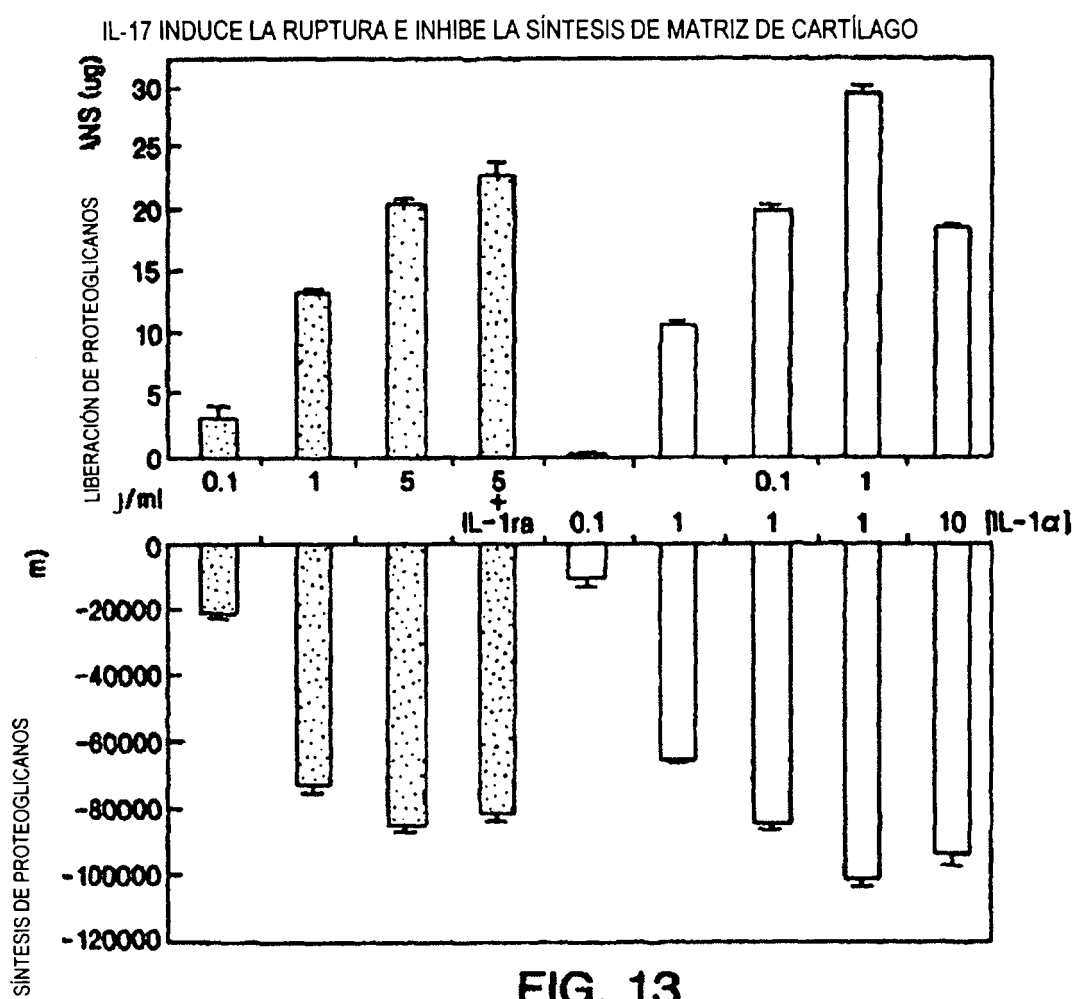


FIG. 13

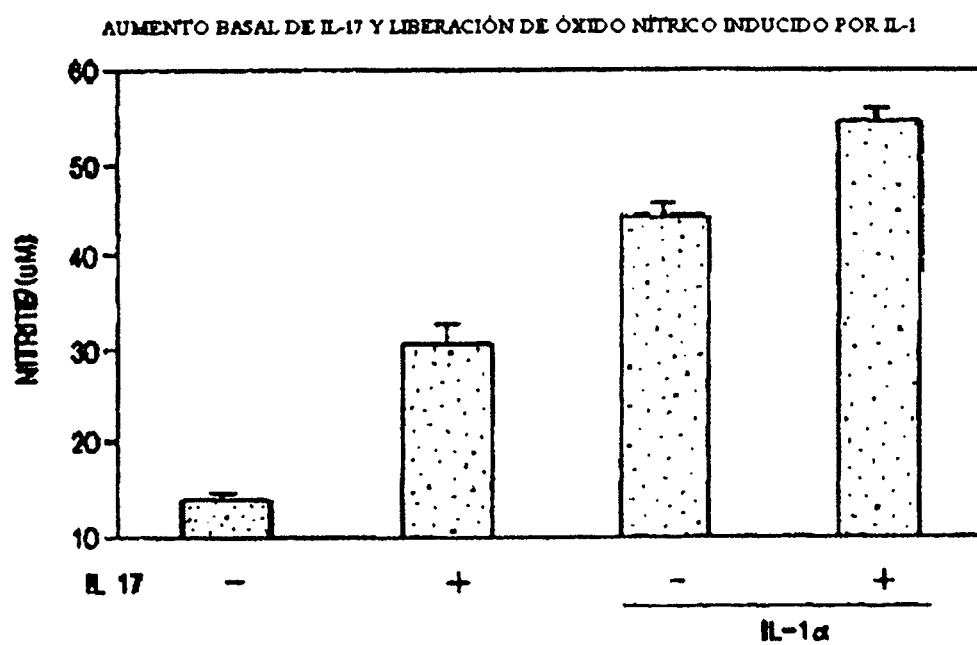


FIG. 14

INHIBITION OF NITRIC OXIDE RELEASE DOES NOT BLOCK THE DETRIMENTAL EFFECTS OF IL 17 ON MATRIX BREAKDOWN OR SYNTHESIS

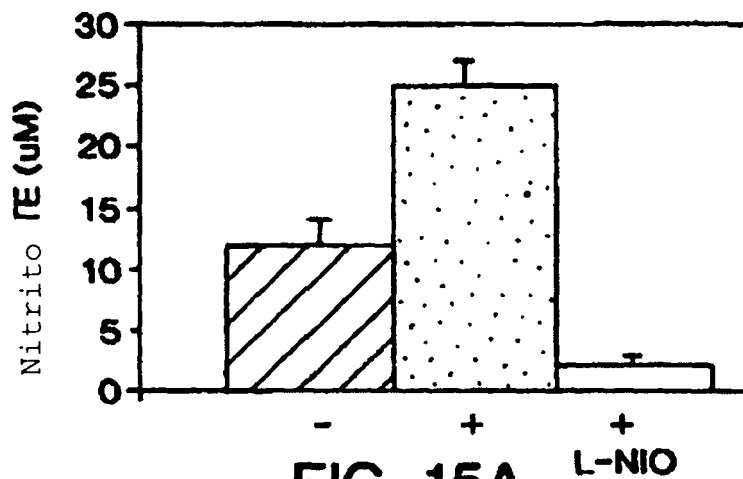


FIG. 15A

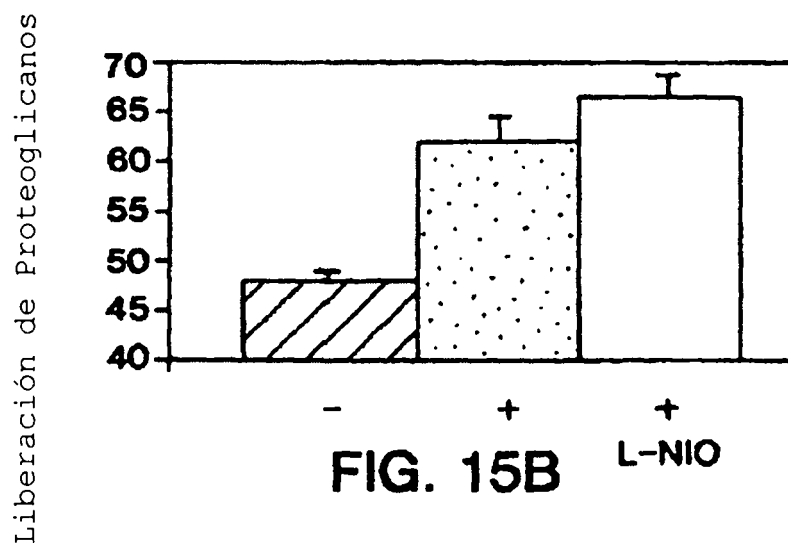


FIG. 15B

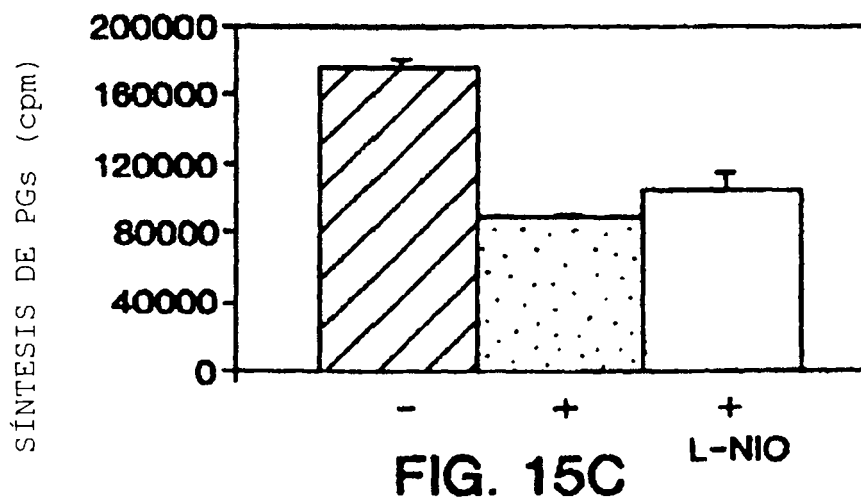


FIG. 15C

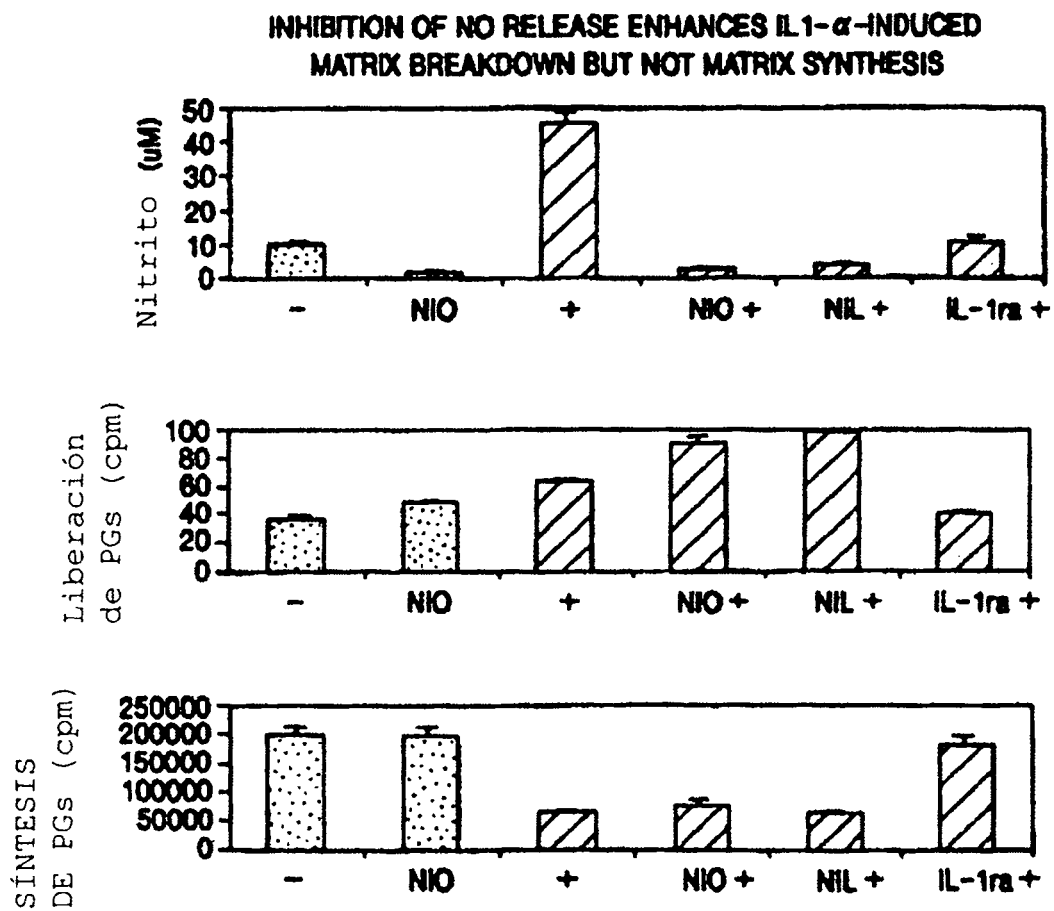


FIG. 16

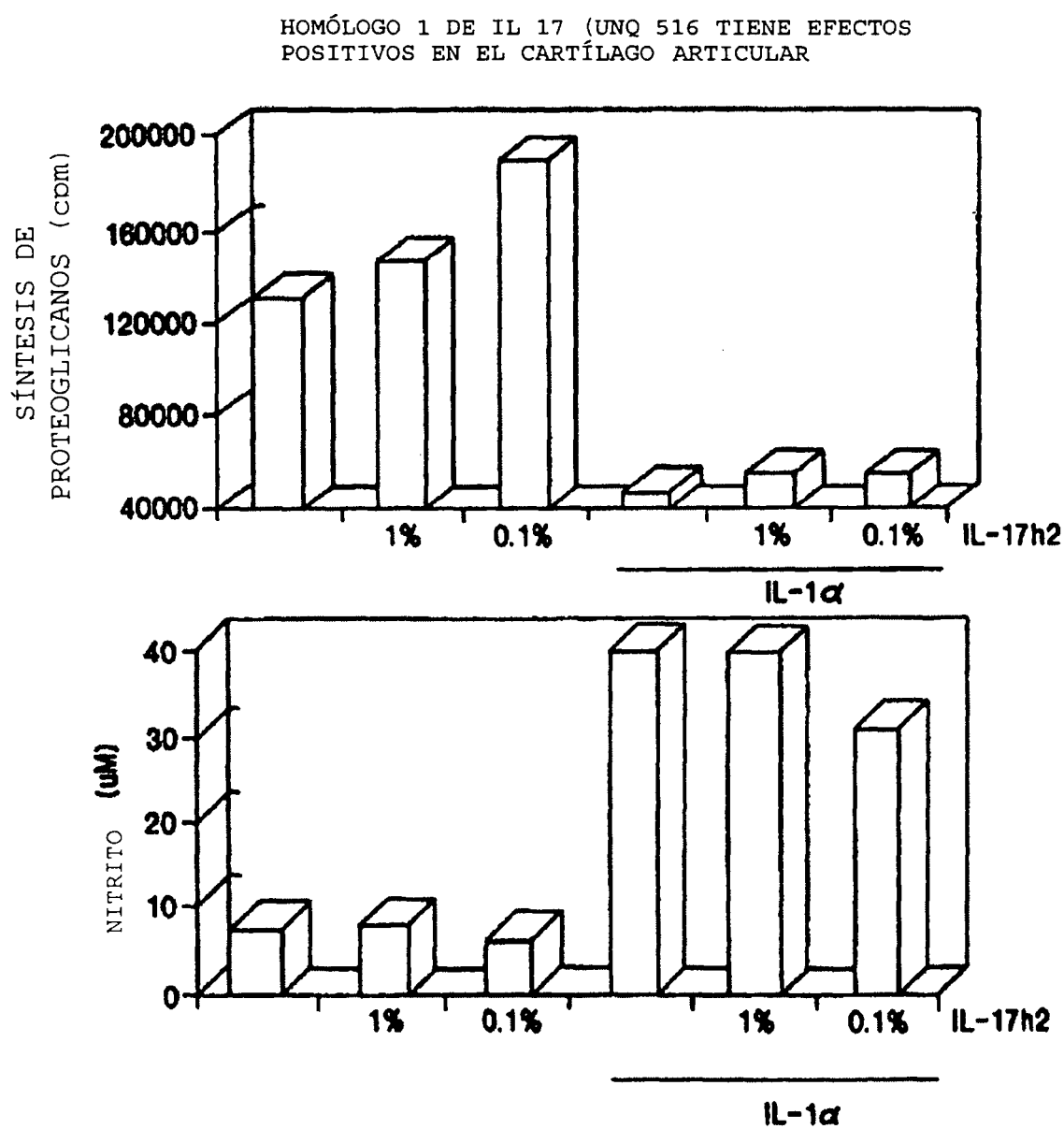


FIG. 17

Figura 18

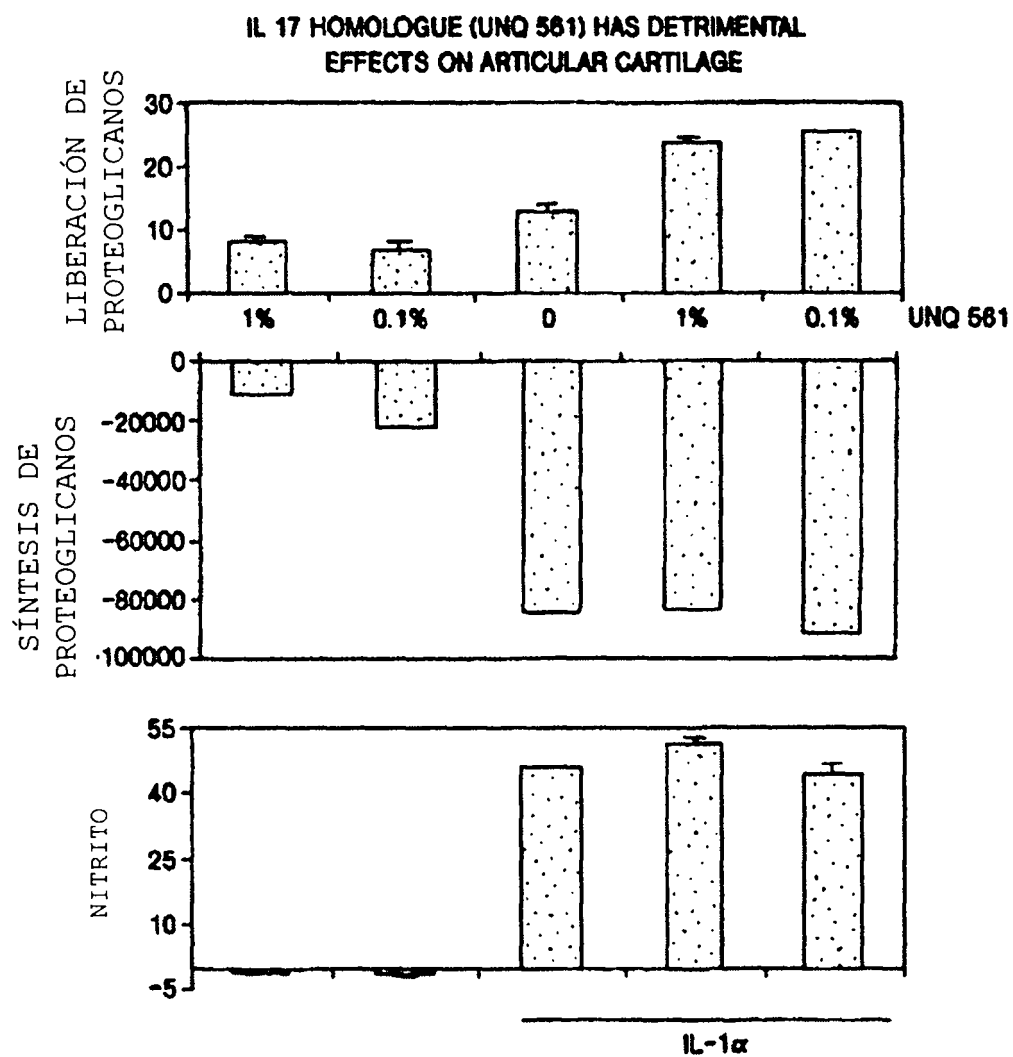


FIG. 18

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Chen, Jian
 Filvaroff, Ellen
 Goddard, Audrey
 Gurney, Austin
 Li, Hanzhong
 Wood, William I.

10 <120> POLIPÉPTIDOS HOMÓLOGOS IL-17 Y UTILIZACIONES TERAPÉUTICAS

<130> P1381-R1

15 <141> 1999-05-14

<150> US 60/085,579

20 <151> 1998-05-15

<150> US 60/113,621

<151> 1998-12-23

25 <160> 26

<210> 1

30 <211> 180

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 1

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

ES 2 292 242 T3

Asn His Asp Pro Ser Arg Ile Pro Val Asp Leu Pro Glu Ala Arg
 110 115 120
 5 Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val Asn Pro Phe Thr Met Gln Glu Asp
 125 130 135
 10 Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val Phe Ser Gln Val Pro Val Arg
 140 145 150
 Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Pro Arg Thr Gly Pro Cys Arg Gln
 155 160 165
 15 Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Ala Val Gly Cys Thr Cys Ile Phe
 170 175 180

20 <210> 2
 <211> 687
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

30 aggcgggacag cagctgcagg ctgacctgac agcttggcgg aatggactgg 50
 cctcacaaac tgctgtttct tcttaccatt tccatcttcc tggggctggg 100
 ccagcccagg agccccaaaa gcaagaggaa ggggcaaggg cggcctgggc 150
 35 ccctggcccc tggccctcac cagggtgccac tggacctggt gtcacggatg 200
 aaaccgtatg cccgcatgga ggagtatgag aggaacatcg aggagatggt 250
 ggcccagctg aggaacagct cagagctggc ccagagaaag tgtgaggtca 300
 40 acttgcagct gtggatgtcc aacaagagga gcctgtctcc ctggggctac 350
 agcatcaacc acgaccccag ccgtatcccc gtggacctgc cggaggcacg 400
 45 gtgectgtgt ctgggctgtg tgaaccctt caccatgcag gaggaccgca 450
 gcatggctgag cgtgccggtg ttcagccagg ttctgtgcg ccgccgcctc 500
 tgcccggcac cgcgccgcac agggccttgc cggcagcgcg cagtcatgga 550
 50 gaccatcgct gtgggctgca cctgcacctt ctgaatcacc tggcccagaa 600
 gccaggccag cagcccgaga ccatcctcct tgcaccttg tgccaagaaa 650
 55 ggccatgaa aagtaaacac tgacttttga aagcaag 687

<210> 3
 <211> 197
 60 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 292 242 T3

<400> 3

5	Met Thr Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu Thr Trp Leu His Thr	1 5 10 15
	Cys Leu Ala His His Asp Pro Ser Leu Arg Gly His Pro His Ser	20 25 30
10	His Gly Thr Pro His Cys Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Pro Leu Gly	35 40 45
	Gln Ala Pro Pro His Leu Leu Ala Arg Gly Ala Lys Trp Gly Gln	50 55 60
15	Ala Leu Pro Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Glu Ala Ala Ser His	65 70 75
	Arg Gly Arg His Glu Arg Pro Ser Ala Thr Thr Gln Cys Pro Val	80 85 90
20	Leu Arg Pro Glu Glu Val Leu Glu Ala Asp Thr His Gln Arg Ser	95 100 105
	Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Arg Val Asp Thr Asp Glu Asp Arg Tyr	110 115 120
25	Pro Gln Lys Leu Ala Phe Ala Glu Cys Leu Cys Arg Gly Cys Ile	125 130 135
	Asp Ala Arg Thr Gly Arg Glu Thr Ala Ala Leu Asn Ser Val Arg	140 145 150
30	Leu Leu Gln Ser Leu Leu Val Leu Arg Arg Arg Pro Cys Ser Arg	155 160 165
	Asp Gly Ser Gly Leu Pro Thr Pro Gly Ala Phe Ala Phe His Thr	170 175 180
35	Glu Phe Ile His Val Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Leu Pro Arg	185 190 195
40	Ser Val	197

45 <210> 4
 <211> 1047
 <212> ADN
 50 <213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 292 242 T3

<400> 4

5 gccaggtgtg caggccgctc caagcccagc ctgcccgcgt gccgccacca 50
tgacgctcct ccccggcctc ctgtttctga cctggctgca cacatgcctg 100
gcccaccatg acccctccct cagggggcac ccccacagtc acggtacccc 150
10 acactgctac tcggtgagg aactgcccct cggccaggcc cccccacacc 200
tgctggctcg aggtgccasg tgggggcagg ctttgcctgt agccctgggtg 250
tccagcctgg aggcagcaag ccacaggggg aggcacgaga ggccctcagc 300
15 tacgacccag tgcccgggtg tcgggcccga ggaggtgttg gaggcagaca 350
cccaccagcg ctccatctca ccctggagat accgtgtgga caccgatgag 400
gaccgctatc cacagaagct ggcccttcgcc gagtgcctgt gcagaggctg 450
20 tatcgatgca cggacggggc gcgagacagc tgcgctcaac tccgtgcggc 500
tgctccagag cctgctgggtg ctgcgcgcgc ggccctgctc ccgcgacggc 550
25 tcggggctcc ccacacctgg ggcccttcgcc tcccacaccg agttcatcca 600
cgtcccgcgc ggctgcacct gcgtgctgcc ccgttcagtg tgaccgccga 650
ggcgcgtgggg cccctagact ggacacgtgt gctcccaga gggcaccccc 700
30 tatttatgtg tatttattgt tatttatatg cctcccccaa cactacocctt 750
ggggctctggg cattccccgt gtctggagga cagcccccca ctgttctect 800
35 catctccagc ctcagtagtt gggggtagaa ggagctcagc acctcttcca 850
gcccttaaag ctgcagaaaa ggtgtcacac ggcgcctgt accttggctc 900
cctgtcctgc tcccggcttc ccttacccta tcactggcct caggcccccgc 950
40 aggtgcctc tcccacacct ccttgggaagt acccctgttt cttaaacaat 1000
tatttaagtg tacgtgtatt attaaactga tgaacacatc cccaaaa 1047

45 <210> 5
<211> 830
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
50
<220>
<221> desconocida
<222> 105-115
55 <223> base desconocida

60

65

ES 2 292 242 T3

<400> 5

```

5      ggacagcaggg accaagagag gcacgcttgc ccttttatga catcagagct 50
      cctgggttctt gctccttggg actctgggac ttacaccagt ggcacccctg 100
      gctcnnnnnn nnnnnaattc ggtacgaggg tggggttcag gcgggcagca 150
10     gctgcaggct gaccttgag cttggcgga tggactggcc tcacaacctg 200
      ctgtttcttc ttaccatttc catcttctct gggctgggct ayucayyay 250
      cccamaagc aagagggaag ggcaaggcg gcctgggcc ctggctccctg 300
15     gccctacca ggtgcaactg gacctgggtg cactgalyaa accgtatgcc 350
      cgcattggag agtatgagag gaacatcgag gagatgttgg ccagctgag 400
      gaacagtcca gagctggccc agagaaagtg tgaggtcaac ttgcagctgt 450
20     ggatgtccaa caagaggagc ctgtctccct ggggctacag catcaaccac 500
      gacccagctc gtatccccgl yyacutccgg aggcacggcg cctgtgtctg 550
25     ggcttgtgtg aacccctcca ccatgcagga ggaccgcagc atgggtgagcg 600
      tgcctgtgtt cayucayyct cctgtgcgcc gcctgctctg ccgcccacgg 650
      cccgcacag ggccttgccg ccagcgcgca gtcatggaga ccatcgtgt 700
30     gggctgcacc tgcattctct gaatcgacct ggcccagaag ccaggccagc 750
      agcccagagc catcctctct gcaccttctg gccaaagaaag gcttatgaaa 800
35     agtaaacact gacttttgaa agcaaaaaaa 830

```

<210> 6

<211> 397

40 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

45 <221> desconocida

<222> 10, 150, 267

<223> base desconocida

50

<400> 6

```

55     aggcgggcan agctgcaggc tgaccttgca gcttggcgga atggactggc 50
      ctcacaacct gctgtttctt cttaccattt ccatcttctt ggggctgggc 100
      agccaggagc cccaaaagca agagggaagg gcaaggggcg cctggggccn 150
60     tggcctggcc tcaccaggct cactggacc tgggtgcacg gatgaaaccg 200
      tatgcccgc tggaggagta tgagaggaa acatgaggaga tggtgggcca 250
      gctgagggaac agctcanaag ctggcccaga gaaagtgtga ggtcaacctg 300
65     cagctgtgga tgtccaacaa gaaggagcct gtctcccttg gggctacaag 350
      catcaaccac cgaccccgag cgtatccccg tgggaccttg ccgggac 397

```

ES 2 292 242 T3

	<210> 7	
	<211> 230	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<400> 7	
10	cacggatgag gaccgctatc cacagaagct ggcccttcgcc gagggcctgt 50	
	gcagaggctg tategatgca cggacgggcc gcgagacagc tgcgctcaac 100	
15	tccgtgcggc tgcctccagag cctgctgggtg ctgcgccgcc ggccctgctc 150	
	ccgcgacggc tcggggctcc ccacacctgg ggcccttcgcc ttcacacacg 200	
	agttcatcca cgtccccgtc ggctgcacct 230	
20	<210> 8	
	<211> 24	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia Artificial	
	<400> 8	
30	atccacagaa gctggccttc gccg	24
	<210> 9	
	<211> 24	
35	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<400> 9	
40	gggacgtgga tgaactcggg gtgg	24
	<210> 10	
45	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<400> 10	
	tatccacaga agctggcctt cgccgagtc ctgtgcagag	40
55	<210> 11	
	<211> 155	
	<212> PRT	
60	<213> Humana	
65		

ES 2 292 242 T3

<400> 11

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

35

<210> 12

40 <211> 408

<212> PRT

<213> Artificial

45 <220>

<223> Secuencia Artificial 1-408

50

55

60

65

ES 2 292 242 T3

<400> 12

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

ES 2 292 242 T3

	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	230	235	240
5	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	245	250	255
	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	260	265	270
10	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	275	280	285
	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	290	295	300
15	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	305	310	315
	Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	320	325	330
20	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	335	340	345
	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	350	355	360
25	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	365	370	375
30	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	380	385	390
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	395	400	405
35	Pro Gly Lys	408		

40 <210> 13
 <211> 425
 <212> PRT
 45 <213> Artificial
 <220>
 <223> Secuencia Artificial 1-425

50

55

60

65

ES 2 292 242 T3

<400> 13

Met Thr Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu Thr Trp Leu His Thr	1	5	10	15
Cys Leu Ala His His Asp Pro Ser Leu Arg Gly His Pro His Ser	20	25	30	
His Gly Thr Pro His Cys Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Pro Leu Gly	35	40	45	
Gln Ala Pro Pro His Leu Leu Ala Arg Gly Ala Lys Trp Gly Gln	50	55	60	
Ala Leu Pro Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Glu Ala Ala Ser His	65	70	75	
Arg Gly Arg His Glu Arg Pro Ser Ala Thr Thr Gln Cys Pro Val	80	85	90	
Leu Arg Pro Glu Glu Val Leu Glu Ala Asp Thr His Gln Arg Ser	95	100	105	
Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Arg Val Asp Thr Asp Glu Asp Arg Tyr	110	115	120	
Pro Gln Lys Leu Ala Phe Ala Glu Cys Leu Cys Arg Gly Cys Ile	125	130	135	
Asp Ala Arg Thr Gly Arg Glu Thr Ala Ala Leu Asn Ser Val Arg	140	145	150	
Leu Leu Gln Ser Leu Leu Val Leu Arg Arg Arg Pro Cys Ser Arg	155	160	165	
Asp Gly Ser Gly Leu Pro Thr Pro Gly Ala Phe Ala Phe His Thr	170	175	180	
Glu Phe Ile His Val Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Leu Pro Arg	185	190	195	
Ser Val Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	200	205	210	
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	215	220	225	
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val	230	235	240	
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	245	250	255	

ES 2 292 242 T3

	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	260	265	270
5	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	275	280	285
	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys	290	295	300
10	Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser	305	310	315
	Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro	320	325	330
15	Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	335	340	345
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu	350	355	360
20	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	365	370	375
	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	380	385	390
25	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val	395	400	405
30	Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	410	415	420
	Leu Ser Pro Gly Lys	425		

<210> 14

<211> 212

40 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

50

55

60

65

ES 2 292 242 T3

<400> 14

```

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

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

Gln Met
 212

```

50 <210> 15

<211> 320

<212> PRT

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

```

Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro Gly Pro Leu
 1           5           10           15
Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro Gly Gly
           20           25           30

```

65

ES 2 292 242 T3

	Ala Ser Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser Gln	
	35	40 45
5	Pro Gly Leu Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp	
	50	55 60
	Ser Trp Ile His Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp	
	65	70 75
10	Leu Gln Ile Gln Leu His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu	
	80	85 90
	Phe Pro Val Ala His Ile Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser	
	95	100 105
15	Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn	
	110	115 120
	Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu	
	125	130 135
20	Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe Thr Phe Ser His Phe Val	
	140	145 150
	Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr Val His His Leu Pro	
	155	160 165
	Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln Ser Lys Asn Phe	
	170	175 180
30	Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val Thr Thr Pro	
	185	190 195
	Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr Val Glu	
	200	205 210
35	Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp Asn	
	215	220 225
	Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met	
	230	235 240
40	Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro	
	245	250 255
	Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu	
	260	265 270
	Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro	
	275	280 285
50	Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr	
	290	295 300
	Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp	
	305	310 315
55	Tyr Met Pro Leu Trp	
	320	

60 <210> 16
 <211> 543
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 292 242 T3

<400> 16

5 atggactggc ctcacaacct gctgtttctt cttaccattt ccatcttcct 50
 ggggctgggc cagcccagga gcccanaag caagaggag gggcaagggc 100
 ggccctgggc cctggccctt ggccctcacc aggtgccact ggacctggtg 150
 10 tcacggatga aaccgtatgc ccgcattggag gagtatgaga ggaacatcga 200
 ggagatggtg gccagctga ggaacagctc agagctggcc cagagaaagt 250
 gtgaggtcaa cttgcagctg tggatgtcca acnagaggag cctgtctccc 300
 15 tggggctaca gcatcaacca cgaccccagc cgtatccccg tggacctgcc 350
 ggaggcacgg tgcctgtgtc tgggtgtgtg gaaccccttc accatgcagg 400
 20 aggaccgcag catggtgagc gtgccggtgt tcagccaggc tcctgtgcgc 450
 cgccgcctct gcccgccacc gccccgcaca gggccttgcc gccagcgcgc 500
 agtcattggag accatcgtg tgggtgcac ctgcatcttc tga 543

25 <210> 17

<211> 594

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 17

35 atgacgctcc tccccggcct cctgtttctg acctggctgc acacatgcct 50
 gggccaccat gacccctccc tcagggggca ccccacagt cacggtacc 100
 40 cacactgcta ctcggtgag gaactgcccc tcggccaggc cccccacac 150
 ctgctggctc aaagtgcaca gtgggggcag gctttgcctg tagccctggt 200
 gtccagcctg gaggcagcaa gccacagggg gaggcacgag aggccctcag 250
 45 ctacgaccca gfgcccggtg ctgcccggg aggaagttct ggaagcagac 300
 acccaccagc gctccatctc accctggaga taccgtgtgg acacggatga 350
 50 ggaccgctat ccadagagc tggccttcgc ctagtgcttg tgcagaggt 400
 gtatcgatgc acggacgggc cgcagacag ctgcgtcaa ctccgtgcgg 450
 ctgctccaga gctgctggt gctgcgccgc cggccctgct ccgcgcagg 500
 55 ctcggygctc cccacacctg gggcctttgc ctccacacc gagtccatcc 550
 acgtcccgct cggctgcacc tgcgtgctgc cccgttcagt gtga 594

60 <210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

65

<220>

<223> Secuencia artificial 1-9

ES 2 292 242 T3

<400> 18

Gly His His His His His His His His
1 5 9

<210> 19

<211> 157

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His
1 5 10 15

Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn
20 25 30

Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp
35 40 45

Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
50 55 60

Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu
65 70 75

Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys
80 85 90

Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr
95 100 105

Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu
110 115 120

Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu
125 130 135

Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val
140 145 150

Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
155 157

<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial 1-21

<400> 20

ctgtacctcg aggggtgcaga g

<210> 21

<211> 58

<212> ADN

<213> Artificial

21

ES 2 292 242 T3

<220>

<223> Secuencia artificial 1-58

5 <400> 21

cccaagcttg ggtcaatgat gatgatgatg atgatgatgc cacaggggca 50
tgtagtcc 58

10 <210> 22

<211> 328

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<400> 22

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

65

ES 2 292 242 T3

	Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro	
	245	250 255
5	Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu	
	260	265 270
	Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro	
	275	280 285
10	Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr	
	290	295 300
	Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp	
	305	310 315
15	Tyr Met Pro Leu Trp His His His His His His His His	
	320	325 328

<210> 23

20 <211> 175

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia artificial 1-175

30 <400> 23

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

ES 2 292 242 T3

<210> 24

<211> 206

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial 1-206

10

<400> 24

15	Met Thr Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu Thr Trp Leu His Thr	1 5 10 15
	Cys Leu Ala His His Asp Pro Ser Leu Arg Gly His Pro His Ser	20 25 30
20	His Gly Thr Pro His Cys Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Pro Leu Gly	35 40 45
	Gln Ala Pro Pro His Leu Leu Ala Arg Gly Ala Lys Trp Gly Gln	50 55 60
25	Ala Leu Pro Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Glu Ala Ala Ser His	65 70 75
	Arg Gly Arg His Glu Arg Pro Ser Ala Thr Thr Gln Cys Pro Val	80 85 90
30	Leu Arg Pro Glu Glu Val Leu Glu Ala Asp Thr His Gln Arg Ser	95 100 105
	Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Arg Val Asp Thr Asp Glu Asp Arg Tyr	110 115 120
35	Pro Gln Lys Leu Ala Phe Ala Glu Cys Leu Cys Arg Gly Cys Ile	125 130 135
40		
	Asp Ala Arg Thr Gly Arg Glu Thr Ala Ala Leu Asn Ser Val Arg	140 145 150
45	Leu Leu Gln Ser Leu Leu Val Leu Arg Arg Arg Pro Cys Ser Arg	155 160 165
	Asp Gly Ser Gly Leu Pro Thr Pro Gly Ala Phe Ala Phe His Thr	170 175 180
50	Glu Phe Ile His Val Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Leu Pro Arg	185 190 195
	Ser Val Gly His His His His His His His His	200 205 206

60 <210> 25

<211> 271

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

65

ES 2 292 242 T3

<400> 25

5	Met	Ala	Lys	Val	Pro	Asp	Met	Phe	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Cys	Tyr	1	5	10	15
	Ser	Glu	Asn	Glu	Glu	Asp	Ser	Ser	Ser	Ile	Asp	His	Leu	Ser	Leu	20	25	30	
10	Asn	Gln	Lys	Ser	Phe	Tyr	His	Val	Ser	Tyr	Gly	Pro	Leu	His	Glu	35	40	45	
	Gly	Cys	Met	Asp	Gln	Ser	Val	Ser	Leu	Ser	Ile	Ser	Glu	Thr	Ser	50	55	60	
15	Lys	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Phe	Lys	Glu	Ser	Met	Val	Val	Val	Ala	65	70	75	
	Thr	Asn	Gly	Lys	Val	Leu	Lys	Lys	Arg	Arg	Leu	Ser	Leu	Ser	Gln	80	85	90	
20	Ser	Ile	Thr	Asp	Asp	Asp	Leu	Glu	Ala	Ile	Ala	Asn	Asp	Ser	Glu	95	100	105	
	Glu	Glu	Ile	Ile	Lys	Pro	Arg	Ser	Ala	Pro	Phe	Ser	Phe	Leu	Ser	110	115	120	
25	Asn	Val	Lys	Tyr	Asn	Phe	Met	Arg	Ile	Ile	Lys	Tyr	Glu	Phe	Ile	125	130	135	
	Leu	Asn	Asp	Ala	Leu	Asn	Gln	Ser	Ile	Ile	Arg	Ala	Asn	Asp	Gln	140	145	150	
30	Tyr	Leu	Thr	Ala	Ala	Ala	Leu	His	Asn	Leu	Asp	Glu	Ala	Val	Lys	155	160	165	
35	Phe	Asp	Met	Gly	Ala	Tyr	Lys	Ser	Ser	Lys	Asp	Asp	Ala	Lys	Ile	170	175	180	
	Thr	Val	Ile	Leu	Arg	Ile	Ser	Lys	Thr	Gln	Leu	Tyr	Val	Thr	Ala	185	190	195	
40	Gln	Asp	Glu	Asp	Gln	Pro	Val	Leu	Leu	Lys	Glu	Met	Pro	Glu	Ile	200	205	210	
	Pro	Lys	Thr	Ile	Thr	Gly	Ser	Glu	Thr	Asn	Leu	Leu	Phe	Phe	Trp	215	220	225	
45	Glu	Thr	His	Gly	Thr	Lys	Asn	Tyr	Phe	Thr	Ser	Val	Ala	His	Pro	230	235	240	
	Asn	Leu	Phe	Ile	Ala	Thr	Lys	Gln	Asp	Tyr	Trp	Val	Cys	Leu	Ala	245	250	255	
50	Gly	Gly	Pro	Pro	Ser	Ile	Thr	Asp	Phe	Gln	Ile	Leu	Glu	Asn	Gln	260	265	270	
55	Ala															271			

<210> 26

<211> 177

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 292 242 T3

<400> 26

5	Met	Glu	Ile	Cys	Arg	Gly	Leu	Arg	Ser	His	Leu	Ile	Thr	Leu	Leu	1	5	10	15
	Leu	Phe	Leu	Phe	His	Ser	Glu	Thr	Ile	Cys	Arg	Pro	Ser	Gly	Arg	20	25	30	
10	Lys	Ser	Ser	Lys	Met	Gln	Ala	Phe	Arg	Ile	Trp	Asp	Val	Asn	Gln	35	40	45	
	Lys	Thr	Phe	Tyr	Leu	Arg	Asn	Asn	Gln	Leu	Val	Ala	Gly	Tyr	Leu	50	55	60	
15	Gln	Gly	Pro	Asn	Val	Asn	Leu	Glu	Glu	Lys	Ile	Asp	Val	Val	Pro	65	70	75	
20																			
	Ile	Glu	Pro	His	Ala	Leu	Phe	Leu	Gly	Ile	His	Gly	Gly	Lys	Met	80	85	90	
25	Cys	Leu	Ser	Cys	Val	Lys	Ser	Gly	Asp	Glu	Thr	Arg	Leu	Gln	Leu	95	100	105	
	Glu	Ala	Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Leu	Ser	Glu	Asn	Arg	Lys	Gln	Asp	110	115	120	
30	Lys	Arg	Phe	Ala	Phe	Ile	Arg	Ser	Asp	Ser	Gly	Pro	Thr	Thr	Ser	125	130	135	
	Phe	Glu	Ser	Ala	Ala	Cys	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Cys	Thr	Ala	Met	140	145	150	
35	Glu	Ala	Asp	Gln	Pro	Val	Ser	Leu	Thr	Asn	Met	Pro	Asp	Glu	Gly	155	160	165	
40	Val	Met	Val	Thr	Leu	Phe	Tyr	Phe	Gln	Glu	Asp	Glu				170	175	177	

LISTADO DE SECUENCIAS

45 <110> Genentech, Inc., *et al.*

50 <120> POLIPÉPTIDOS HOMÓLOGOS IL-17 Y UTILIZACIONES TERAPÉUTICAS DE LOS MISMOS

<130> P1381-R1

<140> PCT/US99/10733

55 <141> 1999-05-14

<150> US 60/085,579

<151> 1998-05-15

60 <150> US 60/113,621

<151> 1998-12-23

65 <160> 26

<210> 1

ES 2 292 242 T3

<211> 180
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 1

10

15

20

25

30

35

<210> 2
 <211> 687
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45

<400> 2

50

55

60

65

```

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

```

```

aggcgggcag cagctgcagg ctgaccttgc agcttgcgag aatggactgg 50
cttcacacac tgcctgttct tcttaccatt tccatcttcc tggggctggg 100
ccagcccgag agcccaaaa gcagaggaa ggggcaaggg cggcctgggc 150
ccctggcccc tggccctcac cagtgccac tggacctggt gtcagggatg 200
aaaccgtatg cccgcattga ggagtatgag aggaacatcg aggagatggt 250
ggcccagctg aggaacagct cagagctggc ccagagaaaq tctgaggtca 300
acttgagct gtggatgtcc acaagaggga gctgtctcc ctggggtcac 350
agcaccacac acgaccccg cgtatcccc gtggacctgc cggaggcacg 400
gtgctgtgt ctgggtgtg tgaacctct caccatgcag gaggaccgca 450
gcatggtag cgtgcgggtg ttcagccagg ttctgtatcg ccgcgcctc 500
tgcccgccac cgcgccgac agggccttgc cgcctgcgca cagtcattga 550
gaccatcgt gtgggttca cctgcattct ctgaatnacc tggcccgaa 600
ggcaggcag cagcccgaga ccatctctct tgcaccttgc tggcaagaaa 650
ggcctatgaa agtaaacac tgacttttga agcaag 687

```

ES 2 292 242 T3

<210> 3

<211> 197

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

```

10      Met Thr Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu Thr Trp Leu His Thr
          1           5           10           15

      Cys Leu Ala His His Asp Pro Ser Leu Arg Gly His Pro His Ser
          20           25           30

15      His Gly Thr Pro His Cys Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Pro Leu Gly
          35           40           45

      Gln Ala Pro Pro His Leu Leu Ala Arg Gly Ala Lys Trp Gly Gln
          50           55           60

20      Ala Leu Pro Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Glu Ala Ala Ser His
          65           70           75

      Arg Gly Arg His Glu Arg Pro Ser Ala Thr Thr Gln Cys Pro Val
          80           85           90

25      Leu Arg Pro Glu Glu Val Leu Glu Ala Asp Thr His Gln Arg Ser
          95           100          105

      Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Arg Val Asp Thr Asp Glu Asp Arg Tyr
          110          115          120

30      Pro Gln Lys Leu Ala Phe Ala Glu Cys Leu Cys Arg Gly Cys Ile
          125          130          135

      Asp Ala Arg Thr Gly Arg Glu Thr Ala Ala Leu Asn Ser Val Arg
          140          145          150

35      Leu Leu Gln Ser Leu Leu Val Leu Arg Arg Arg Pro Cys Ser Arg
          155          160          165

      Asp Gly Ser Gly Leu Pro Thr Pro Gly Ala Phe Ala Phe His Thr
          170          175          180

40      Glu Phe Ile His Val Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Leu Pro Arg
          185          190          195

      Ser Val
          197

```

<210> 4

45 <211> 1047

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 4

```

      gccaggctgt caggccgcgc caagcccagc ctgcccgcct gccgccacca 50

      tgaagctcct ccccggccgc ctgtttctga ccttggctga cacatgcctg 100

55      gccnaccatg accctccct caagggtgac ccccacagtc accgtaccct 150

      acattgctac tcggctgagg aactgcctct cggccagacc ccccacacc 200

      tgcctgctcg aggtaccag tgggggcagg ccttgcctct accctcgtg 250

60      tccagcctcg aggtaccag ccacaggggg aggtaccaga qccctccagc 300

      taagaccagc tgcctgctgc tggggccagg gtaggtctctg gagggtaccga 350

      cccaccagcg ctccatctca ccttgagat accctctgga caggtatgag 400

65      gaccgtcttc caccaggtct ggccttcgac gattgcctgt gcaggtgtcg 450

```

ES 2 292 242 T3

5 tctcgtatgca cggacgggac gcgagacagc tgcgcctcacc tccgtgcggc 500
 tgcctccagag cctgcctggg ctcgpcctgac ggcctctgctc ccgcacggc 550
 10 tgggggctcc cccacccctgg ggcctctgctc ttcacacacg agttcactcca 600
 cgtcccccgtc ggcctgcacct ggcctgcctgac ccgttccagtc tgcacggcga 650
 ggcctgctggg cccctagact ggcacacgctc gctcccccga ggcacccccc 700
 15 tctctatgctg tctctatgctg tctctatgctg cctcccccga cactacccctc 750
 ggcctctgctg cctcccccgtc gctcggagga cagcccccga cgtctctctc 800
 cactctccagc ctcagtctgt ggcctgtagaa ggcctctcagc accctctctca 850
 ggcctctaaag ctcctagaaa ggcctctcagc ggcctgctgt accctgctctc 900
 20 cctgctctgc tcccgcttc ccttaccctc tctctgctc cagcccccga 950
 aggcctgctc tcccccacct ccttggagct accctgcttc ccttaccctc 1000
 tcttctagctg tctgctgctt ccttaccctc tcttaccctc ccccccga 1047

<210> 5
 <211> 830
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> desconocida
 30 <222> 105-115
 <223> base desconocida

<400> 5

35 ggcacgaggg accacgagag ggcacgcttc cctctctatga cactcagagct 50
 cctgctcttc gctcctctggg accctgcttc tcttaccctg ggcacccctc 100
 40 ggcacacacac ccttaccctc ggcacgaggg tgcctctcag ggcacgagga 150
 ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc tgcacgaggg tgcacgaggg 200
 cctgctcttc tcttaccctc cactctcttc ggcacgaggg ggcacgaggg 250
 45 ccccccacct ccttaccctc ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 300
 ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 350
 cgcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 400
 50 ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 450
 ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 500
 ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 550
 55 ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 600
 tgcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 650
 ccccccacct ccttaccctc ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 700
 60 ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 750
 ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 800
 ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ggcacgaggg ccttaccctc 830

65 <210> 6
 <211> 397

ES 2 292 242 T3

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<221> desconocida

<222> 10, 150, 267

<223> base desconocida

10

<400> 6

```

atggcggggcag agctgcaggc tgaccttgcg gcttggcggg atggaactggc 50
ctcaaaacct gcctgtttctt cttaccattt ccatctctctt ggggctgggc 100
atccagggggc cctaaaagca agaggagggg gcaaggggcg cctgggcccc 150
tggtctgggc tcaccaggct ccactgggac tgggtgtcac gatgaaccg 200
tatgtccgca tggaggggta tgagaggaa atcgaaggag tggctggcca 250
gtcgaaggaa agctcaaaag ctggcccgga gaaggtgtga ggtcgaactg 300
cagctgtgga tgtccaaaca gaagggagct gtctcccttg ggcctacaa 350
catcaaccac cgtacccagc cgtatcccc tgggaccttg ccgggac 397

```

15

20

25

<210> 7

<211> 230

30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35

<221> Secuencia Artificial 1-230

<400> 7

```

cacggatgag gaccgctatc caccagaagc ggcctctggc gagtgcctgt 50
gcagagggctg tatcgatgca tggacgggac gcgagacagc tgcgctcaac 100
tccgtggggc tgtcccaagc cctgtctggc ctgcgcgcgc ggcctctgac 150
cctgcgacggc tgggggctcc ccaacacctg ggcctctgac ttcacacccg 200
agttcaatca cgtcccggtc ggcctgacct 230

```

40

45

<210> 8

<211> 24

50

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

55

<223> Secuencia Artificial 1-24

<400> 8

60

atccacagaa gtcggccttc gccg

24

<210> 9

<211> 24

65

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

ES 2 292 242 T3

<220>

<223> Secuencia Artificial 1-24

5 <400> 9

gggacgtgga tgaactcggg gtgg

24

10 <210> 10

<211> 40

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Secuencia Artificial 1-40

20 <400> 10

tatccacaga agctggcctt cgccgagtgc ctgtgcagag

40

25 <210> 11

<211> 155

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 11

35

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

55

<210> 12

<211> 408

60

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

65

<223> Secuencia Artificial 1-408

ES 2 292 242 T3

<400> 12

	Met Asp Trp Pro His Asn Leu Leu Phe Leu Leu Thr Ile Ser Ile	1	5	10	15
5	Phe Leu Gly Leu Gly Gln Pro Arg Ser Pro Lys Ser Lys Arg Lys	20	25	30	
	Gly Gln Gly Arg Pro Gly Pro Leu Ala Pro Gly Pro His Gln Val	35	40	45	
10	Pro Leu Asp Leu Val Ser Arg Met Lys Pro Tyr Ala Arg Met Glu	50	55	60	
	Glu Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Glu Met Val Ala Gln Leu Arg Asn	65	70	75	
15	Ser Ser Glu Leu Ala Gln Arg Lys Cys Glu Val Asn Leu Gln Leu	80	85	90	
	Trp Met Ser Asn Lys Arg Ser Leu Ser Pro Trp Gly Tyr Ser Ile	95	100	105	
20	Asn His Asp Pro Ser Arg Ile Pro Val Asp Leu Pro Glu Ala Arg	110	115	120	
	Cys Leu Cys Leu Gly Cys Val Asn Pro Phe Thr Met Gln Glu Asp	125	130	135	
25	Arg Ser Met Val Ser Val Pro Val Phe Ser Gln Val Pro Val Arg	140	145	150	
	Arg Arg Leu Cys Pro Pro Pro Pro Arg Thr Gly Pro Cys Arg Gln	155	160	165	
30	Arg Ala Val Met Glu Thr Ile Ala Val Gly Cys Thr Cys Ile Phe	170	175	180	
	Pro Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu	185	190	195	
35	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp	200	205	210	
	Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	215	220	225	
40	Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	230	235	240	
	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu	245	250	255	
45	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	260	265	270	
	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	275	280	285	
50	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	290	295	300	
	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser	305	310	315	
55	Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val	320	325	330	
	Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn	335	340	345	
60	Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	350	355	360	
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys	365	370	375	
65	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His	380	385	390	
	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	395	400	405	
	Pro Gly Lys	408			

ES 2 292 242 T3

<210> 13

<211> 425

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia Artificial 1-425

10

<400> 13

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

50

55

60

65

ES 2 292 242 T3

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 230 235 240
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 245 250 255
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 260 265 270
 Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 275 280 285
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 290 295 300
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 305 310 315
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 320 325 330
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 335 340 345
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 350 355 360
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 365 370 375
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 380 385 390
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 395 400 405
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 410 415 420
 Leu Ser Pro Gly Lys
 425

35
 <210> 14
 <211> 212
 <212> PRT
 40 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14

45 Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser
 1 5 10 15
 Leu Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val
 20 25 30
 50 Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln

55

60

65

ES 2 292 242 T3

	35	40	45
	Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile		
	50	55	60
5	Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser		
	65	70	75
	Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu		
	80	85	90
10	Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly		
	95	100	105
	Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu		
	110	115	120
15	Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser		
	125	130	135
	Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu		
	140	145	150
20	Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr		
	155	160	165
	Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln		
	170	175	180
25	Ala Gln Asn Gln Trp Leu Glu Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu		
	185	190	195
	Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg		
	200	205	210
30	Gln Met		
	212		

<210> 15

<211> 320

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

55

60

65

ES 2 292 242 T3

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

<210> 16

45 <211> 543

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 16

atggactggc ctcaaacctt gctgctctct cttaacattt ccatctctct 50
 ggggttgggc cagccacagg gccccanaag caagaggag gggcnaaggc 100
 ggcctgggac cctggccctt ggcctcacc aggtccact ggaacttggtg 150
 ttacggatga aacctatgc cgcctaggag gactatgaga ggaacatcga 200
 gtagatgggtg gccacgctga ggaacagctc agacttggcc cagagaaagt 250
 gtgagggtcaa ctctcagctg tggatgtcca acaagaggag cctgctctcc 300
 tggggctaca gcatcaacca cgaaccacgc cgtatccctg tgaacttgcc 350
 gtagggacgg tgcctgtgtc tgggtctctg gaacccttc acaatgcagg 400
 aggaccgcag catggtgngc atccggtgtc ccagccaggt tctgttgcgc 450
 cctcctctct gccgcacac gccctgcaca ggccttgcgc gccagcgagc 500
 agtcatggag accatgctg tggcttgcac ctgcctcttc tga 543

ES 2 292 242 T3

<210> 17

<211> 594

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

```

10      atgacgctcc tccccgccct cctgtttctg acctggctgc acacatgctt 50
      gggccacctc gacctctccc tcagggggca ccccccacgt caccgtaccc 100
      caccatgcta ctctggctga gaaatgcccc tctggccaggc cccccacac 150
15      ctgctggccc gaagtuccaa gtggggggcag gctttgcctg tagccctggt 200
      gtccagcctg gaggcagcaa gccacacggg gaggcagcag aagccctcay 250
      ctacgacctc gtgcccggct ctgctgcccg agggaggtgt ggaagcagac 300
20      acccaccagc gctccatctc acctcggaga taccgtctgg acacggatga 350
      ggaacctat ccacagagc tggcctctgc ccaatcccty tgaagaggtc 400
      gtatcgatgc acgacgggc cgcgagacag ctgctctcaa ctccgtcgg 450
25      ctgctccaga gctgctggt gctgcgcgc cggccctgct cccgcgacgg 500
      ctgggggtc cccacacctg gggcctttgc ctccacacc gagtccatcc 550
      acgtccctgt cggctctacc tgcgtgctgc cccgttcagt gtga 594

```

30

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial 1-9

40

<400> 18

45 Gly His His His His His His His His

1 5 9

<210> 19

<211> 157

50

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 292 242 T3

<400> 19

	Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His
	1				5					10					15
5	Val	Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn
				20					25						30
	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Arg	Asp
				35					40						45
10	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser
				50					55						60
	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Thr	His	Val	Leu
				65					70						75
15	Leu	Thr	His	Thr	Ile	Ser	Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys
				80					85						90
	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr
				95					100						105
20	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu
				110					115						120
	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu
				125					130						135
25	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val
				140					145						150
	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu								
				155			157								

30 <210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia artificial 1-21

40 <400> 20

ctgtacctcg aggggtgcaga g

21

45 <210> 21

<211> 58

<212> ADN

<213> Artificial

50

<220>

<223> Secuencia artificial 1-58

55 <400> 21

ccccaggcctg ggtcaatgat gatgatgatg atgatgatgc cacaggggc 5'

60

tgtatgtcc 58

<210> 22

<211> 328

<212> PRT

65

<213> *Homo sapiens*

ES 2 292 242 T3

<400> 22

5	Met Gly Ala Ala Arg Ser Pro Pro Ser Ala Val Pro Gly Pro Leu	1	5	10	15
	Leu Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Leu Ala Pro Gly Gly	20	25		30
10	Ala Ser Leu Arg Leu Leu Asp His Arg Ala Leu Val Cys Ser Gln	35	40		45
	Pro Gly Leu Asn Cys Thr Val Lys Asn Ser Thr Cys Leu Asp Asp	50	55		60
15	Ser Trp Ile His Pro Arg Asn Leu Thr Pro Ser Ser Pro Lys Asp	65	70		75
	Leu Gln Ile Gln Leu His Phe Ala His Thr Gln Gln Gly Asp Leu	80	85		90
20	Phe Pro Val Ala His Ile Glu Trp Thr Leu Gln Thr Asp Ala Ser	95	100		105
	Ile Leu Tyr Leu Glu Gly Ala Glu Leu Ser Val Leu Gln Leu Asn	110	115		120
25	Thr Asn Glu Arg Leu Cys Val Arg Phe Glu Phe Leu Ser Lys Leu	125	130		135
	Arg His His His Arg Arg Trp Arg Phe Thr Phe Ser His Phe Val	140	145		150
30	Val Asp Pro Asp Gln Glu Tyr Glu Val Thr Val His His Leu Pro	155	160		165
	Lys Pro Ile Pro Asp Gly Asp Pro Asn His Gln Ser Lys Asn Phe	170	175		180
35	Leu Val Pro Asp Cys Glu His Ala Arg Met Lys Val Thr Thr Pro	185	190		195
	Cys Met Ser Ser Gly Ser Leu Trp Asp Pro Asn Ile Thr Val Glu	200	205		210
40	Thr Leu Glu Ala His Gln Leu Arg Val Ser Phe Thr Leu Trp Asn	215	220		225
	Glu Ser Thr His Tyr Gln Ile Leu Leu Thr Ser Phe Pro His Met	230	235		240
45	Glu Asn His Ser Cys Phe Glu His Met His His Ile Pro Ala Pro	245	250		255
	Arg Pro Glu Glu Phe His Gln Arg Ser Asn Val Thr Leu Thr Leu	260	265		270
50	Arg Asn Leu Lys Gly Cys Cys Arg His Gln Val Gln Ile Gln Pro	275	280		285
	Phe Phe Ser Ser Cys Leu Asn Asp Cys Leu Arg His Ser Ala Thr	290	295		300
55	Val Ser Cys Pro Glu Met Pro Asp Thr Pro Glu Pro Ile Pro Asp	305	310		315
	Tyr Met Pro Leu Trp His His His His His His His His	320	325		328

60 <210> 23
 <211> 175
 <212> PRT
 <213> Artificial
 65 <220>

ES 2 292 242 T3

<223> Secuencia artificial 1-175

<400> 23

```

5
    ile phe leu gly leu gly gln pro arg ser pro lys ser lys arg
      1           5           10           15

10
    lys gly gln gly arg pro gly pro leu ala pro gly pro his gln
      20           25           30

    val pro leu asp leu val ser arg met lys pro tyr ala arg met
      35           40           45

15
    glu glu tyr glu arg asn ile glu glu xer val ala gln leu arg
      50           55           60

20
    asn ser ser glu leu ala gln arg lys cys glu val asn leu gln
      65           70           75

    leu trp met ser asn lys arg ser leu ser pro trp gly tyr ser
      80           85           90

25
    ile asn his asp pro ser arg ile pro val asp leu pro glu ala
      95           100          105

    arg cys leu cys leu gly cys val asn pro phe thr met gln glu
      110          115          120

30
    asp arg ser met val ser val pro val phe ser gln val pro val
      125          130          135

    arg arg arg leu cys pro pro pro pro arg thr gly pro cys arg
      140          145          150

35
    gln arg ala val met glu thr ile ala val gly cys thr cys ile
      155          160          165

    phe gly his his his his his his his his
      170          175

```

40 <210> 24

<211> 206

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia artificial 1-206

50

55

60

65

ES 2 292 242 T3

<400> 24

5	Met Thr Leu Leu Pro Gly Leu Leu Phe Leu Thr Trp Leu His Thr	1 5 10 15
	Cys Leu Ala His His Asp Pro Ser Leu Arg Gly His Pro His Ser	20 25 30
10	His Gly Thr Pro His Cys Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Pro Leu Gly	35 40 45
	Gln Ala Pro Pro His Leu Leu Ala Arg Gly Ala Lys Trp Gly Gln	50 55 60
15	Ala Leu Pro Val Ala Leu Val Ser Ser Leu Glu Ala Ala Ser His	65 70 75
	Arg Gly Arg His Glu Arg Pro Ser Ala Thr Thr Gln Cys Pro Val	80 85 90
20	Leu Arg Pro Glu Glu Val Leu Glu Ala Asp Thr His Gln Arg Ser	95 100 105
	Ile Ser Pro Trp Arg Tyr Arg Val Asp Thr Asp Glu Asp Arg Tyr	110 115 120
25		
	Pro Gln Lys Leu Ala Phe Ala Glu Cys Leu Cys Arg Gly Cys Ile	125 130 135
30	Asp Ala Arg Thr Gly Arg Glu Thr Ala Ala Leu Asn Ser Val Arg	140 145 150
	Leu Leu Gln Ser Leu Leu Val Leu Arg Arg Arg Pro Cys Ser Arg	155 160 165
35	Asp Gly Ser Gly Leu Pro Thr Pro Gly Ala Phe Ala Phe His Thr	170 175 180
	Glu Phe Ile His Val Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Leu Pro Arg	185 190 195
40	Ser Val Gly His His His His His His His His	200 205 206

<210> 25

45 <211> 271

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

55

60

65

ES 2 292 242 T3

<400> 25

```

5      Met Ala Lys Val Pro Asp Met Phe Glu Asp Leu Lys Asn Cys Tyr
      1          5          10          15

      Ser Glu Asn Glu Glu Asp Ser Ser Ser Ile Asp His Leu Ser Leu
      20          25          30

10     Asn Gln Lys Ser Phe Tyr His Val Ser Tyr Gly Pro Leu His Glu
      35          40          45

      Gly Cys Met Asp Gln Ser Val Ser Leu Ser Ile Ser Glu Thr Ser
      50          55          60

15     Lys Thr Ser Lys Leu Thr Phe Lys Glu Ser Met Val Val Val Ala
      65          70          75

      Thr Asn Gly Lys Val Leu Lys Lys Arg Arg Leu Ser Leu Ser Gln
      80          85          90

20     Ser Ile Thr Asp Asp Asp Leu Glu Ala Ile Ala Asn Asp Ser Glu
      95          100          105

      Glu Glu Ile Ile Lys Pro Arg Ser Ala Pro Phe Ser Phe Leu Ser
      110          115          120

25     Asn Val Lys Tyr Asn Phe Met Arg Ile Ile Lys Tyr Glu Phe Ile
      125          130          135

      Leu Asn Asp Ala Leu Asn Gln Ser Ile Ile Arg Ala Asn Asp Gln
      140          145          150

30     Tyr Leu Thr Ala Ala Ala Leu His Asn Leu Asp Glu Ala Val Lys

      155          160          165

35     Phe Asp Met Gly Ala Tyr Lys Ser Ser Lys Asp Asp Ala Lys Ile
      170          175          180

      Thr Val Ile Leu Arg Ile Ser Lys Thr Gln Leu Tyr Val Thr Ala
      185          190          195

40     Gln Asp Glu Asp Gln Pro Val Leu Leu Lys Glu Met Pro Glu Ile
      200          205          210

      Pro Lys Thr Ile Thr Gly Ser Glu Thr Asn Leu Leu Phe Phe Trp
      215          220          225

45     Glu Thr His Gly Thr Lys Asn Tyr Phe Thr Ser Val Ala His Pro
      230          235          240

      Asn Leu Phe Ile Ala Thr Lys Gln Asp Tyr Trp Val Cys Leu Ala
      245          250          255

50     Gly Gly Pro Pro Ser Ile Thr Asp Phe Gln Ile Leu Glu Asn Gln
      260          265          270

      Ala
      271

```

55 <210> 26

<211> 177

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 292 242 T3

<400> 26

5

Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu
1 9 10 15

Leu Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg
20 25 30

Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln
35 40 45

10

Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu
50 55 60

Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro
65 70 75

15

Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met
80 85 90

Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu
95 100 105

20

Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp
110 115 120

25

Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser
125 130 135

Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met
140 145 150

30

Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly
155 160 165

Val Met Val Thr Leu Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu
170 175 177

35

40

45

50

55

60

65