

(19)

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 281 704**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)**A61K 38/18** (2006.01)**A61K 39/395** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04007617 .6**(86) Fecha de presentación : **02.12.1999**(87) Número de publicación de la solicitud: **1484338**(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2004**(54) Título: **Procedimientos y compuestos para inhibir el crecimiento de células neoplásicas.**

(30) Prioridad: **22.12.1998 US 113296 P
08.03.1999 WO PCT/US99/05028
21.04.1999 US 130232 P
28.04.1999 US 131445 P
14.05.1999 US 134287 P
20.07.1999 US 144758 P
26.07.1999 US 145698 P
15.09.1999 WO PCT/US99/21090
15.09.1999 WO PCT/US99/21547**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2007

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

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

(72) Inventor/es: **Ashkenazi, Avi J.;
Goddard, Audrey;
Godowski, Paul J.;
Gurney, Austin L.;
Marsters, Scot A.;
Napier, Mary A.;
Pitti, Robert M. 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

Procedimientos y compuestos para inhibir el crecimiento de células neoplásicas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a procedimientos y compuestos para inhibir el crecimiento de células neoplásicas. En particular, la presente invención se refiere a compuestos antitumorales y a procedimientos para el tratamiento de tumores. La invención se refiere además a procedimientos de cribado para identificar compuestos inhibidores del crecimiento, por ejemplo compuestos antitumorales.

10 Antecedentes de la invención

15 Los tumores malignos (cánceres) constituyen la segunda causa principal de mortalidad en Estados Unidos, después de las cardiopatías (Boring y otros, *CA Cancel J. Clin.*, 43; 7 (1993)).

20 El cáncer se caracteriza por el aumento del número de células anómalas, o neoplásicas, procedentes de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de los tejidos contiguos por estas células tumorales neoplásicas y la generación de células malignas que a la larga se difunden a través del sistema circulatorio o el sistema linfático a los nódulos linfáticos regionales y a sitios alejados (metástasis). En una situación cancerosa, una célula prolifera en condiciones en las que las células normales no crecerían. El cáncer se manifiesta en una amplia variedad de formas, que se caracterizan por un grado distinto de capacidad invasora y agresividad.

25 A pesar de los recientes avances en el tratamiento del cáncer, es muy necesario hallar nuevos agentes terapéuticos capaces de inhibir el crecimiento de células neoplásicas. Por consiguiente, es el objetivo de la presente invención identificar compuestos capaces de inhibir el crecimiento de células neoplásicas, tales como las células cancerosas.

30 Los documentos WO 00/37284, WO 00/68380 y WO 00/69884, que se publicaron después de la fecha de presentación, notifican la identificación de secuencias similares a las del PRO320, del que se hace referencia en la presente.

35 Resumen de la invención

A. Realizaciones

35 La invención se refiere a medios para el tratamiento de tumores, incluidos cánceres, tales como el de mama, próstata, colon, pulmón, ovario, riñón y los cánceres del sistema nervioso central (SNC), leucemia, melanoma, etc., en mamíferos, preferiblemente humanos.

40 La presente invención se refiere a medios para el tratamiento de un tumor en un mamífero que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido PRO320 o un agonista del mismo, tal como se determina en las reivindicaciones. El tumor es preferiblemente un cáncer.

45 En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula tumoral que comprende exponer la célula a una cantidad eficaz de un polipéptido PRO320 o un agonista del mismo, tal como se determina en las reivindicaciones. En una realización particular, el agonista es un anticuerpo agonista anti-PRO320.

En una realización, la invención utiliza un anticuerpo agonista anti-PRO320.

50 Descripción breve de las figuras

50 La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N.º: 1) de un ADNc que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un PRO320 de secuencia natural, en el que la secuencia de nucleótidos (SEC ID N.º: 1) es un clon designado en la presente como ADN32284-1307. También se ofrecen en negrita y subrayado las posiciones de los respectivos codones de inicio y de terminación.

55 La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N.º: 2) de un polipéptido PR0320 de secuencia natural procedente de la secuencia codificante de la SEC ID N.º: 1 mostrada en la figura 1.

60 Descripción detallada de la invención

Cuando en la presente se utiliza la expresión polipéptido o proteína "PRO320" se incluyen polipéptidos PRO320 de secuencia natural y variantes del PRO320 (que además se determinan en la presente). El polipéptido PRO320 puede ser aislado a partir de una variedad de fuentes, tales como tipos de tejidos humanos o a partir de otra fuente, o preparado mediante procedimientos de recombinación y/o de síntesis.

65 Un "PRO320 de secuencia natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido PRO320 procedente de la naturaleza. Tal polipéptido PRO320 de secuencia natural puede ser aislado de la naturaleza o puede ser producido por medios de recombinación y/o síntesis.

La expresión “PRO320 de secuencia natural” incluye específicamente formas truncadas o secretadas de aparición natural (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de aparición natural (por ejemplo, formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas de aparición natural del polipéptido PRO320.

- 5 En una realización de la invención, el polipéptido PRO320 de secuencia natural es un polipéptido PRO320 de secuencia natural maduro o en toda su longitud tal como se muestra en la figura 2 (SEC ID N.º: 2). Asimismo, aunque el polipéptido PRO320 al que se hace referencia en la figura 2 (SEC ID N.º: 2) empieza con el residuo de metionina designado en ésta como posición 1 del aminoácido, es concebible y posible utilizar otro residuo de metionina localizado bien por encima o bien por debajo de la posición 1 del aminoácido de la figura 2 (SEC ID N.º: 2) como residuo de aminoácidos iniciador del polipéptido PRO320.

10 El “dominio extracelular” o “ECD” de un polipéptido al que se hace referencia en la presente se refiere a una forma del polipéptido que carece esencialmente de los dominios transmembrana y citoplásmico. Generalmente, un ECD de un polipéptido tendrá menos de aproximadamente un 1% de tales dominios transmembrana y/o citoplásmico y, preferiblemente, tendrá menos de aproximadamente un 0,5% de tales dominios. Se comprenderá que cualquier dominio, o dominios, transmembrana identificado para los polipéptidos de la presente invención es identificado conforme a los criterios utilizados de manera sistemática en la técnica para identificar aquel tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar pero lo más probable es que no lo hagan en más de unos 5 aminoácidos en cada extremo del dominio, tal como se identificó inicialmente y como se muestra en las figuras anexas. Como tal, en una realización de la presente invención, el dominio extracelular de un polipéptido de la presente invención comprende de 1 a X aminoácidos de la secuencia de aminoácidos madura, en la que X es cualquier aminoácido de los 5 aminoácidos de cada lado del límite dominio extracelular/dominio transmembrana.

15 25 La localización aproximada de los “péptidos señal” de los diversos polipéptidos PRO a los que se hace referencia en la presente se muestran en las figuras anexas. No obstante, se observa que el límite del extremo terminal C de un péptido señal puede variar, pero lo más probable es que no lo haga en más de unos 5 aminoácidos a cada lado del límite del extremo terminal C del péptido señal, tal como se ha identificado inicialmente en la presente, en el que el límite del extremo terminal C del péptido señal puede ser identificado conforme a los criterios utilizados de manera sistemática en la técnica para identificar aquel tipo de elemento de la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y otros, *Prot. Eng.*, 10: 1-6 (1997) y von Heinje y otros, *Nucl. Acids. Res.*, 14: 4.683-4.690 (1986)). Además, también se ha observado que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal procedente de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, por lo que se produce más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, en los que el péptido señal es escindido en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cada lado del límite del extremo terminal C del péptido señal, tal como se ha identificado en la presente, y los polinucleótidos que los codifican, son contemplados por la presente invención.

30 40 El “polipéptido de la variante PRO320” hace referencia a un polipéptido PRO320 activo (distinto de un polipéptido PRO320 de secuencia natural) tal como se define posteriormente, que tiene por lo menos aproximadamente una identidad de la secuencia de aminoácidos del 80% con la secuencia de aminoácidos de: (a) de 1 o de aproximadamente 22 a 338 residuos del polipéptido PRO320 representado en la figura 2 (SEC ID N.º: 2), (b) de X a 338 residuos del polipéptido PRO320 representado en la figura 2 (SEC ID N.º: 2), en la que X es cualquier residuo de aminoácidos del 17 al 26 de la figura 2 (SEC ID N.º: 2), o (c) otro fragmento procedente específicamente de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 2 (SEC ID N.º: 2).

45 50 Tales variantes PRO320 incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO320 en los que uno o más residuos de aminoácidos son añadidos, o eliminados, en los extremos terminales N o C, así como dentro de uno o más dominios internos de la secuencia natural.

55 60 Generalmente, una variante PRO320 tendrá por lo menos aproximadamente una identidad de la secuencia de aminoácidos del 80%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 81%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 82%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 83%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 84%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 85%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 86%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 87%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 88%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 89%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 90%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 91%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 92%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 93%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 94%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 95%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 96%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 97%, más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 98% y aún más preferiblemente una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos un 99% con: (a) de 1 o de aproximadamente 22 a 338 residuos del polipéptido PRO320 representado en la figura 2 (SEC ID N.º: 2), (b) de X a 338 residuos del polipéptido PRO320 representado en la figura 2 (SEC ID N.º: 2), en la que X es cualquier residuo de aminoácidos del 17 al 26 de la figura

ES 2 281 704 T3

2 (SEC ID N.º: 2), o (c) otro fragmento procedente específicamente de la secuencia de aminoácidos representada en la figura 2 (SEC ID N.º: 2).

Los polipéptidos de la variante PRO320 no incluyen la secuencia natural del polipéptido PRO320. Generalmente, 5 los polipéptidos de la variante PRO320 son de por lo menos una longitud de 10 aminoácidos, a menudo de por lo menos unos 20 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 30 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 40 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 50 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 60 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 70 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 80 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 90 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 100 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 150 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 200 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 250 aminoácidos de longitud, más a menudo de por lo menos unos 300 aminoácidos de longitud, o más.

15 Tal como se muestra posteriormente, la tabla 1 proporciona el código fuente completo para el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Este código fuente puede recopilarse de manera sistemática para utilizarlo en un sistema operativo UNIX que proporcione el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2.

20 Además, las tablas 2A-2D muestran ejemplos hipotéticos para utilizar el procedimiento descrito posteriormente para determinar la identidad de la secuencia de aminoácidos en % (tablas 2A-2B) y la identidad de la secuencia de ácidos nucleicos en % (tablas 2C-2D) utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que “PRO” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido PRO320 hipotético de interés; “proteína de comparación” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con la que se compara el polipéptido “PRO” de interés; “PRO-ADN” representa un PRO320 hipotético que codifica una secuencia de ácidos nucleicos de interés; 25 “ADN de comparación” representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácidos nucleicos con la que se compara la molécula de ácidos nucleicos “PRO-ADN” de interés; “X”, “Y” y “Z” representan cada una distintos residuos de aminoácidos hipotéticos; y “N”, “L” y “V” representan cada una distintos nucleótidos hipotéticos.

30

TABLA 1

```

/*
 *
35  * C-C increased from 12 to 15
  * Z is average of EQ
  * B is average of ND
  * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
40 #define _M -8 /* value of a match with a stop */

int day[26][26] = {
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0 },
/* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -3, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1 },
/* C */ { -2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, 2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5 },
/* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3 },
/* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3 },
/* F */ { -4, -5, -4, -6, -5, 9, -3, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -3, -5, -4, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -3 },
/* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, 3, 1, 0, 0, -1, 7, 0, -3, 0 },
/* H */ { -1, 1, -3, 1, 1, 2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2 },
/* I */ { -1, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2 },
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* K */ { -1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0 },
/* L */ { -2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 1, -2, 0, -1, -2 },
/* M */ { -1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, 4, 0, -2, 1 },
/* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, 4, 0, -2, 1 },
/* O */ { _M, _M },
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, 6, 0, -3, 0 },
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -3, 0, -4, 3 },
/* R */ { -2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0 },
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, 2, 0, -3, 0 },
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0 },
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2 },
/* W */ { -6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -3, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -3, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6 },
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0 },
/* Y */ { -3, -3, 0, -4, -4, 7, -3, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -3, -4, -4, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4 },
/* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4 }
}:

```

ES 2 281 704 T3

```

/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

5      #define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPI      1024     /* max jmps in an path */
#define MX      4      /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

10     #define DMAT      3      /* value of matching bases */
#define DMIS      0      /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0     8      /* penalty for a gap */
#define DINS1     1      /* penalty per base */
#define PINS0     8      /* penalty for a gap */
#define PINS1     4      /* penalty per residue */

20     struct jmp {
        short      n[MAXJMP];    /* size of jmp (neg for delay) */
        unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
        };                      /* limits seq to 2^16 - 1 */

25     struct diag {
        int      score;        /* score at last jmp */
        long     offset;       /* offset of prev block */
        short    ijmp;         /* current jmp index */
        struct jmp      jp;    /* list of jmps */
        };

30     struct path {
        int      spc;          /* number of leading spaces */
        short    n[JMPI];      /* size of jmp (gap) */
        int      x[JMPI];      /* loc of jmp (last elem before gap) */
        };

35     char      *ofile;        /* output file name */
char      *names[2];      /* seq names: getseqs() */
char      *prog;          /* prog name for err msgs */
char      *seqs[2];        /* seqs: getseqs() */
int      dmax;          /* best diag: nw() */
40     int      dmax0;        /* final diag */
int      dns;            /* set if dns: main() */
int      endgaps;        /* set if penalizing end gaps */
int      gapx, gapy;     /* total gaps in seqs */
int      len0, len1;      /* seq lens */
int      ngapx, ngapy;   /* total size of gaps */
int      smax;          /* max score: nw() */
int      *xdm;           /* bitmap for matching */
long     offset;          /* current offset in jmp file */
struct  diag      *dx;    /* holds diagonals */
struct  path      pp[2];  /* holds path for seqs */

45

50     char      *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char      *getseq(), *g_malloc();

```

55

60

65

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';' '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    int    ac;
    char   *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = genseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = genseq(namex[1], &len1);
    xdm = (dm)? _dbval : _pbval;

    cndgaps = 0;           /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";   /* output file */

    nw0;                  /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps0;             /* get the actual jmps */
    print0;                /* print stats, alignment */

    cleanup0;              /* unlink any tmp files */
}

```

55

60

65

ES 2 281 704 T3

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
5
nw0
10
{
    char      *px, *py;          /* seqs and pars */
    int       *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;     /* keep track of delx */
    int       *temp;           /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;             /* score for each type */
    int       ins0, ins1;      /* insertion penalties */
    register  id;             /* diagonal index */
    register  ij;             /* jmp index */
    register  *col0, *col1;    /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;         /* index into seqs */
15
20
    dx = (struct diag *)g_malloc("to get diag", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_malloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_malloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dnat)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dnat)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
30
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;           /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
35
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
40
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
50
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
55

```

60

65

...BW

```

5      for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
6          mis = col0[yy-1];
7          if (dna)
8              mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
9          else
10             mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];
11
12         /* update penalty for del in x seq:
13          * favor new del over ongoing del
14          * ignore MAXGAP if weighting endgaps
15          */
16         if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
17             if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
18                 dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
19                 ndely[yy] = 1;
20             } else {
21                 dely[yy] -= ins1;
22                 ndely[yy]++;
23             }
24         } else {
25             if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
26                 dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
27                 ndely[yy] = 1;
28             } else
29                 ndely[yy]++;
30         }
31
32         /* update penalty for del in y seq:
33          * favor new del over ongoing del
34          */
35         if (endgaps || ndelix < MAXGAP) {
36             if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
37                 delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
38                 ndelix = 1;
39             } else {
40                 delx -= ins1;
41                 ndelix++;
42             }
43         } else {
44             if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
45                 delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
46                 ndelix = 1;
47             } else
48                 ndelix++;
49         }
50
51
52         /* pick the maximum score; we're favoring
53          * mis over any del and delx over dely
54          */
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

```

...nw

```

5      id = xx - yy + len1 - 1;
      if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
          coll[yy] = mis;
      else if (delx >= dely[yy]) {
          coll[yy] = delx;
          ij = dx[id].ijmp;
          if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndelx >= MAXJMP
10      && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
              dx[id].ijmp++;
              if (++ij >= MAXJMP) {
                  writejmps(id);
                  ij = dx[id].ijmp = 0;
                  dx[id].offset = offset;
                  offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
              }
              dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
              dx[id].jp.x[ij] = xx;
              dx[id].score = delx;
20      }
      } else {
          coll[yy] = dely[yy];
          ij = dx[id].ijmp;
      }
25      if (dx[id].jp.n[0] && (ldna || (ndely[yy] >= MAXJMP
          && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
              dx[id].ijmp++;
              if (++ij >= MAXJMP) {
                  writejmps(id);
                  ij = dx[id].ijmp = 0;
                  dx[id].offset = offset;
                  offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
              }
              dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
              dx[id].jp.x[ij] = xx;
              dx[id].score = dely[yy];
35      }
      if (xx == len0 && yy < len1) {
          /* last col
          */
          if (endgaps)
              coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
          if (coll[yy] > smax) {
              smax = coll[yy];
              dmax = id;
          }
40      }
      }
      if (endgaps && xx < len0)
          coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
      if (coll[yy-1] > smax) {
          smax = coll[yy-1];
          dmax = id;
      }
45      tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
    }
50      (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)coll);
55      }
60      }

```

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
5   static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * numbs() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

15  #include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256   /* maximum output line */
#define P_SPC    3      /* space between name or num and seq */

20  extern  _day[26][26];
int    olen;           /* set output line length */
FILE   *fx;             /* output file */

printO
{
    int    ix, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
30    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", name[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", name[1], len1);
    olen = 60;
    ix = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spe = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spe;
    }
35    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spe = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        ix -= pp[1].spe;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        ix -= lastgap;
    }
40    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    }
45    getmat(ix, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
50}

```

55

60

65

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
5 static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap) getmat
{
10    int      lx, ly;          /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap; /* leading/trailing overlap */
{
15    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char     outx[32];
    double   pct;
    register int n0, n1;
    register char *p0, *p1;
20
25    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
30
35    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
40            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
50            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].n[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].n[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }
    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
55        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "%n");
    fprintf(fx, "< %d match %s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
            nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

55

60

65

ES 2 281 704 T3

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

10     if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
        }

20     /*
         * are we at next gap for this seq?
         */
        if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
            /*
             * we need to merge all gaps
             * at this location
             */
            siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
            while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];

30             ni[i]++;
        }
        ni[i]++;
    }

35    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
40}
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
45 static
dumpblock()
{
    register i;
50    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i] = '0';
}

```

55

60

65

```

...dumpblock
5
    (void) putc('\n', fx);
    for (i = 0; i < 2; i++) {
        if (*oui[i] && (*oui[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
            if (i == 0)
                num5(i);
            if (i == 0 && *oui[1])
                stars0;
            putline(i);
            if (i == 0 && *oui[1])
                sprintf(fx, star);
            if (i == 1)
                num5(i);
        }
    }
10
    /*
     * put out a number line: dumpblock()
     */
static
20
    num5(ix)
    int      ix;      /* index in oui[] holding seq line */
{
    char      nline[P_LINE];
    register  i, j;
    register char  *pn, *px, *py;
25
    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = oui[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
35
    }
    *pn = '0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
40
}
45
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
50
    int      ix;
{
    ...

```

55

60

65

```

...putline
5      int          i;
register char      *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

10     /* these count from 1:
      * ni[] is current element (from 1)
      * nc[] is number at start of current line
      */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
15     (void) putc('\n', fx);
}

20     /*
      * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
      */
static stars0
25     {
        int          i;
register char      *p0, *p1, cs, *px;

if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
    !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1]) == ' '))
    return;
px = star;
for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
    *px++ = ' ';
30     for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cs = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dns && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cs = '.';
            else
                cs = ' ';
40         }
        else
            cs = ' ';
        *px++ = cs;
    }
45     *px++ = '\n';
    *px = '0';
}

50     /*
      * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
      */
static stripname(pn)
55     char      *pn;      /* file name (may be path) */
{
    register char      *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
60     if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

65

```

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, seq len, len, maxlen
 * g_callc() -- callc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps. from jmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

5      char  *jname = "/tmp/hangXXXXXX";           /* tmp file for jmps */
FILE  *fj;

10     int   cleanup();                         /* cleanup tmp file */
long  lseek();

15     /*

20     * remove any tmp file if we blow
     */
cleanup()                                         cleanup
{
    int   i;
    if (6)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

25     /*

30     * read, return ptr to seq, seq len, len, maxlen
     * skip lines starting with ';' or '<' or '>'
     * seq in upper or lower case
     */
char  *
getseq(file, len)                                     getseq
{
    char  *file;  /* file name */
    int   *len;   /* seq len */
    {
        char  line[1024], *pseq;
        register char  *px, *py;
        int   natge, len;
        FILE  *fp;

40       if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
            exit(1);
        }
        len = natge = 0;
        while (fgetchar(line, 1024, fp)) {
            if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++)
                if (isupper(*px) || islower(*px))
                    len++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(len+6))) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, len+6, file);
            exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
    }
}

55

```

60

65

...getseq

```

5      py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

10     while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
            else if (islower(*px))
                *py++ = toupper(*px);
            if (index("ATGCU", *(py-1)))
                nacgc++;
        }
        *py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dns = nacgc > (tlen/3);
20     return(pseq+4);
}

```

g_calloc

```

25     char * g_calloc(msg, nx, sz)
        char *msg;           /* program, calling routine */
        int nx, sz;          /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

```

readjmps

```

35     /*
     * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax; main()
     */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (i0) {
        (void) fclose(i);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup();
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].jmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x(j) >= xx; j--)

```

55

60

65

```

5          py = pseq + 4;
*len = len;
rewind(fp);

10         while (fgets(line, 1024, fp)) {
            if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                if (isupper(*px))
                    *py++ = *px;
                else if (islower(*px))
                    *py++ = toupper(*px);
                if (index("ATGCUT", *(py-1)))
                    nacgc++;
            }
            *py++ = '\0';
            *py = '\0';
            (void) fclose(fp);
20         dna = nacgc > (len/3);
            return(pseq + 4);
        }

        char *
25         _calloc(msg, nx, sz)                                g_calloc
        char *msg;                                         /* program, calling routine */
        int nx, sz;                                         /* number and size of elements */
        {
            char *px, *calloc();
            if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                    fprintf(stderr, "%s: _calloc() failed %d (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                    exit(1);
                }
            }
            return(px);
        }

35         /* get final jmps from dx[] or jmp file, see pp[]), reset dmax; main()
 */
readjmps0                                         readjmps
40         {
            int d = -1;
            int six, i0, ii;
            register i, j, xx;
            if (i0) {
                (void) fclose(j);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                    fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                    cleanup();
                }
            }
            for (i = i0 = i = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
50                     for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                        ;
                }
            }
        }

```

55

60

65

```

...readjmps
5
    if (j < 0 && dx[dmax].offset && jj) {
        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
10
    }
    if (i >= JMPSS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx + yy + len1 - 1 */
            /*
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapx++;
            ngapx -= siz;
        }
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
    }
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
    siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
30
    i0++;
35
    }
    else
        break;
}
40
/* reverse the order of jmps
 */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
45
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
50
if (ff) {
    (void) unlink(name);
    ff = 0;
    offset = 0;
}
55
}

```

60

65

ES 2 281 704 T3

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw0
 */
5      writejmps(ix)                                writejmps
      {
        int      ix;
        char    *mktemp0;
10
        if (!fj) {
          if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp0 %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
          }
          if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
          }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
      }
20
```

TABLA 2A

25 PRO XXXXXXXXXXXXXXX (longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación XXXXXYYYYYY (longitud = 12
30 aminoácidos)
Identidad de la secuencia de aminoácidos en % = (el número
35 de residuos de aminoácidos con emparejamiento idéntico
entre las dos secuencias de polipéptidos, tal como
determina el ALIGN-2) dividido por (el número total de
40 residuos de aminoácidos del polipéptido PRO) = 5 dividido
por 15 = 33,3%

TABLA 2B

45 PRO XXXXXXXXXX (longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación XXXXXYYYYYYZZY (longitud = 15
50 aminoácidos)
Identidad de la secuencia de aminoácidos en % = (el número
55 de residuos de aminoácidos con emparejamiento idéntico
entre las dos secuencias de polipéptido, tal como se
determina mediante el ALIGN-2) dividido por (el número
60 total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO) = 5
dividido por 10 = 50%

ES 2 281 704 T3

TABLA 2C

PRO-ADN NNNNNNNNNNNNN (longitud = 14 nucleótidos)

5 ADN de comparación NNNNNNLLLLLLLL (longitud = 16
nucleótidos)

10 Identidad de la secuencia de ácidos nucleicos en % = (el
número de nucleótidos con emparejamiento idéntico entre
15 las dos secuencias de ácidos nucleicos, tal como se
determina mediante el ALIGN-2) dividido por (el número
total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos
PRO-ADN) = 6 dividido por 14 = 42,9%

20

TABLA 2D

25 PRO-ADN NNNNNNNNNNNN (longitud = 12 nucleótidos)

ADN de comparación NNNNLLLV (longitud = 9 nucleótidos)

30 Identidad de la secuencia de ácidos nucleicos en % = (el
número de nucleótidos con emparejamiento idéntico entre
35 las dos secuencias de ácidos nucleicos, tal como se
determina mediante el ALIGN-2) dividido por (el número
total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos
PRO-ADN) = 4 dividido por 12 = 33,3%

40 El “porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos” en cuanto a las secuencias del polipéptido PRO320
identificadas en la presente se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos de una secuencia de elección que
son idénticos a los residuos de aminoácidos de una secuencia PRO320, después de alinear la secuencias e introducir
espacios, si es necesario, para conseguir el porcentaje máximo de identidad de las secuencias, y sin contemplar ningu-
na sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. La alineación a fin de determinar el porcentaje
45 de identidad de la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de varias maneras que forman parte del estado de la
técnica, por ejemplo, utilizando un programa informático disponible tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2
o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para determinar la
alineación, incluido cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de toda la longitud
de las secuencias que se comparan. Para los propósitos de la presente, no obstante, los valores en % de la identidad
50 de la secuencia de aminoácidos se obtienen tal como se explica posteriormente utilizando el programa informático de
comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona
en la tabla 1. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es propiedad de Genentech, Inc., y el
código fuente representado en la tabla 1 ha sido presentado junto con la documentación del usuario en la U.S. Copy-
right Office, Washington D.C., 20559, donde se ha registrado como U.S. Copyright Registration No. TXU510087.
55 El programa ALIGN-2 se halla disponible en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse
a partir del código fuente proporcionado en la tabla 1. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un
sistema operativo UNIX, preferiblemente un sistema digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de
secuencias son establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

60 Para los propósitos de la presente, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia determinada
de aminoácidos A con, o frente a, una secuencia de aminoácidos determinada B (que puede expresarse alternativamente
como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o comprende cierto % de identidad de la secuencia de
aminoácidos con, o frente a, una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal como sigue:

65 100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos considerados emparejamientos idénticos por el programa de alinea-
ción de secuencias ALIGN-2 en aquella alineación de A y B del programa, y donde Y es el número total de residuos de

aminoácidos en B. Podrá apreciarse que dónde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad entre las secuencias de aminoácidos de A y B no será igual al % de identidad entre las secuencias de aminoácidos de B y A. Como ejemplos de cálculos del % de identidad de la secuencia de aminoácidos, las tablas 2A-2B muestran cómo calcular el % de identidad de la secuencia de aminoácidos entre la secuencia de aminoácidos designada “proteína de comparación” y la secuencia de aminoácidos designada “PRO”.

A no ser que se afirme específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de la secuencia de aminoácidos utilizados en la presente han sido obtenidos tal como se ha descrito anteriormente utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. No obstante, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos también puede determinarse utilizando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y otros, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3.389-3.402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 también puede descargarse en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. El NCBI-BLAST2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, todos los cuales parámetros de búsqueda han sido establecidos como valores por defecto entre los que se incluyen, por ejemplo, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity lenght = 15/5, multi-pass-value = 0.01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 y scoring matrix = BLOSUM62.

En situaciones en las que se emplea el NCBI-BLAST2 para comparar secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A con, o frente a, una secuencia de aminoácidos B determinada (que puede expresarse alternativamente como una secuencia de aminoácidos A determinada que tiene o comprende cierto % de identidad de la secuencia de aminoácidos con, o frente a, una secuencia determinada de aminoácidos B) se calcula tal como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción X/Y}$$

donde X el número de residuos de aminoácidos considerados con emparejamiento idéntico por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en aquella alineación de A y B del programa, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Podrá apreciarse que dónde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad entre las secuencias de aminoácidos de A y B no será igual al % de identidad entre las secuencias de aminoácidos de B y A.

Además, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos también puede determinarse utilizando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul y otros, *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996)). La mayor parte de los parámetros de búsqueda del WU-BLAST-2 han sido establecidos como valores por defecto. Los que no han sido establecidos como valores por defecto, es decir, como parámetros ajustables, han sido establecidos con los siguientes valores:

overlap span = 1, overlap fraction = 0.125, word threshold (T) = 11 y scoring matrix = BLOSUM62. Para los propósitos de la presente, un valor de % de identidad de la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo: (a) el número de residuos de aminoácidos con emparejamiento idéntico entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés procedente del polipéptido PRO natural y la secuencia de aminoácidos de interés de comparación (es decir, la secuencia frente a la cual se ha comparado el polipéptido PRO de interés, que puede ser una variante del polipéptido PRO), tal como se ha determinado en WU-BLAST-2, por (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la afirmación: “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene por lo menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés.

“Aislado”, cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos a los que se hace referencia en la presente, significa que el polipéptido ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Preferiblemente, el polipéptido aislado carece de asociación con todos los componentes con los cuales está naturalmente asociado. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que habitualmente interferirían en el diagnóstico o en los usos terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el polipéptido será purificado: (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos interna o del extremo terminal N mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye un polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que como mínimo faltará un componente del entorno natural de PRO320. Generalmente, no obstante, la preparación del polipéptido aislado requerirá como mínimo una etapa de purificación.

El término “anticuerpo” se utiliza en su sentido más amplio y abarca específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-PRO320 únicos (incluidos anticuerpos agonistas), compuestos de anticuerpos anti-PRO320 con especificidad polipeptídica, de cadena única, anticuerpos anti-PRO320, y fragmentos de anticuerpos anti-PRO320 (véase posteriormente). El término “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, todos los anticuerpos de la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de aparición natural que puedan presentarse en cantidades menores.

5 El término “epítopo *tagged*”, cuando se utiliza en la presente, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido PRO320 fusionado a un “polipéptido *tag*”. El polipéptido *tag* tiene suficientes residuos para proporcionar un epítopo contra el cual puede crearse un anticuerpo, aunque es lo bastante corto de modo que no interfiere en la actividad del polipéptido al cual se halla fusionado. Preferiblemente el polipéptido *tag* también es totalmente único, de tal modo que el anticuerpo no presenta reacción cruzada sustancial con otros epítulos. Los polipéptidos *tag* adecuados generalmente tienen por lo menos seis residuos de aminoácidos y normalmente entre unos 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre unos 10 y 20 residuos de aminoácidos).

10 Tal como se utiliza en la presente, el término “inmunoadhesina” designa moléculas parecidas a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión entre una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, que es distinta de la del sitio de identificación y unión del antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y una secuencia de dominios constantes de la inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua 15 que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. En la inmunoadhesina, la secuencia de dominios constantes de la inmunoglobulina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos de IgG-14, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluidas la IgA-1 y la IgA-2), IgE, IgD o IgM.

20 Para los propósitos de la presente, “activa” o “actividad” se refiere a una forma o formas de PRO320 que conservan actividad biológica y/o inmunológica del PRO320 natural o de aparición natural, en la que actividad “biológica” se refiere a una función biológica (bien inhibidora o estimuladora) causada por un PRO320 natural o de aparición natural diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigeníco poseído por un PRO320 natural o de aparición natural y actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigeníco poseído por un PRO320 natural o de aparición natural.

25 “Actividad biológica” en el contexto de un anticuerpo o de otro agonista que pueda ser identificado mediante los análisis de cribado descritos en la presente (por ejemplo, un péptido orgánico o inorgánico de molécula pequeña, etc.) se utiliza para referirse a la capacidad de tales moléculas para inducir uno o más de los efectos enumerados en la presente junto con la definición de una “cantidad terapéuticamente eficaz”. En una realización específica, “actividad biológica” es la capacidad de inhibir el crecimiento o la proliferación de células neoplásicas. Una actividad biológica preferida es la inhibición, que incluye el enlentecimiento o detención completa, del crecimiento de una célula tumoral diana (por ejemplo, cáncer). Otra actividad biológica preferida es la actividad citotóxica causante de la muerte de la célula tumoral diana (por ejemplo, cáncer). Y aún otra actividad biológica preferida es la inducción de apoptosis de una célula tumoral diana (por ejemplo, cáncer).

35 La expresión “actividad inmunológica” significa reactividad cruzada inmunológica con por lo menos un epítopo de un polipéptido PRO320.

40 Tal como se utiliza en la presente, “reactividad cruzada inmunológica” significa que el polipéptido de elección es capaz de inhibir competitivamente la actividad biológica cualitativa de un polipéptido PRO320 que tiene esta actividad con antisueros policlonales cultivados contra el conocido polipéptido PRO320 activo. Tales antisueros se preparan de manera convencional inyectando por vía subcutánea a cabras o conejos, por ejemplo, el conocido análogo activo en adyuvante completo de Freund, seguido de una inyección intraperitoneal o subcutánea de refuerzo en incompleto de Freund. La reactividad cruzada inmunológica es preferiblemente “específica”, lo que significa que la afinidad de unión de la molécula con reactividad cruzada inmunológica identificada (por ejemplo, anticuerpo) con el polipéptido PRO320 correspondiente es considerablemente más alta (preferiblemente por lo menos dos veces, más preferiblemente por lo menos cuatro veces, incluso más preferiblemente por lo menos unas seis veces, más preferiblemente por lo menos unas ocho veces más alta) que la afinidad de unión de aquella molécula con cualquier otro polipéptido natural conocido.

50 50 Tal como se utiliza en la presente, “tumor” se refiere a todo crecimiento o proliferación de células neoplásicas, independientemente de que sean malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

55 Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a, o describen, la enfermedad fisiológica en mamíferos que habitualmente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no exclusivamente, el carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma, y la leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres son el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de colon, el cáncer de células escamosas, el carcinoma microcítico de pulmón, el carcinoma no microcítico de pulmón, el cáncer de ovarios, el cáncer de cuello uterino, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer hepático, el cáncer de vejiga urinaria, el hepatoma, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial, el carcinoma de las glándulas salivales, el cáncer de riñón, el cáncer vulvar, el cáncer tiroideo, el carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

60 65 El “tratamiento” es una intervención que se lleva a cabo con la intención de prevenir la aparición de un trastorno o alterar su patología. Por consiguiente, el “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Entre los que requieren tratamiento se incluyen aquellos que ya sufren el trastorno, así como aquellos en quienes el trastorno tiene que prevenirse. En el tratamiento de un tumor (por ejemplo, cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de células tumorales, o hacer que las células tumorales sean más susceptibles al tratamiento con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, radiación y/o quimioterapia.

La “patología” de un cáncer incluye todos los fenómenos que afectan al bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación alguna, el crecimiento celular anómalo o descontrolado, la metástasis, la interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, la liberación de citocinas o de otros productos de secreción a concentraciones anómalas, la supresión o agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

5 Una “cantidad eficaz” del polipéptido descrito en la presente o de un agonista del mismo, en cuanto a la inhibición del crecimiento de células neoplásicas, es una cantidad capaz de inhibir, en mayor o menor grado, el crecimiento de células diana. El término incluye una cantidad capaz de inducir un efecto inhibidor, citostático y/o citotóxico sobre el crecimiento y/o apoptosis de las células diana. Puede determinarse empíricamente y de manera sistemática una “cantidad eficaz” de un polipéptido PRO320 o un agonista del mismo con la finalidad de inhibir el crecimiento de células neoplásicas.

10 Una “cantidad terapéuticamente eficaz”, en cuanto al tratamiento de un tumor, se refiere a una cantidad capaz de inducir uno o más de los siguientes efectos: (1) inhibición, en menor o mayor grado, del crecimiento del tumor, que incluye, enlentecimiento y detención completa del crecimiento; (2) reducción del número de células tumorales; (3) 15 reducción del tamaño del tumor; (4) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la infiltración de células tumorales a los órganos periféricos; (5) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de metástasis; (6) estimulación de la respuesta inmunitaria antitumoral, que puede, pero no necesariamente, dar lugar a la regresión o rechazo del tumor; y/o (7) alivio, en mayor o menor grado, de uno o más de los síntomas 20 asociados con el trastorno. Puede determinarse empíricamente y de manera sistemática una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un polipéptido PRO320 o de un agonista del mismo con la finalidad de inhibir el crecimiento de células neoplásicas.

25 Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un polipéptido PRO320 o de un agonista del mismo es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, en especial un tumor, por ejemplo, células cancerosas, bien *in vitro* o bien *in vivo*. Puede determinarse empíricamente y de manera sistemática una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un polipéptido PRO320 o de un agonista del mismo con la finalidad de inhibir el crecimiento de células neoplásicas.

30 Una “cantidad citotóxica” de un polipéptido PRO320 o de un agonista del mismo es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, en especial un tumor, por ejemplo, células cancerosas, bien *in vitro* o *in vivo*. Puede determinarse empíricamente y de manera sistemática una “cantidad citotóxica” de un polipéptido PRO320 o de un agonista del mismo con la finalidad de inhibir el crecimiento de células neoplásicas.

35 El término “agente citotóxico” tal como se utiliza en la presente se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y y ¹²⁶Re), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos.

40 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico de utilidad en el tratamiento de un tumor, por ejemplo, cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen la adriamicina, la doxorrubicina, la epirrubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina (“Ara-C”), la ciclofosfamida, el tiotepa, el busulfán, la citoxina, los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y el doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Rnace), el toxotere, el metotrexato, el cisplatino, el melfalán, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C, mitoxantrona, la vincristina, la vinorrelbina, el carboplatino, el 45 tenipósido, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (véase, patente de EE.UU. US 4.675.187), el melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. Los agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como el tamoxifeno y la onapristona.

50 Cuando se utiliza en la presente, un “agente inhibidor del crecimiento” se refiere a un compuesto que inhibe el crecimiento celular, especialmente de un tumor, por ejemplo, de células cancerosas, bien *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento reduce considerablemente el porcentaje de células diana en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un momento distinto de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Entre los bloqueantes clásicos de la fase M se incluyen vincas (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores de la topo II, tales como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Estos agentes que detienen G1 también causan la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, meclorretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede hallarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., capítulo I, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” de Murakami y otros, (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13.

60 El término “citocina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son las linfocinas, las monocinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas del crecimiento tales como la hormona de crecimiento humano, el N-metionil de la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovino; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelaxina; hormonas glucoproteínicas, tales como la hormona estimuladora del folículo (FSH), la hormona estimuladora del tiroides (TSH), y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático, el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; los factores de necrosis tumoral α y β ; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido aso-

ciado a la gonadotropina murina; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento de los nervios, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores transformadores del crecimiento (TGF), tales como TGF- α y TGF- β ; factores de crecimiento insulínico I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como el interferón α , β y γ ; factores estimulantes

5 de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de macrófagos granulocíticos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como el TNF- α o el TNF- β ; y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando kit (KL). Tal como se utiliza en la presente, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

10 Tal como se utiliza en esta solicitud de patente, el término "profármaco" se refiere a una forma precursora o derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que, comparada con el fármaco original, es menos citotóxica para las células tumorales y es capaz de ser activada enzimáticamente o convertida en la forma original más activa. Véase, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy", *Biochemical Society Transactions*, 14, págs. 375-382, 615th

15 Meeting Belfast (1986) y Stella y otros, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt y otros, (eds.), págs. 247-267. Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero no exclusivamente, profármacos que contienen fosfatos, profármacos que contienen tiofosfatos, profármacos glucosilados o profármacos que contienen fenilacetamida que opcionalmente puede ser sustituida, profármacos de 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina, que pueden derivar en una forma de profármaco para su uso en

20 la presente invención, incluyen, pero no exclusivamente, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

El término "agonista" incluye específicamente anticuerpos agonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de polipéptidos PRO320 naturales, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, etc.

25 Los procedimientos para la identificación de agonistas de un polipéptido PRO320 pueden comprender establecer contacto entre una célula tumoral y una posible molécula agonista, y determinar la inhibición del crecimiento de células tumorales.

30 La administración "crónica" se refiere a la administración continuada del agente o agentes en oposición a una dosis única, de tal modo que se mantenga el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período de tiempo prolongado. La administración "intermitente" es un tratamiento que no se realiza sucesivamente sin interrupción, sino que es más bien de naturaleza cíclica.

35 Para los propósitos de un tratamiento, "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos los humanos, los animales domésticos y de granja, así como los del zoológico, los utilizados en deportes, o las mascotas, tales como perros, gatos, ganado bovino, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

40 La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y sucesiva en cualquier orden.

Tal como se utiliza en la presente, "portadores" incluye portadores farmacéuticamente aceptables, excipientes o estabilizantes, que son no tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa de pH tamponado. Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de unos 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono como glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azucarados tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o surfactante no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

55 Los "anticuerpos naturales" y las "inmunoglobulinas naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de distintos isotipos de inmunoglobulina. Cada una de las cadenas pesada y ligera también presenta puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (VH) seguido de numerosos dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que hay residuos de aminoácidos concretos que forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

65 El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren mucho en la secuencia entre los distintos anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular en para su antígeno particular. No obstante, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones determinantes de complementariedad (CDR),

o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como en los de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones de entramado (*framework*, FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de hoja β , conectadas por tres CDR, que forman bucles que conectan la estructura de hoja β y, en algunos casos, forman parte de la misma. Las CDR de cada cadena se mantienen juntas muy próximas a las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase, Kabat y otros, *NIH Publ*, No. 91-3242, Vol. 1, págs. 647-669 (1991)). Los dominios constantes no intervienen directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

Cuando se utiliza en la presente, el término “región hipervariable” se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que es responsable de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (es decir, residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. [1991]) y/o aquellos residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada; Clothia y Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 [1987]). Los residuos de entramado (“framework” o “FR”) son aquellos residuos de dominios variables distintos de los residuos de la región hipervariable tal como se ha definido en la presente.

“Fragments de anticuerpos” comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son Fab, Fab’, F(ab’)₂, y fragmentos Fv; “diabodies”; anticuerpos lineales (Zapata y otros, *Protein Eng.*, 8 (10): 1.057-1.062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual “Fc”, designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab’)₂ que tiene dos sitios de unión al antígeno y sigue siendo capaz de formar enlaces transversales con el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de identificación y unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación, no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interactúan entre sí para determinar un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. En conjunto, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. No obstante, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de identificar el antígeno y unirse al mismo, aunque con una afinidad menor que en 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 Fab’ por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye uno o más cisteínas procedentes de la región bisagra del anticuerpo. Fab’-SH es la designación en la presente para un Fab’ en el que el residuo de cisteína (s) de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab’)₂ originalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab’ unidos por cisteínas bisagra. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de dos tipos claramente diferenciados, llamados kappa y lambda, en función de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

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

Tal como se utiliza en la presente, el término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, todos los anticuerpos de la población son idénticos excepto por la presencia, en cantidades menores, de posibles mutaciones de aparición natural. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, siendo dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones convencionales de anticuerpos (políclonales) que habitualmente incluyen anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes distintos (epítopos), cada anticuerpo monoclonal es dirigido contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, una de las ventajas de los anticuerpos monoclonales es que son sintetizados mediante cultivo del hibridoma, que no está contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo que se ha obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y su construcción no requiere producción del anticuerpo por medio de algún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que hay que utilizar según la presente invención pueden sintetizarse mediante el primer procedimiento de hibridoma descrito por Kohler y otros, *Nature*, 256: 495 [1975], o pueden sintetizarse mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. US 4.816.567). Los “anticuerpos mo-

noclonales" también pueden aislarse a partir de genotecas de anticuerpos bacteriófagos utilizando, por ejemplo, las técnicas descritas en Clackson y otros, *Nature*, 352: 624-628 [1991] y Marks y otros, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991).

- 5 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos "químéricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en los anticuerpos procedentes de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos 10 de tales anticuerpos, con tal que muestren la actividad biológica deseada (Patente de EE.UU. US 4.816.567; Morrison y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6.851-6.855 [1984]).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, 15 cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a抗ígenos) que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos procedentes de CDR del receptor son sustituidos por residuos procedentes de CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tales como un ratón, una rata o un conejo que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos FR de Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por 20 los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se hallen ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o de entrampado importadas. Estas modificaciones también se hacen para mejorar y maximizar la actividad de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y habitualmente dos, de los dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o 25 sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de una inmunoglobulina humana. De manera óptima, el anticuerpo humanizado también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase, Jones y otros, *Nature*, 321: 322-323 (1986); Reichmann y otros, *Nature*, 332: 323-329 [1988]; y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo PRIMATIZED™ en el que la región de unión al抗ígeno del anticuerpo 30 procede de un anticuerpo producido por inmunización de monos macacos con el抗ígeno de interés.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena única" o "Fv_s" comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L, en los que estos dominios se encuentran en una cadena polipeptídica única. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al Fv_s formar la estructura deseada para la unión al抗ígeno. Para un análisis de Fv_s, véase Pluckthun en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).

El término "dianticuerpos" se refiere a fragmentos pequeños de anticuerpos con dos sitios de unión al抗ígeno, 40 cuyos fragmentos comprenden un dominio variable en la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable en la cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Utilizando un conector que es demasiado corto para permitir el acoplamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios tienen que acoplarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al抗ígeno. Los dianticuerpos se describen con mayor detalle en, por ejemplo, EP 404.097; el documento WO 93/11161, y Hollinger y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 644-6448 (1993).

45 Un anticuerpo "aislado" es el que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que podrían interferir en el diagnóstico o en los usos terapéuticos del anticuerpo, y entre ellos pueden incluirse enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará: (1) hasta más del 95% en peso del anticuerpo tal como se determinó mediante el procedimiento de Lowry, y más preferiblemente más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos interna o N-terminal mediante un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que faltará por lo menos un componente del entorno natural del anticuerpo. Generalmente, no obstante, la preparación del anticuerpo aislado requerirá por lo menos una etapa de purificación.

Tal como se utiliza en la presente, la palabra "marcador" se refiere a un compuesto detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable 60 por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto sustrato que es detectable. El marcador también puede ser una entidad no detectable tal como una toxina.

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. 65 Entre los ejemplos de fases sólidas incluidos en la presente se incluyen aquellas formadas en parte o por completo por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), por polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En algunas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de análisis; en otras se trata de una columna de purificación (por ejemplo, una columna de

cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas aisladas, tales como las que se describen en la patente de EE.UU. US 4.275.149.

5 Un “liposoma” es una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactantes de utilidad en la administración de un fármaco (tal como un polipéptido PRO320 o un anticuerpo del mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma suelen disponerse en una bicapa, parecida a la disposición lipídica de las membranas biológicas.

10 Una “molécula pequeña” se define en la presente como la que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 daltons.

II. Compuestos y procedimientos de la invención

A. Polipéptido PRO320 en toda su longitud

15 La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos identificadas y aisladas recientemente que codifican polipéptidos a los que en la presente solicitud se ha hecho referencia como PRO320. En particular, se ha identificado y aislado el polipéptido PRO320 que codifica los ADNc, tal como se describe con mayor detalle en los siguientes ejemplos.

20 Tal como se ha descrito en los siguientes ejemplos, el polipéptido PRO320 que codifica clones de ADNc ha sido presentado junto con la ATCC. Las actuales secuencias de nucleótidos de los clones pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la materia secuenciando los clones presentados mediante procedimientos sistemáticos en el estado de la técnica. Las secuencias de aminoácidos predichas pueden determinarse a partir de las secuencias de 25 nucleótidos utilizando las técnicas habituales. En el caso del polipéptido PRO320 y el ácido nucleico codificante descrito en la presente, los solicitantes han identificado lo que se cree que representa el mejor marco de lectura identificable con información de la secuencia disponible por ahora.

B. Variantes PRO320

30 Además del polipéptido PRO320 de secuencia natural completa descrito en la presente, se contempla la preparación de variantes PRO320. Las variantes PRO320 pueden prepararse introduciendo modificaciones apropiadas en nucleótidos del ADN PRO320, y/o mediante la síntesis del polipéptido PRO320 deseado. Los expertos en la materia podrán apreciar que las modificaciones en los aminoácidos pueden alterar los procesos postraduccionales del polipéptido PRO320, tales como modificar el número o la posición de los sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje de la membrana.

40 Pueden realizarse variaciones en toda la longitud del PRO320 de secuencia natural o en varios dominios del PRO320 descrito en la presente, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas e instrucciones de mutaciones conservadoras y no conservadoras establecidas anteriormente, por ejemplo, en la patente de EE.UU. US 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el PRO320 que dé lugar a una modificación en la secuencia de aminoácidos del PRO320 comparado con el PRO320 de secuencia natural. La variación puede llevarse a cabo mediante la sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del PRO320. Puede determinarse qué residuo de aminoácidos puede insertarse, sustituirse o eliminarse sin influir de manera adversa en la actividad deseada comparando la secuencia del PRO320 con la de las moléculas proteínicas homólogas conocidas y minimizando el número de modificaciones en la secuencia de aminoácidos realizado en regiones de homología elevada. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir 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 conservadoras. Las 45 inserciones o delecciones pueden llevarse a cabo en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y comprobando las variantes resultantes en función de la actividad manifestada por la secuencia natural madura o en toda su longitud.

50 En la presente se proporcionan fragmentos del polipéptido PRO320. Tales fragmentos pueden estar truncados en el extremo terminal N o el extremo terminal C, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína natural en toda su longitud. Algunos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad biológica deseada del polipéptido PRO320.

55 Los fragmentos PRO320 pueden prepararse mediante cualquiera de numerosas técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados pueden sintetizarse químicamente. Una técnica alternativa implica la generación de fragmentos PRO320 mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para escindir proteínas en sitios determinados por residuos de aminoácidos particulares, o mediante digestión del ADN con enzimas de restricción apropiadas y aislando el fragmento deseado. Aún otra técnica apropiada implica aislar y 60 amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento polipeptídico deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (RCP). Los oligonucleótidos que determinan los extremos del fragmento de ADN son utilizados en los cebadores 5' y 3' en la RCP. Preferiblemente, los fragmentos del polipéptido PRO320 comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO320 natural representado en la figura 2 (SEC ID N.º: 2).

ES 2 281 704 T3

En realizaciones particulares, se muestran sustituciones conservadoras de interés en la tabla 3 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, a continuación se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones ejemplarizadoras en la tabla 3, o tal como también se ha descrito posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y se criban los productos.

5

TABLA 3

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

55

Se realizan modificaciones sustanciales en la función o la identidad inmunológica del polipéptido PRO320 seleccionando sustituciones que difieren notablemente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación en hoja o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el abultamiento de la cadena lateral. Los residuos de aparición natural son divididos en grupos en función de las propiedades de la cadena lateral habitual:

60

(1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

65

(2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

5 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un elemento de una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadora o, más preferiblemente, en los sitios (no conservados) restantes.

10 Las variaciones pueden realizarse utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como mutagénesis (dirigida) mediada por oligonucleótidos, barrido de alanina y mutagénesis mediante RCP [Carter y otros, *Nucl. Acids Res.*, 13: 4.331 (1986); Zoller y otros, *Nucl. Acids Res.*, 10: 6.487 (1987)], mutagénesis por inserción de un casete [Wells y otros, *Gene*, 34: 315 (1995)], mutagénesis de selección por restricción [Wells y otros, *Philos. Trans. R. Soc. London Sera*, 317: 415 (1986)] o pueden llevarse a cabo otras técnicas conocidas sobre el ADN clonado para producir el ADN de la variante del PRO320.

15 El análisis de aminoácidos mediante barrido también puede utilizarse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos son aminoácidos neutros relativamente 20 pequeños. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es 25 menos probable alterar la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, *Science*, 244: 1.081-1.085 (1989)]. La alanina es también habitualmente preferida porque es el aminoácido más frecuente. Además, con frecuencia se encuentra tanto en posición oculta como expuesta [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades suficientes de variante, 30 puede utilizarse un aminoácido isostérico.

C. Modificaciones del PRO320

30 Las modificaciones covalentes del PRO320 se incluyen dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos dirigidos de un polipéptido PRO320 con un agente de derivación orgánica que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos de los extremos terminales N o C del PRO320. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para la formación de 35 enlaces transversales.

35 PRO320 en una matriz de apoyo o superficie insoluble al agua de uso en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO320, y viceversa. Entre los agentes habitualmente utilizados para la formación de enlaces transversales se incluyen, por ejemplo: 1,1-bis(diazoacetyl)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-ácido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos ésteres disuccinimidil tales como 3,3'-40 ditriobis (succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales tales como bis-Nmaleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-acidofenil) dithio] propioimidato.

45 Otras modificaciones incluyen desamidación de residuos de glutaminil y asparaginil con los residuos correspondientes de glutamil y aspartil, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos seril o treonil, metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)], 50 acetilación de la amina del extremo terminal N y amidación de cualquier grupo carboxílico del extremo terminal C.

55 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO320 incluida dentro del alcance de esta invención comprende la alteración del patrón de glucosilación natural del polipéptido. Para los propósitos de la presente, por "alteración del patrón de glucosilación natural" se entiende eliminar uno o más partes de carbohidratos halladas en el PRO320 de secuencia natural (bien por eliminación del sitio de glucosilación subyacente, o mediante eliminación de la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no existen en el PRO320 de secuencia natural. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas naturales, que implican un cambio en la naturaleza y las proporciones de las diversas partes de carbohidratos presentes.

60 La adición de sitios de glucosilación en el polipéptido PRO320 puede llevarse a cabo mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en el PRO320 de secuencia natural (para los sitios de glucosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del PRO320 puede alterarse opcionalmente a través de cambios en el ADN, en particular 65 mutando el ADN que codifica el polipéptido PRO320 en bases preseleccionadas tales que se generan codones que se transformarán en los aminoácidos deseados.

65 Otras formas de aumentar el número de partes de carbohidratos en el polipéptido PRO320 son mediante acomplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Tales procedimientos son descritos en el estado de la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.* págs. 259-306 (1981).

La eliminación de las partes de carbohidratos presentes en el polipéptido PRO320 puede llevarse a cabo química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican residuos de aminoácidos que sirven de dianas en la glucosilación. Las técnicas de desglucosilación química son conocidas en el estado de la técnica y han sido descritas, por ejemplo, por Hakimuddin y otros, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52 (1987) y por Edge y otros, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981). La escisión enzimática de partes de carbohidratos en polipéptidos puede conseguirse mediante la utilización de una variedad de endo y exoglucosidasas tal como se ha descrito en Thotakura y otros, *Meth. Enzymol.*, 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente del PRO320 comprende unir el polipéptido PRO320 con uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera establecida anteriormente en las patentes de EE.UU. US 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.610.411; 4.791.192 o 4.179.337.

El polipéptido PRO320 de la presente invención también puede modificarse de tal modo que forme una molécula químérica que comprenda el PRO320 fusionado con otro polipéptido heterólogo o con una secuencia de aminoácidos.

En una realización, tal molécula químérica comprende una fusión del polipéptido PRO320 con un polipéptido *tag* que proporciona un epítopo al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-*tag*. El epítopo *tag* generalmente se sitúa en los extremos amino o carboxílico del polipéptido PRO320. La presencia de tales formas etiquetadas (*tagged*) del polipéptido PRO320 puede detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido *tag*. Asimismo, la provisión del epítopo *tag* permite purificar fácilmente el polipéptido PRO320 mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-*tag* u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítopo *tag*. Varios polipéptidos *tag* y sus anticuerpos respectivos son bien conocidos en el estado de la técnica. Entre los ejemplos se incluyen los *tags* poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido *tag* de la gripe HA y su anticuerpo 12CA5 [Field y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2.159-2.165 (1988)]; el *tag* c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 [Evan y otros, *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3.610-3.616 (1985)]; y el *tag* de la glucoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo [Paborsky y otros, *Protein Engineering*, 3(6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos *tag* son el péptido Flag [Hopp y otros, *BioTechnology*, 6: 1.204-1.210 (1988)]; el péptido epítopo KT3 [Martin y otros, *Science*, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítopo de la tubulina- α [Skinner y otros, *J. Biol. Chem.*, 266: 15.163-15.166 (1991)]; y el *tag* del péptido proteínico del gen 10 del T7 [Lutz-Freyermuth y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6.393-6.397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula químérica puede comprender una fusión del polipéptido PRO320 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula químérica (a la que también se hace referencia como “inmunoadhesina”), dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido PRO320 en lugar de por lo menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de las inmunoglobulinas incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, las regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas véase también la patente de EE.UU. US 5.428.130 publicada el 27 de junio de 1995.

D. Preparación del PRO320

La descripción que aparece a continuación se refiere principalmente a la producción del PRO320 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico del PRO320. Obviamente, también se contempla el uso de procedimientos alternativos, bien conocidos en el estado de la técnica, en la preparación del PRO320.

Por ejemplo la secuencia del polipéptido PRO320, o partes del mismo, puede producirse mediante síntesis directa utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart y otros, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2.149-2.154 (1963)]. Puede realizarse síntesis de proteínas *in vitro* utilizando técnicas manuales o mediante automatización. Puede realizarse síntesis automatizada, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos (Applied Biosystems Peptide Synthesizer; Foster City, CA) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Varias partes del polipéptido PRO320 pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse después mediante procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido PRO320 en toda su longitud.

1. Aislamiento de ADN que codifica PRO320

El ADN que codifica el PRO320 puede obtenerse a partir de una genoteca de ADNc preparada a partir de un tejido que se cree que contiene el ARNm del PRO320 y para expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, puede obtenerse ADN del PRO320 humano a partir de una genoteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se ha descrito en los ejemplos. El gen que codifica el PRO320 también puede obtenerse a partir de una genoteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

El cribado de genotecas puede realizarse con sondas (tales como anticuerpos del PRO320 o como oligonucleótidos de por lo menos unas 20-80 bases) diseñadas para la identidad del gen de interés o la proteína codificada por éste. El cribado de ADNc o de una genoteca genómica con la sonda seleccionada puede realizarse utilizando intervenciones

estándar, tales como las descritas en Sambrook y otros, *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el PRO320 es utilizar la metodología de la RCP [Sambrook y otros, *supra*; Dieffenbach y otros, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

5 Los ejemplos que se ofrecen a continuación describen técnicas para cribar una genoteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser suficientemente largas y nada ambiguas de tal modo que se reduzca al mínimo la aparición de falsos positivos. El oligonucleótido es marcado preferiblemente de manera que pueda ser detectado en la hibridación del ADN en la genoteca donde será cribado. Los procedimientos de marcado 10 son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radiomarcadores como biotinilización de ATP marcado con ^{32}P o marcado de enzimas. Las condiciones de hibridación, entre las que se incluyen restricción moderada y restricción elevada, se proporcionan en Sambrook y otros, *supra*.

15 Las secuencias identificadas en tales procedimientos de cribado de genotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas presentadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank o en otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) dentro de regiones determinadas de la molécula o a lo largo de toda la longitud de la secuencia pueden determinarse utilizando procedimientos conocidos en el estado de la técnica y tal como se ha descrito en la presente.

20 El ácido nucleico con una secuencia que codifica proteínas puede obtenerse mediante cribado de ADNc seleccionado o de genotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida a la que se hace referencia en la presente por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos de ampliación de los cebadores convencionales tal como se ha descrito en Sambrook y otros, *supra*, para detectar precursores y procesar intermediarios de ARNm que puede no hayan sido sometidos a transcripción inversa de ADNc.

25 2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped son transfectadas o transformadas con vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción del PRO320 y cultivados en medios nutritivos convencionales modificados de manera apropiada 30 para inducir promotores, seleccionar transformadores, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones del cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, pueden ser seleccionadas por cualquier experto en la materia. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden hallarse en: *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y otros, *supra*.

35 Los procedimientos de transinfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediado por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se lleva a cabo utilizando técnicas estándar apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que recurre al cloruro de calcio, tal como se ha descrito en Sambrook y otros, *supra*, o a la 40 electroporación generalmente se utiliza para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de algunas células vegetales, tal como se ha descrito en Shaw y otros, *Gene*, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. En el caso de las células de mamíferos que carecen de tales paredes celulares, puede utilizarse el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones del sistema de células huésped de 45 mamíferos se han descrito en la patente de EE.UU. US 4.399.216. Las transformaciones en levadura habitualmente se llevan a cabo de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen y otros, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)*, 76: 3.829 (1979). No obstante, también pueden utilizarse otros procedimientos para introducir ADN a las células, tales como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos 50 bacterianos con células intactas, o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas sobre la transformación de células de mamíferos, véase, Keown y otros, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990) y Mansour y otros, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

55 Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de ADN en los vectores de la presente invención incluyen procariotas, levaduras, o células eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero no exclusivamente, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *E. coli*. Hay disponibles diversas cepas de *E. coli*, tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen enterobacterias tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y 60 *Shigella*, así como bacilos tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41 P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989). *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos pero no excluyentes. La cepa W3110 es un huésped o un huésped progenitor particularmente preferido porque es una cepa huésped frecuente para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede ser modificada para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas del huésped, con ejemplos de tales huéspedes entre los que se incluyen la cepa IA2 de *E. coli* W3110, que presenta el genotipo completo tonA; la cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que presenta el genotipo completo tonA ptr3; la cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que presenta el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-1 ac)1 69 degP ompT kon'; la cepa 37D6 de

5 *E. coli* W3110, que presenta el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-1 ac1 69 degP ompT rbs7 ilvG kon'; la cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es una cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que presenta una proteasa periplasmática mutante a la que se hace referencia en la patente de EE.UU. US 4.946.783 publicada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, RCP u otras reacciones de la polimerasa de ácidos nucleicos.

10 Además de procariotas, microbios eucariotas tales como los hongos filamentosos o la levadura son huéspedes apropiados para la clonación o expresión de huéspedes para vectores que codifican el PRO320. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior utilizado con frecuencia. Entre otros se incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes de *Kluyveromyces* (patente de EE.UU. US 4.943.529; Fleer y otros, *Bio/Technology*, 9: 968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y otros, *J. Bacteriol.*, 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg y otros, *Bio/Technology*, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*: *yarrowiae* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna y otros, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesiae* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5.259-5.263 [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* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn y otros, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 (1984)) y *A. niger* (Kelly y Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en la presente e incluyen, pero no exclusivamente, levaduras capaces de crecer sobre metanol seleccionadas a partir de los géneros *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplarizadoras de esta clase de levaduras puede hallarse en: 25 C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

30 Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO320 glucosilado proceden de organismos pluricelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos tales como S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*, así como células vegetales. Entre los ejemplos útiles de líneas celulares huésped de mamíferos se incluyen 35 células ováricas (CHO) de hámster chino y células COS. Ejemplos más específicos incluyen una línea CVI renal de mono transformada mediante SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); una línea renal embrionaria humana (células 293 o células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y otros, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células ováricas de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980)); células de sertoli murinas (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 (1990)); células pulmonares humanas (W138, 40 ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario murino (MMT060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula huésped adecuada forma parte de las habilidades en el estado de la técnica.

3. Selección y uso de un vector replicable

40 El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica el PRO320 puede ser insertado en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Varios vectores se hallan disponibles. El vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, un cósmido, una partícula vírica, o un fago. La secuencia apropiada de ácidos nucleicos puede ser insertada en el vector mediante una variedad de intervenciones. En general, el ADN se 45 inserta en un sitio, o sitios, apropiado de la endonucleasa de restricción utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no exclusivamente, una o más de una secuencia 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 contengan uno o más de estos componentes utiliza técnicas estándar de ligación que son conocidas para el experto en la materia.

50 El PRO320 puede producirse de manera recombinante no sólo directamente, sino también como polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que presente un sitio de escisión específico en el extremo terminal N de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede formar parte del ADN que codifica el PRO320 que se inserta en el vector. La 55 secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinasa, Ipp, o líderes de la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levaduras la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, líder factor alfa (incluidos los líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la patente de EE.UU. US 5.010.182), o líder fosfatasa ácida, líder glucoamilasa de *C. albicans* (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento 60 WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos pueden utilizarse para dirigir la secreción de las proteínas, tales como secuencias señal procedentes de polipéptidos secretados de la misma especie o de especies afines, así como líderes de secreción vírica.

65 Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2P es adecuado para la levadura, y son varios los orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) de utilidad en la clonación de vectores en células de mamíferos.

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que: (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina; (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) proporcionan nutrientes importantes que no se hallan disponibles en los medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para bacilos.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para utilizar el ácido nucleico que codifica el PRO320, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y difundida tal como describieron Urlaub y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4.216 (1980). Un gen de selección adecuada para utilizar en la levadura es el gen trp1 presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb y otros, *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman y otros, *Gene*, 7: 141 (1979); Tschemper y otros, *Gene*, 10: 157 (1980)). El gen trp1 proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que no puede crecer sobre triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977)].

Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el PRO320 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores identificados por una variedad de posibles células huésped son bien conocidos. Los promotores adecuados para el uso de huéspedes procariotas incluyen los sistemas de promotores de la β -lactamasa y la lactosa [Chang y otros, *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel y otros, *Nature*, 281: 544 (1979)], la fosfatasa alcalina, un sistema de promotores del triptófano (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4.057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos tales como el promotor tac [deBoer y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)]. Los promotores que se utilizan en los sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgamo (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el PRO320.

Entre los ejemplos de secuencias de promotores adecuadas para utilizar con huéspedes levadura se incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman y otros, *J. Biol. Chem.*, 255: 2.073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess y otros, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4.900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

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

La transcripción del PRO320 a partir de vectores en células huésped de mamíferos es controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como el virus del polioma, el virus de la viruela aviar (patente del Reino Unido UK 2.211.504, publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tales como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus 40 de los simios (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores del choque de calor, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

La transcripción de un ADN que codifica el PRO320 mediante eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN de acción cis, normalmente de unos 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen varias secuencias potenciadoras procedentes de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, no obstante, se utilizará un potenciador procedente de un virus celular eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador SV40 en la última parte del extremo del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor precoz de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la última parte del extremo del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede empalmarse en el vector en la posición 5' o 3' de la secuencia que codifica el ' - - PRO320, pero preferiblemente se localiza en la posición 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levaduras, hongos, insectos, vegetales, animales, humanos, o células nucleadas procedentes de otros organismos pluricelulares) también contendrán secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Tales secuencias se hallan normalmente disponibles a partir de regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el PRO320.

Aún otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación de la síntesis del PRO320 en cultivo recombinante de células de vertebrados se describen en: Gething y otros, *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei y otros, *Nature*, 281: 40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058.

4. Detección de la amplificación/expresión de genes

La amplificación y/o expresión de genes puede determinarse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia convencional de Southern y de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5.201-5.205 (1980)], transferencia puntual (análisis de ADN), o mediante hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada de manera apropiada, en función de las secuencias proporcionadas en la presente. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos capaces de identificar duplicidades específicas, incluidas duplicidades de ADN, duplicidades de ARN y duplicidades híbridas de ADN-ARN o duplicidades de ADN-proteína. Los anticuerpos pueden a su vez estar marcados y el análisis puede realizarse en los sitios donde la duplicidad se une a la superficie, de modo que sobre la formación de duplicidad en la superficie puede detectarse la presencia de anticuerpo unido a la duplicidad.

Alternativamente, la expresión de genes puede determinarse mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o partes de tejidos y análisis de cultivo celular o líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Los anticuerpos de utilidad para la tinción inmunohistoquímica y/o el análisis de líquidos de la muestra pueden ser bien monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. De manera conveniente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido PRO320 de secuencia natural o contra un péptido sintético en función de las secuencias de ADN proporcionadas en la presente o contra una secuencia exógena fusionada con un ADN de PRO320 y codificante de un epítopo de anticuerpo específico.

5. Purificación de polipéptidos

Las formas del PRO320 pueden recuperarse de un medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si están unidas a la membrana, pueden ser liberadas de la membrana utilizando una disolución detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células utilizadas en la expresión del PRO320 pueden alterarse por varios medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-licuación, sonicación, alteración mecánica, o agentes que lisan células.

Puede ser deseable purificar el PRO320 de proteínas celulares o polipéptidos recombinantes. Las siguientes intervenciones son ejemplarizadoras de intervenciones de purificación adecuadas: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación de etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatofocalización; SDS-PAGE; precipitación de sulfato de amoníaco; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas Sepharose de proteína A para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas de quelación de metales para unir formas etiquetadas (*tagged*) de epítopos del PRO320. Pueden utilizarse diversos procedimientos de purificación de proteínas y tales procedimientos son conocidos en el estado de la técnica y se han descrito 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 de los PRO179, PRO320 particulares producidos.

E. Anticuerpos

Algunos de los posibles fármacos que pueden utilizarse en los compuestos y procedimientos de la presente invención son anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que emulan la actividad biológica de un polipéptido PRO320.

1. Anticuerpos policlonales

Los procedimientos para la preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales pueden ser cultivados 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 será inyectado en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido PRO320 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que es inmunizado. Entre los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas se incluyen pero no exclusivamente la hemocianina de lapa, la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina y el inhibidor de la tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que pueden utilizarse se incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, diconomicolato de trealosa sintético). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por cualquier experto en la materia.

2. Anticuerpos monoclonales

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

El agente inmunizante habitualmente incluirá el polipéptido PRO320 de una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean obtenerse células de origen humano, o se

utilizan células del bazo o células de los nódulos linfáticos si no se desean fuentes mamíferas humanas. A continuación se fusionan los linfocitos 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*, Academic Press, (1986) págs. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son transformadas en 5 células de mamíferos, en particular en células de mieloma originarias de roedor, bovino y humano. Normalmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células progenitoras carecen de la enzima hipoxantina 10 guanina fosforribosil transferasa (HPRT o HGPRT), el medio de cultivo para los hibridomas habitualmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (“medio HAT”), sustancias que evitan el crecimiento de células deficientes para HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son las que se fusionan de manera eficaz, sostienen una expresión 15 elevada estable del anticuerpo por parte de las células que producen el anticuerpo seleccionado y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murinas, que pueden obtenerse, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma murino-humano 20 también han sido descritas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3.001 (1984); Brodeur y otros, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63].

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ser analizado en busca de la presencia 25 de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PRO320. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma es determinada por inmunoprecipitación o mediante un análisis de unión *in vitro*, tal como radioinmunoanálisis (RIA) o enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Tales técnicas y análisis son conocidos en el estado de la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, ser determinada mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Una vez identificadas las células de hibridoma deseadas, pueden subclonarse los clones mediante procedimientos 30 de dilución limitantes y cultivarse mediante procedimientos estándar [Coding, *supra*]. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, Dulbecco's Modified Eagle's Medium y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser aislados o purificados del medio de cultivo o 35 líquido de ascitis mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, columna Sepharose de proteína A, cromatografía en hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también pueden sintetizarse mediante procedimientos de ADN recombinante, tales 40 como los que se describen en la patente de EE.UU. US 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención actúan como fuente preferida de tal ADN. Una vez rotado, puede colocarse el ADN en vectores de expresión, que a continuación son transfectados a células 45 huésped tales como células COS de simio, células ováricas de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en células huésped recombinantes. El ADN también puede ser modificado, por ejemplo, sustituyendo con la secuencia codificante de los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera humanas las secuencias murinas homólogas [patente de EE.UU. US 4.816.567; Morrison y otros, *supra*] o mediante la unión covalente de toda la secuencia codificante de la inmunoglobulina o de parte de la secuencia codificante de un polipéptido distinto de la inmunoglobulina. Dicho polipéptido 50 distinto de la inmunoglobulina puede ser sustituido en los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede ser sustituido en los dominios variables de un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

55 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para la preparación de anticuerpos monovalentes son bien conocidos en el estado de 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 generalmente está truncada en cualquier punto de la región Fc para evitar la formación de enlaces transversales en la cadena pesada. Alternativamente, los residuos relevantes de cisteína son sustituidos por otros residuos de aminoácidos o son 60 eliminados para evitar la formación de enlaces transversales.

Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, en particular, fragmentos Fab, puede llevarse a cabo utilizando técnicas sistemáticas conocidas en el estado de la técnica.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos de 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

- 5 inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígenos) que contienen una secuencia mínima procedente de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo de donante), tal como un ratón, una rata o un conejo con la especificidad, 10 afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de entramado Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se hallen ni en el anticuerpo del receptor ni en la CDR importada o las secuencias de entramado. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, de los dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una 15 inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y otros, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y otros, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

- 20 Los procedimientos para la obtención de anticuerpos humanizados no humanos son bien conocidos en el estado de la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos procedentes de una fuente que no es humana. A menudo se hace referencia a estos residuos de aminoácidos no humanos como residuos de "importación", que habitualmente se obtienen a partir de un dominio variable de "importación". La humanización 25 puede realizarse básicamente siguiendo el procedimiento de Winter y sus colaboradores [Jones y otros, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y otros, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoyen y otros, *Science*, 239: 1.534-1.536 (1988)], mediante la sustitución de CDR o secuencias CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. US 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la 30 secuencia correspondiente de una especie no humana. A la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR y posiblemente algunos residuos FR son sustituidos por residuos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

- 35 Los anticuerpos humanos también pueden producirse utilizando varias técnicas conocidas en el estado de la técnica, incluidas las genotecas de bacteriófagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks y otros, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole y otros, y Boerner y otros, también se hallan disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y otros, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss. pág. 77 (1985) y Boerner y otros, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)]. De un modo parecido, los anticuerpos humanos pueden sintetizarse mediante la introducción de *loci* de inmunoglobulinas humanas a animales transgénicos, 40 por ejemplo, ratones en los que se han inactivado parcial o completamente los genes de la inmunoglobulina endógena. Tras la exposición, se observa producción de anticuerpos humanos, lo que recuerda exactamente en todos los aspectos la producción observada en humanos, incluida la redistribución de los genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. US 5.545.807; US 5.545.806; US 5.569.825; US 5.625.126; US 5.633.425; US 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y otros, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg y otros, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 912-13 (1994); Fishwild y otros, *Nature Biotechnology*, 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

4. Anticuerpos biespecíficos

- 50 Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, anticuerpos que presentan especificidades de unión para por lo menos dos antígenos distintos. En el caso presente, una de las especificidades de unión es para el PRO320, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína o un receptor o una subunidad de receptor de la superficie de la célula.

- 55 Los procedimientos para sintetizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el estado de la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de la inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. Dado el surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial a menudo de distintas moléculas de anticuerpos, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se lleva a cabo mediante fases de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se describen en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker y otros, *EMBO J.*, 10: 3.655-3.659 (1991).

- 65 Los dominios variables de anticuerpos que presentan las especificidades de unión deseadas (sitios de unión anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. La fusión tiene lugar preferiblemente con un dominio constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina, que comprende por lo menos

parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, son insertados en vectores de expresión separados y son cotransfектados a un organismo huésped adecuado. Para más 5 detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y otros, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

De acuerdo con otro procedimiento descrito en el documento WO 96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos puede ser manipulada para maximizar el porcentaje de heterodímeros que ha sido recuperado de un 10 cultivo celular recombinante. La interfaz preferida comprende por lo menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo son sustituidas por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena, o cadenas, lateral grande sobre la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales grandes de aminoácidos por 15 otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar la producción del heterodímero por encima de la de otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos en toda su longitud o como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para la generación de anticuerpos biespecíficos 20 a partir de fragmentos de anticuerpos han sido descritas en la literatura sobre el tema. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan y otros, *Science*, 229: 81 (1985), describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos son reducidos en presencia de arsénito sódico, un ligando ditiol, para estabilizar los dítoles vecinos y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados son convertidos a continuación 25 en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados TNB-Fab' es reconvertido a continuación a tiol Fab' mediante reducción con mercaptoetilamina y mezclado con una cantidad equimolar del otro derivado TNB-Fab' para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

30 Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y otros, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab') completamente humanizada. Cada fragmento Fab' fue secretado independientemente a partir de *E. coli* y sujeto a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y a células 35 T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra tumores diana de mama humanos.

También se han descrito varias técnicas para sintetizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente 40 a partir del cultivo celular recombinante. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y otros, *J. Immunol.*, 148 (5): 1.547-1.553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina procedentes de las proteínas Fos y Jun estaban unidos a las partes Fab' de los dos anticuerpos distintos mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo fueron reducidos en la región bisagra para formar monómeros y a continuación reoxidados para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también puede utilizarse 45 para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología relativa a "dianticuerpos" descrita por Hollinger y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6.444-6.448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para sintetizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable (V_H) en la cadena pesada conectado a un dominio variable (V_L) en la cadena ligera por medio de un conector que es demasiado corto para permitir el acoplamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento están obligados a acoplarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, por lo que se 50 forman dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para sintetizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase, Gruber y otros, *J. Immunol.*, 152: 5.368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. 55 Tun y otros, *J. Immunol.*, 147: 60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos ejemplarizadores pueden unirse a dos epítopos diferentes en un polipéptido PRO320 dado de la presente. Alternativamente, puede combinarse un brazo de polipéptido anti-PRO320 con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, 60 CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc de la IgG (Fcgr), tales como FcgrI (CD64), FcgrII (CD32) y FcgrIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular de la célula que expresa el polipéptido PRO320 en particular. Los anticuerpos biespecíficos también pueden utilizarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan un polipéptido PRO320 particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al PRO320 y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelante de radionúclidos, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido PRO320 y además se une al factor tisular (TF).

5. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también se hallan dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario contra células no deseadas [patente de EE.UU. US 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por el VIH [documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla la posibilidad de preparar anticuerpos *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en química de síntesis de proteínas, incluidas aquellas en las que intervienen agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuros o formando un enlace tioéster. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este fin se incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptopbutirimidato y los que se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. US 4.676.980.

6. Manipulación de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención en cuanto a su función efectora, para aumentar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, pueden introducirse uno o más residuos de cisteína en la región Fc, lo que permite la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener mejor capacidad de interiorización y/o mayor capacidad de eliminación de células mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase, Caron y otros, *J. Exp. Med.*, 176: 1.191-1.195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2.918-2.922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada también pueden prepararse utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal como se ha descrito en Wolff y otros, *Cancer Research*, 53: 2.560-2.565 (1993). Alternativamente, puede manipularse un anticuerpo que presenta regiones Fc dobles y por lo tanto puede tener potenciada la lisis del complemento y las capacidades ADCC. Véase, Stevenson y otros, *Anti-Cancer Drug Design*. 3: 219-230 (1989).

25 7. Inmunoconjungados

La invención también está relacionada con inmunoconjungados que comprenden un conjugado de anticuerpo con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjungado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjungados han sido descritos anteriormente. Entre las toxinas, y los fragmentos de las mismas, enzimáticamente activas que pueden utilizarse se incluyen: la cadena A de la difteria, los fragmentos activos no unidos de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeicina y atphasancin. Las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII y PAPS), el inhibidor de *Momordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogilina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Para la producción de anticuerpos radioconjungados hay disponible una variedad de radionúclidos. Entre los ejemplos se incluyen ¹¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹³⁰Re.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se sintetizan utilizando una variedad de agentes bifuncionales que se acoplan a proteínas tales como N-succinimidil-3-(1-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (11), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetiladipimido HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-acidobenzoil) hexanediamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilenediamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de fluoruro bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de la ricina puede prepararse tal como se ha descrito en Vitetta y otros, *Science*, 238: 1.098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildiethileno triaminapentaacético (MX-DTPA) marcado en el carbono 14 es un agente quelante ejemplarizador de la conjugación de radionucleótidos con el anticuerpo. Véase, documento WO 94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un “receptor” (tal como estreptavidina) para su utilización en el premarcaje del tumor en la que el conjugado anticuerpo-receptor es administrado al paciente, seguido de la eliminación de la circulación del conjugado no unido utilizando un agente limpiador y administrando a continuación un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

8. Immunoliposomas

Los anticuerpos descritos en la presente también pueden formularse como immunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como los descritos en Epstein y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3.688 (1985); Hwang y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4.030 (1980); y las patentes de EE.UU. US 4.485.045 y US 4.544.545. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la patente de EE.UU. US 5.013.556.

Pueden generarse liposomas de particular utilidad mediante el procedimiento de evaporación de la fase inversa con un compuesto lípido que comprenda fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se sacan a través de filtros con un tamaño de poro determinado para obtener liposomas con el diámetro

deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a los liposomas tal como se ha descrito en Martin y otros, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante reacción de intercambio disulfuro. El liposoma puede contener opcionalmente un agente quimioterapéutico (tal como doxorrubicina). Véase, Gabizon y otros, *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1.484 (1989).

5

F. Identificación de proteínas capaces de inhibir el crecimiento o la proliferación de células neoplásicas

Las proteínas descritas en la presente solicitud de patente han sido analizadas en una tabla de 60 líneas celulares tumorales actualmente utilizada en el cribado, orientado a las enfermedades, de fármacos *in vitro* del National Cancer Institute (NCI). El objetivo de este cribado es identificar moléculas que tienen actividad citotóxica y/o citostática contra diferentes tipos de tumores. El NCI criba más de 10.000 moléculas nuevas cada año (Monks y otros, *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 757-766 (1991); Boyd, *Cancer; Princ. Pract. Oncol. Update*, 3(10): 1-12 ([1989]). Las líneas celulares tumorales utilizadas en este estudio han sido descritas en Monks y otros, *supra*. Las líneas celulares cuyo crecimiento ha sido considerablemente inhibido por las proteínas de la presente solicitud de patente se especifican en los ejemplos.

15

Los resultados han mostrado que las proteínas probadas muestran actividad citostática y, en algunos casos y según las concentraciones, actividad citotóxica en una variedad de líneas celulares cancerosas y, por lo tanto, son candidatos al tratamiento de un tumor.

20

También pueden utilizarse otros análisis a partir de células y modelos animales para tumores (por ejemplo, cánceres) para verificar los resultados del estudio oncológico del NCI y para comprender, además, la relación entre la proteína identificada en la presente y el desarrollo y patogenia del crecimiento celular neoplásico. Por ejemplo, en los análisis a partir de células de la presente pueden utilizarse cultivos primarios obtenidos a partir de tumores en animales transgénicos (tal como se describe posteriormente), aunque se prefieren líneas celulares estables. Las técnicas para obtener líneas celulares constantes a partir de animales transgénicos son bien conocidas en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, Small y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 642-648 [1985]).

25

G. Modelos animales

30

Puede utilizarse una variedad de modelos animales bien conocidos para comprender además la función de las moléculas identificadas en la presente en el desarrollo y patogenia de tumores, y para probar la eficacia de los posibles agentes terapéuticos, incluidos los anticuerpos, y otros agonistas de los polipéptidos naturales, incluidos agonistas de moléculas pequeñas. La naturaleza *in vivo* de tales modelos los hace particularmente útiles para la predicción de respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de tumores y de cánceres (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, etc.) incluyen tanto animales (transgénicos) no recombinantes como recombinantes. Los modelos animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos murinos. Dichos modelos pueden generarse introduciendo células tumorales a ratones singeneicos utilizando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implante de bazo, implante intraperitoneal, implante debajo de la cápsula renal, o implante de ortopina, por ejemplo, células de cáncer de colon implantadas en tejido colónico (véase, por ejemplo, PCT n.º de publicación WO 97/33551, publicado el 18 de septiembre de 1997).

35

Probablemente la especie animal utilizada más a menudo en los estudios oncológicos son los ratones inmunodeficientes y, en particular, los ratones desnudos. La observación de que el ratón desnudo con hipoaplasia podría utilizarse satisfactoriamente como huésped en los xenotrasplantes de tumores humanos ha llevado a su amplia utilización con este fin. El gen autosómico recesivo *nu* ha sido introducido en un gran número de cepas congénitas distintas de ratón desnudo, incluidas, por ejemplo, ASW, A/He, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, I/st, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII y SJL. Además, se ha criado una amplia variedad de otros animales con alteraciones inmunológicas hereditarias distintas a la del ratón desnudo y se han utilizado como receptores de xenotrasplantes tumorales. Para más detalles véase, por ejemplo, *The Nude Mouse in Oncology Research*, E. Boven y B. Winograd, eds., CRC Press, Inc.. 1991.

40

Las células introducidas en tales animales pueden obtenerse a partir de líneas celulares tumorales/cáncerígenas conocidas, tales como, cualquiera de las líneas celulares tumorales enumeradas anteriormente, y, por ejemplo, la línea celular B104-1-1 (línea celular estable NIH-3T3 transfectada con el nuevo protooncogén); células NIH-3T3 transfectadas con ras; Caco-2 (ATCC HTB-37); una línea celular de adenocarcinoma de colon humano de grado II moderadamente bien diferenciado, HT-29 (ATCC HTB-38), o a partir de tumores y de cánceres. Las muestras de células tumorales o cancerígenas pueden obtenerse a partir de pacientes que se someten a cirugía, utilizando condiciones estándar, que implican la congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido (Karmali y otros, *Br. J. Cancer*, 48: 689-696 [1983]).

45

Las células tumorales pueden introducirse en animales, tales como el ratón desnudo, mediante una variedad de procedimientos. El espacio subcutáneo en los ratones es muy adecuado para el trasplante de un tumor. Los tumores pueden trasplantarse subcutáneamente como bloques sólidos, como biopsias por punción utilizando una aguja trocar, o como suspensiones celulares. Para el bloque sólido o el trasplante con aguja trocar, se introducen los fragmentos de tejido tumoral de tamaño adecuado en el espacio subcutáneo. Las suspensiones celulares son recién preparadas a partir de tumores primarios o de líneas celulares tumorales estables, y se inyectan por vía subcutánea. Las células tumorales también pueden inyectarse como trasplantes subdérmicos. En este sitio, el inóculo se deposita entre la parte inferior del tejido conectivo dérmico y el tejido subcutáneo. Boven y Winograd (1991), *supra*. Pueden generarse modelos

animales de cáncer de mama, por ejemplo, mediante trasplante de células de neuroblastoma de rata (a partir de las cuales fue aislado inicialmente el nuevo oncogén), o células NIH-3T3 nuevamente transformadas en ratones desnudos, esencialmente tal como describieron Drebin y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 9.129-9.133 (1986).

5 Asimismo, pueden generarse modelos animales de cáncer de colon mediante la introducción de células de cáncer de colon en animales, por ejemplo, ratones desnudos, lo que origina la aparición de tumores en estos animales. Se ha descrito un modelo de trasplante ortotópico de cáncer de colon humano en ratones desnudos, por ejemplo, en Wang y otros, *Cancer Research*, 54: 4.726-4.728 (1994) y Too y otros, *Cancer Research*, 55: 681-684 (1995). Este modelo se basa en el así denominado "METAMOUSE" vendido por AntiCancer, Inc. (San Diego, California).

10 15 Los tumores que aparecen en animales pueden ser eliminados y cultivados *in vitro*. Las células de cultivos *in vitro* pueden a continuación introducirse en animales. Dichos tumores pueden servir como dianas para otras pruebas o cribado de fármacos. Alternativamente, los tumores resultantes de esta introducción pueden ser aislados y puede analizarse el ARN de las células previamente y las células aisladas después de una o más rondas de introducción para la expresión diferencial de genes de interés. Tales técnicas de introducción pueden llevarse a cabo con cualquier línea celular tumoral o cancerígena conocida.

20 25 Por ejemplo, Meth A, CMS4, CMS21, y WEHI-164 son fibrosarcomas de ratones hembra BALB/c inducidos químicamente (DeLeo y otros, *J. Exp. Med.*, 146: 720 [1977]), que proporcionan un sistema modelo muy controlable para estudiar las actividades antitumorales de varios agentes (Palladino y otros, *J. Immunol.*, 138: 4.023-4.032 [1987]). En resumen, las células tumorales se propagan *in vitro* en cultivo celular. Antes de inyectarlas a los animales, las líneas celulares se limpian y se suspenden en un tampón, a una densidad celular de aproximadamente 10×10^6 a 10×10^7 células/ml. A continuación los animales son infectados por vía subcutánea con de 10 a 100 μ l de la suspensión celular, lo que permite la aparición de un tumor en un período de una a tres semanas.

30 35 Además, el carcinoma de pulmón de Lewis (3LL) de los ratones, que es uno de los tumores experimentales estudiados más exhaustivamente, puede utilizarse como modelo tumoral experimental. La eficacia de este modelo tumoral se ha correlacionado con efectos beneficiosos en el tratamiento de pacientes humanos con un diagnóstico de carcinoma microcítico de pulmón (SCCL). Este tumor puede introducirse en ratones normales mediante inyección de fragmentos tumorales procedentes de un ratón afectado o de células mantenidas en cultivo (Zupi y otros, *Br. J. Cancer*, 41, supl. 4: 309 [1980]), y las pruebas indican que los tumores pueden iniciarse a partir de la inyección incluso de una única célula y que una proporción muy elevada de células tumorales infectadas sobrevive. Para más información sobre este modelo tumoral véase, Zacharski, *Haemostasis*, 16: 300-320 [1986]).

40 45 50 Una manera de evaluar la eficacia de un compuesto de prueba en un modelo animal con un tumor implantado es medir el tamaño del tumor antes y después del tratamiento. Tradicionalmente, el tamaño de los tumores trasplantados se ha medido con un calibrador en dos o tres dimensiones. La medida limitada a dos dimensiones no refleja con precisión el tamaño del tumor, por lo tanto, normalmente se convierte en el volumen correspondiente utilizando una fórmula matemática. No obstante, la medición del tamaño del tumor es poco precisa. Los efectos terapéuticos de un posible fármaco se describen mejor como retraso del crecimiento y retraso específico del crecimiento inducidos por el tratamiento. Otra variable importante en la descripción del crecimiento de un tumor es el tiempo de duplicación del volumen del tumor. Hay disponibles programas informáticos para el cálculo y la descripción del crecimiento del tumor, tales como el programa de Rygaard y Spang-Thomsen, *Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals*, Wu y Sheng eds., Basilea, 1989, 301. No obstante, se observa que la necrosis y la respuesta inflamatoria posterior al tratamiento en realidad puede dar lugar a un aumento del tamaño del tumor, por lo menos inicialmente. Por lo tanto, es necesario controlar cuidadosamente los cambios, combinando un procedimiento morfométrico y el análisis citométrico de flujo.

55 60 Los modelos animales (transgénicos) recombinantes pueden manipularse introduciendo la parte codificante de los genes identificados en la presente en el genoma de animales de interés, utilizando técnicas estándar para la producción de animales transgénicos. Entre los animales que pueden actuar como diana para la manipulación transgénica se incluyen, sin limitación alguna, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpancés y simios. Las técnicas conocidas en el estado de la técnica para introducir un transgén a tales animales incluyen la microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, patente de EE.UU. US 4.873.191); transferencia de genes, mediada por retrovirus, a líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 6.148-615 [1985]); marcaje génico en células madre embrionarias (Thompson y otros, *Cell*, 56: 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, *Mol. Cell. Biol.*, 3: 1.803-1.814 [1983]); transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano y otros, *Cell*, 57: 717-73 [1989]). Para una revisión, véase, por ejemplo, patente de EE.UU. US 4.736.866.

65 70 Para los propósitos de la presente invención, entre los animales transgénicos se incluyen los que sólo llevan el transgén en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgén puede integrarse bien como un transgén único, o en concatámeros, por ejemplo, tándems de cabeza-a-cabeza o de cabeza-a-cola. También es posible introducir selectivamente un transgén en un tipo de célula particular siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 6.232-6.236 (1992).

La expresión del transgén en animales transgénicos puede controlarse mediante técnicas estándar. Por ejemplo, puede utilizarse el análisis de transferencia de Southern o la amplificación de la RCP para verificar la integración del

transgén. A continuación puede analizarse el nivel de expresión del ARNm utilizando técnicas tales como hibridación *in situ*, análisis de transferencia de Northern, RCP o inmunocitoquímica. Además los animales son examinados en busca de signos de desarrollo de tumor o de cáncer.

5 La eficacia de anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos identificados en la presente y de otros posibles fármacos también puede probarse en el tratamiento de tumores animales espontáneos. Un objetivo adecuado para tales estudios es el carcinoma de células escamosas (SCC) orales felino. El SCC oral felino es un tumor maligno muy invasivo que constituye el tumor maligno oral más frecuente de los gatos, dando cuenta de más del 60% de los tumores orales observados en esta especie. Raramente hace metástasis a sitios alejados, aunque esta baja incidencia
10 de metástasis puede ser simplemente un reflejo de la corta supervivencia de los gatos con este tumor. Normalmente estos tumores no pueden tratarse mediante cirugía, principalmente a causa de la anatomía de la cavidad oral de los felinos. Por ahora, no existe ningún tratamiento eficaz para este tumor. Antes de empezar el estudio, se somete a cada uno de los gatos a una exploración clínica completa, a una biopsia y a una tomografía computarizada (TC). Los gatos con un diagnóstico de tumor de células escamosas oral sublingual son excluidos del estudio. La lengua puede
15 paralizarse como resultado de tal tumor, e incluso si el tratamiento elimina el tumor, es posible que los animales no sean capaces de alimentarse. Cada gato es tratado repetidamente, durante un período prolongado de tiempo. Durante el período de tratamiento, y en cada uno de los chequeos posteriores, será necesario tomar diariamente fotografías de los tumores. Después del tratamiento, se somete a cada gato a otra TC. Después, las TC y los radiogramas torácicos son evaluados cada 8 semanas. Los datos son evaluados en busca de diferencias en la supervivencia, respuesta y
20 toxicidad en comparación con los grupos control. La respuesta positiva puede requerir pruebas de regresión del tumor, preferiblemente con mejoría de la calidad de vida y/o aumento del tiempo de vida.

Además, también pueden probarse otros tumores animales espontáneos, tales como fibrosarcoma, adenocarcinoma, linfoma, condroma, leiomiosarcoma de los perros, gatos y babuinos. De éstos, el adenocarcinoma mamario de perros y gatos es un modelo preferido ya que su apariencia y comportamiento son muy similares a los de los humanos. No obstante, el uso de este modelo está limitado por la ocurrencia poco frecuente de este tipo de tumor en animales.

H. Análisis de cribado de posibles fármacos

30 Los análisis de cribado de posibles fármacos han sido diseñados para identificar compuestos que se unen competitivamente, o forman complejos, con el receptor o receptores de los polipéptidos identificados en la presente, o cualquier otra señal a través de tal receptor o receptores. Dichos análisis de cribado incluirán análisis que permitan un cribado muy productivo de las genotecas químicas, lo que los convierte en particularmente adecuados para identificar posibles fármacos de moléculas pequeñas. Entre las moléculas pequeñas contempladas se incluyen compuestos
35 orgánicos o inorgánicos sintéticos, incluidos péptidos, preferiblemente péptidos solubles, fusiones de (poli)péptido-inmunoglobulina, y, en particular, anticuerpos entre los que se incluyen, sin limitación alguna, anticuerpos monoclonales y policlonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones químéricas o humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Los análisis pueden llevarse a cabo en una variedad de formatos, tales como análisis de unión proteína-proteína, análisis bioquímicos de cribado, inmunoanálisis y análisis a partir de células, que son bien caracterizadas en el estado
40 de la técnica.

En los análisis de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede ser aislado o detectado en la mezcla de reacción. En una realización particular, un receptor de un polipéptido codificado por el gen identificado en la presente o el posible fármaco es inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante enlaces covalentes o no covalentes. Un enlace no covalente generalmente se obtiene recubriendo la superficie sólida con una disolución del polipéptido y secando. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido que será inmovilizado para anclarlo a la superficie sólida. El análisis se lleva a cabo añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción ha terminado, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente no inmovilizado originalmente lleva un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se ha producido la formación de complejos. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva un marcador, puede detectarse la formación de complejos, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el posible compuesto interacciona con un receptor en particular pero no se une al mismo, puede analizarse su interacción con aquel polipéptido mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos análisis incluyen procedimientos tradicionales, tales como, entrecruzamiento, coimmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o de columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse utilizando un sistema genético a partir de levaduras descrito por Fields y sus colaboradores [Fields y Song, *Nature* (Londres), 340: 245-246 (1989); Chien y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9.578-9.582 (1991)] tal como describieron Chevray y Nathans [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5.789-5.793 (1991)]. Varios activadores
65 transcripcionales, tales como la levadura GAL4, consisten en dos dominios modulares separados físicamente, uno que actúa como el dominio de unión al ADN, mientras el otro funciona como dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levaduras descrito en las publicaciones anteriores (al que generalmente se hace referencia como el "sistema de dos híbridos") saca provecho de esta propiedad, y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que

la proteína diana se fusiona con el dominio de unión al ADN de GAL4, y otra, en la cual las posibles proteínas de activación se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos de interacción son detectadas con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Un equipo completo (MATCHMAKERTM) para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos se halla comercialmente disponible en Clontech. Este sistema también puede extenderse al mapeo de dominios proteínicos involucrados en interacciones proteínicas específicas, así como para identificar residuos de aminoácido que son cruciales para estas interacciones.

10 *I. Compuestos farmacéuticos*

Los polipéptidos de la presente invención, proteínas que se unen específicamente a los anticuerpos agonistas identificados en la presente, así como otras moléculas identificadas mediante análisis de cribado descritos en la presente, pueden ser administrados para el tratamiento de tumores, incluidos cánceres, en forma de compuestos farmacéuticos.

15 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, a partir de secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia proteínica diana. Tales péptidos sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90: 7.889-7.893 [1993]).

20 La formulación de la presente también puede contener más de un compuesto activo, si hace falta, para el caso particular tratado, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no tengan entre sí efectos adversos. Alternativamente, o además, el compuesto puede comprender un agente que potencie su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citocina, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas existen adecuadamente combinadas en cantidades que son eficaces para los fines pretendidos.

25 Las formulaciones terapéuticas de los polipéptidos identificados en la presente, o agonistas de los mismos, se preparan para su almacenaje mezclando el ingrediente activo que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables optativos (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas, y entre ellos se incluyen tampones tales como: fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como cloruro de amoníaco octadecildimetilbencil; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, butil o bencil alcohol; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de unos 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos como glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trealosa o sorbitol; contraiones que forman sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos proteína-Zn); y/o surfactantes no iónicos tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

30 La formulación de la presente también puede contener más de un compuesto activo si hace falta, para el caso particular tratado, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no tengan entre sí efectos adversos. Alternativamente, o además, el compuesto puede comprender un agente citotóxico, citocina, o un agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas existen adecuadamente combinadas en cantidades que son eficaces para los fines pretendidos.

35 Los ingredientes activos también pueden hallarse dentro de microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración del fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

40 55 Las formulaciones utilizadas para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o después de la liofilización y reconstitución.

45 Los compuestos terapéuticos de la presente generalmente se colocan en un recipiente que tenga un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica.

50 55 Pueden prepararse preparados de liberación prolongada. Son ejemplos adecuados de preparados de liberación prolongada las matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, las cuales matrices se presentan como artículos con forma, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación prolongada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de EE.UU. US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, etileno-vinil acetato no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glucólico degradables tales como el LUPRON

5 DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por el copolímero ácido láctico-ácido glucólico y acetato de leuprórido), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras polímeros tales como el etileno-vinil acetato y el ácido láctico-ácido glucólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo
10 prolongado, pueden desnaturalizarse o formar agregados como resultado de la exposición a humedad a 37°C, lo que da lugar a pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Dependiendo del mecanismo implicado, pueden planificarse estrategias razonables para la estabilización. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace intermolecular S-S a través del intercambio tio-disulfuro, puede conseguirse la estabilización modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados y fabricando compuestos de matriz polimérica específicos.

J. Procedimientos de tratamiento

15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 Está previsto que los polipéptidos de la presente invención y sus agonistas, incluidos anticuerpos, péptidos y agonistas de moléculas pequeñas, puedan ser utilizados para tratar varios tumores, por ejemplo, cánceres. Entre los ejemplos de enfermedades o trastornos que hay que tratar se incluyen tumores benignos o malignos (por ejemplo, carcinomas renales, de hígado, de riñón, de vejiga urinaria, de mama, gástricos, ováricos, colorrectales, de próstata, pancreáticos, pulmonares, vulvales, tiroideos, hepáticos; sarcomas; glioblastomas, y varios tumores de cabeza y cuello); leucemias y neoplasias linfocíticas; otros trastornos tales como trastorno neuronal, glial, astrocitoma, hipotalámico y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocíticos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Los agentes antitumorales de la presente invención (incluidos los polipéptidos descritos en la presente y agonistas que emulan su actividad, por ejemplo, anticuerpos, péptidos y moléculas orgánicas pequeñas) son administrados a un mamífero, preferiblemente un humano, según procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, o por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intraocular, intraarterial, intralesivo, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación.

Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración de los agentes anticancerígenos de la actual invención. Por ejemplo, el paciente que hay que tratar con tales agentes anticancerígenos también puede recibir radioterapia. Alternativamente, o además, puede administrarse un agente quimioterapéutico al paciente. Las pautas de preparación y administración de tales agentes quimioterapéuticos puede utilizarse según las instrucciones de los fabricantes o tal como haya determinado empíricamente el médico experto en la materia. Las pautas de preparación y administración de tal quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir, la administración del agente antitumoral de la presente invención, o puede administrarse simultáneamente con éste. Los agentes anticancerígenos de la presente invención pueden combinarse con un compuesto antiestrogénico tal como tamoxifeno o con una antiprogesteraona tal como onapristona (véase, EP 616812) a dosis conocidas para tales moléculas.

También puede ser deseable administrar anticuerpos contra los antígenos asociados al tumor, tales como anticuerpos que se unen a ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o además, pueden coadministrarse al paciente dos o más anticuerpos que se unan a los mismos antígenos o a dos o más antígenos distintos asociados al cáncer. A veces, puede ser beneficioso administrar también al paciente una o más citocinas. En una realización preferida, los agentes anticancerígenos de la presente se administran conjuntamente con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, puede administrarse en primer lugar el agente inhibidor del crecimiento, seguido de la administración de un agente anticancerígeno de la presente invención. No obstante, también se contempla la posibilidad de una administración simultánea o la administración del agente anticancerígeno de la presente invención en primer lugar. Las dosis adecuadas de agente inhibidor del crecimiento son las que se utilizan actualmente y pueden reducirse dada la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo de la presente.

Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosis apropiada de un agente antitumoral de la presente dependerá del tipo de enfermedad que deba tratarse, tal como se ha determinado anteriormente, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento anterior, de los antecedentes clínicos del paciente y la respuesta al agente, y el criterio del médico que lo atienda. El agente es adecuadamente administrado al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Los experimentos con animales proporcionan una orientación fiable para la determinación de dosis eficaces para el tratamiento en humanos. El escalonado de dosis eficaces entre especies puede llevarse 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 y otros, eds., Pergamon Press, Nueva York 1989, págs. 42-96.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, puede administrarse al paciente una posible dosis inicial de aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de un agente antitumoral, tanto, por ejemplo, mediante una o más administraciones independientes, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o durante más tiempo, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar la eliminación deseada de los síntomas de la enfermedad. No obstante, pueden ser útiles otros regímenes de dosis. La evolución de este tratamiento se controla fácilmente mediante técnicas y análisis convencionales. Se proporciona orientación sobre dosis particulares y los procedimientos

de administración en la literatura sobre el tema; véase, por ejemplo, patentes de EE.UU. US 4.657.760; US 5.206.344; o US 5.225.212. Se anticipa que las distintas formulaciones serán eficaces para compuestos terapéuticos distintos y trastornos distintos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede requerir un modo de administración distinto del de otro órgano o tejido.

5

K. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona 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 una etiqueta. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar hechos de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene un compuesto que es eficaz para el diagnóstico o 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 perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo del compuesto es un agente antitumoral de la presente invención. La etiqueta del recipiente, o asociada con el mismo, indica que el compuesto se utiliza para el diagnóstico o tratamiento de la enfermedad de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Además puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos de envase con instrucciones de uso.

Los siguientes ejemplos sólo tienen fines ilustrativos, y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

25 Todas las referencias de patentes y literatura sobre el tema mencionadas en la presente memoria se incorporan a ésta como referencia en su totalidad.

Ejemplos

30 Los reactivos comercialmente disponibles a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron según las instrucciones del fabricante a no ser que se indicara de otro modo. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de toda la memoria, por medio de números de accesión ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

35 Ejemplo 1

Cribado de homología del dominio extracelular para identificar polipéptidos nuevos y los ADNc que los codifican

40 Se utilizaron las secuencias de dominio extracelular (ECD) (incluida la secuencia señal de secreción, si hay alguna) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas procedentes de la base de datos pública Swiss-Prot para buscar bases de datos EST. Las bases de datos EST incluían bases de datos públicas (por ejemplo, Dayhoff, GenBank) y bases de datos privadas (por ejemplo, LIFESEQ®. Incyte pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se llevó a cabo utilizando el programa informático BLAST o BLAST-2 (Altschul y otros, *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996)) comparando las secuencias proteínicas ECD con una traducción de marco 6 de las secuencias EST. Estas 45 comparaciones con una puntuación BLAST de 70 (o en algunos casos 90) o mayor que no codificaban proteínas conocidas fueron agrupadas y ensambladas en secuencias de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

50 Utilizando este cribado de homología de dominio extracelular, las secuencias ADN consenso se ensamblaron con las otras secuencias EST identificadas utilizando phrap. Además, a menudo (pero no siempre), se ampliaron las secuencias ADN consenso obtenidas utilizando ciclos repetidos de BLAST o BLAST-2 y phrap para ampliar al máximo la secuencia consenso utilizando las fuentes de secuencias EST comentadas anteriormente.

55 A partir de las secuencias consenso obtenidas tal como se ha descrito anteriormente, se sintetizaron oligonucleótidos y se utilizaron para identificar mediante RCP una genoteca de ADNc que contenía la secuencia de interés y para utilizarlos como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante en toda su longitud de un polipéptido PRO. Los cebadores de la RCP directa y la RCP inversa generalmente tienen entre 20 y 30 nucleótidos y a menudo son diseñados para proporcionar un producto RCP con una longitud aproximada de 100-1.000 pb. Las secuencias de la sonda tienen habitualmente una longitud de 40-55 pb. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales 60 cuando la secuencia consenso es mayor de aproximadamente 1-1,5 pb. Para cribar diversas genotecas en busca de un clon en toda su longitud, se analizó el ADN de las genotecas mediante amplificación de la RCP, como hicieron Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, con el par del cebador RCP. A continuación se utilizó una genoteca positiva para aislar clones que codifican el gen de interés utilizando los oligonucleótidos de la sonda y uno de los pares del cebador.

65

Las genotecas de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc se construyeron mediante procedimientos estándar utilizando reactivos comercialmente disponibles tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se preparó con oligo-dT que contenía un sitio NotI, se unió directamente a adaptadores hemiquinasa SalII, se escindió con NotI,

ES 2 281 704 T3

se le dio el tamaño apropiado mediante electroforesis en gel y se clonó en una orientación determinada en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SfiI; véase, Holmes y otros, *Science*, 253: 1.278-1.280 (1991) en los sitios XhoI y NotI originales.

5 Ejemplo 2

Aislamiento de clones ADNc que codifican el PRO320 humano

10 Se ensambló una secuencia de ADN consenso con otras secuencias EST utilizando phrap tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Esta secuencia consenso ha sido diseñada en la presente como ADN 28739. A partir de la secuencia consenso del ADN 28739, se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar mediante RCP una genoteca de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para utilizarlos como sondas para aislar un clon en toda su longitud de la secuencia codificante del PR0320.

15 Se sintetizaron un par de cebadores de la RCP (directo e inverso):

cebador directo de la RCP:

5'-CCTCAGTGGCACATGCTCATG-3' (SEC ID N.º: 3)

20

Cebador inverso de la RCP:

5'-GGCTGCACGTATGGCTATCCATAG-3' (SEC ID N.º: 4)

25

Adicionalmente, se construyó una sonda de hibridación de nucleótidos sintética a partir de la secuencia consenso de ADN 28739 que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

30 sonda de hibridación:

5'-GATAAACTGTCAGTACAGCTGTGAAGACACAGAAGAAGGGCACAGTGCC-3' (SEC ID N.º: 5)

35

Para cribar varias genotecas en busca de una fuente de un clon en toda su longitud, se cribó el ADN de las genotecas mediante amplificación de la RCP con el par de cebadores de la RCP identificados anteriormente. A continuación se utilizó una genoteca positiva para aislar clones que codifican el gen PRO320 utilizando los oligonucleótidos de la sonda y uno de los cebadores de la RCP. El ARN para la construcción de las genotecas de ADNc se aisló a partir de tejido pulmonar fetal humano (LIB025).

40

La secuenciación de ADN de los clones aislados tal como se ha descrito anteriormente proporcionó la secuencia de ADN en toda su longitud para el ADN 32284-1307 [figura 1 SEC ID N.º: 1]; y la secuencia proteínica derivada para el PRO320.

45

La secuencia codificante completa del ADN 32284-1307 se incluye en la figura 1 (SEC ID N.º: 1). El clon de ADN 32284-1307 contiene un único marco abierto de lectura con un sitio aparente de iniciación de la traducción en las posiciones 135-137 del nucleótido, y un codón de terminación aparente en las posiciones 1.149-1.151 del nucleótido. El precursor del polipéptido predicho tiene una longitud de 338 aminoácidos. El análisis de la secuencia del PRO320 en toda su longitud representada en la figura 2 (SEC ID N.º: 2) evidencia la presencia de una variedad de dominios importantes del polipéptido, en el que las localizaciones dadas para estos dominios importantes del polipéptido son aproximadas tal como se ha descrito anteriormente. El análisis del polipéptido PRO320 en toda su longitud representado en la figura 2 evidencia la presencia de lo siguiente: un péptido señal de aproximadamente 1 aminoácido a aproximadamente 21 aminoácidos; un sitio de amidación de aproximadamente 330 aminoácidos a aproximadamente 334 aminoácidos; sitios de hidroxilación del ácido aspártico y la asparagina de aproximadamente 109 aminoácidos a aproximadamente 121 aminoácidos, de aproximadamente 191 aminoácidos a aproximadamente 203 aminoácidos, y de aproximadamente 236 aminoácidos a aproximadamente 248 aminoácidos; un patrón característico de cisteínas con dominios del tipo EGF de aproximadamente 80 aminoácidos a aproximadamente 91 aminoácidos; dominios del tipo EGF de unión al calcio de aproximadamente 103 aminoácidos a aproximadamente 125 aminoácidos, de aproximadamente 230 aminoácidos a aproximadamente 252 aminoácidos y de aproximadamente 185 aminoácidos a aproximadamente 207 aminoácidos. El clon de ADN 32284-1307 fue presentado junto con el ATCC el 11 de marzo de 1998 y se le asignó el n.º de depósito ATCC 209670. La proteína PR0320 en toda su longitud representada en la figura 2 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 37.143 daltons y un pI de aproximadamente 8,92.

65

Ejemplo 3

Utilización del PRO320 como sonda de hibridación

- 5 El procedimiento siguiente describe la utilización de una secuencia de nucleótidos codificante del PRO320 como sonda de hibridación.

10 El ADN que comprende la secuencia codificante del PRO320 en toda su longitud o maduro (tal como se representa en la figura 1, SEC ID N.º: 1) o un fragmento de la misma es utilizado como sonda para cribar los ADN homólogos 15 (tales como las variantes codificantes del PRO320 de aparición natural) en genotecas de ADNc de tejido humano o en genotecas genómicas de tejido humano.

15 La hibridación y lavado de los filtros que contienen cualquiera de los ADN de las genotecas se lleva a cabo en las siguientes condiciones de restricción elevada. La hibridación de una sonda radiomarcada obtenida a partir del gen que codifica un polipéptido PRO320 en los filtros se lleva a cabo en una disolución de formamida al 50%, SSC 5x, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8, solución de Denhardt 2x y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se lleva a cabo en una disolución acuosa de SSC 0,1x y SDS al 0,1% a 42°C.

- 20 A continuación, pueden identificarse los ADN que tienen la identidad de secuencia deseada con la secuencia natural en toda su longitud del ADN codificante utilizando técnicas estándar conocidas en el estado de la técnica.

Ejemplo 4

25 *Expresión del PRO320 en *E. coli**

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma del PRO320 sin glucosilar mediante expresión recombinante en *E. coli*.

30 La secuencia de ADN que codifica el PRO320 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de la RCP seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios en la enzima de restricción que correspondan a los sitios de la enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Pueden utilizarse una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de vector adecuado es el pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolívar y otros, *Gene*, 2: 95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector es digerido con enzimas de restricción y desfosforilado. A continuación se unen las secuencias amplificadas de la RCP al vector. El vector incluirá preferiblemente secuencias que codifican un gen de resistencia a antibióticos, un promotor trp, un líder poli-his (incluidos los primeros seis codones STII, secuencia poli-his y sitio de escisión enterocinasa), la región codificante del PRO320, el terminador transcripcional lambda y un gen *argU*.

40 La mezcla de ligación se utiliza a continuación para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada utilizando los procedimientos descritos en Sambrook y otros, *supra*. Los transformadores son identificados por su capacidad de crecer sobre placas LB y a continuación se seleccionan las colonias resistentes a antibióticos. El ADN de plásmidos puede aislarse y confirmarse mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

45 Los clones pueden cultivarse durante toda la noche en un medio de cultivo líquido tal como un caldo LB complementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche puede utilizarse posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación se cultivan las células a una densidad óptica deseada, durante la cual se activa el promotor de expresión.

50 Después de cultivar las células durante varias horas más, pueden recogerse las células mediante centrifugación. El sedimento celular obtenido mediante la centrifugación puede solubilizarse utilizando varios agentes conocidos en el estado de la técnica, y a continuación puede purificarse la proteína PRO320 solubilizada utilizando una columna quelante de metales en condiciones que permiten la unión estrecha de la proteína.

55 El PRO320 puede ser expresado en *E. coli* en una forma etiquetada (*tagged*) poli-his, utilizando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica el PRO320 es inicialmente amplificado utilizando cebadores de la RCP seleccionados. Los cebadores contendrán sitios en la enzima de restricción que corresponden a los sitios en la enzima de restricción del vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio fiable y eficaz de la traducción, una purificación rápida en la columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enterocinasa. Las 60 secuencias poli-his etiquetadas (*tagged*) amplificadas mediante RCP son ligadas a continuación a un vector de expresión, que se utiliza para transformar un huésped *E. coli* basado en una cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts (htpRts) clpP(lacIq)). Los transformadores se cultivan en primer lugar en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta que se obtiene un OD600 de 3-5. A continuación los cultivos son diluidos 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de sodio-2H₂O, 1,07 g KCl, 5,36 g de extracto de levaduras Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y cultivados durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras 65 son extraídas para verificar la expresión mediante análisis SDS-PAGE, y el grueso del cultivo es centrifugado para sedimentar las células. Los sedimentos celulares son congelados hasta su purificación y replegamiento.

La pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (6-10 g sedimentos) es resuspendida en 10 volúmenes de tampón (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, pH 8. Se añade sulfito de sodio y tetraionato de sodio sólidos para obtener las concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y se mantiene la disolución en agitación durante toda la noche a 4°C. Este paso da como resultado una proteína desnaturizada con todos los residuos cisteína bloqueados 5 por sulfitolización. La disolución es centrifugada a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante es diluido con 3-5 volúmenes de tampón de una columna quelante de metales (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y filtrado a través de filtros de 0,22 micrones para clarificar. El extracto clarificado es cargado en una columna quelante de metales Ni²⁺-NTA Qiagen de 5 ml equilibrada en el tampón de la columna quelante de metales. 10 La columna se lava con un tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína es eluida con un tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada son agrupadas y almacenadas a 4°C. La concentración de proteínas se calcula mediante su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado a partir de su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas son replegadas diluyendo la muestra lentamente en un tampón de repliegue recién preparado que 15 consta de: tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína S mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de repliegue se eligen de modo que la concentración de proteínas final sea entre 50 y 100 microgramos/ml. La disolución de repliegue se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de repliegue termina con la adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de otra purificación de la proteína, 20 se filtra la disolución a través de un filtro de 0,22 micrones y se añade acetonitrilo hasta la concentración final de 2-10%. La proteína replegada es sometida a cromatografía en una columna de fase inversa Pores RI/H utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo de 10 al 80%. Las muestras de fracciones con absorbancia A₁₈₀ son analizadas en geles de poliacrilamida SDS y las fracciones que contienen proteína replegada homogénea son agrupadas. Generalmente, las especies replegadas apropiadamente de la mayor parte de proteínas son 25 eluidas a concentraciones más bajas de acetonitrilo ya que esas especies son las más compactas con su parte interna hidrófoba que evita la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas suelen eluirse a concentraciones más altas de acetonitrilo. Además, para separar las formas mal plegadas de proteínas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina endotoxina de las muestras.

Las fracciones que contienen el polipéptido PRO320 plegado deseado son agrupadas y se elimina el acetonitrilo 30 utilizando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la disolución. Las proteínas son formuladas en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro de sodio 0,14 M y manitol al 4% mediante diáisisis o mediante filtración con gel utilizando resinas Superfine G25 (Pharmacia) equilibradas en el tampón de la formulación y filtradas de manera estéril.

En el documento WO 00/37 638, los polipéptidos fueron expresados satisfactoriamente en *E. coli* en una forma 35 etiquetada (*tagged*) poli-his mediante el procedimiento anterior.

Ejemplo 5

Expresión del PRO320 en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada del PRO320 mediante expresión 40 recombinante en células de mamíferos.

El vector, pRK5 (véase EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989), se utiliza como el vector de expresión. 45 Opcionalmente, el ADN del PRO320 se liga a pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN del PRO320 utilizando procedimientos de ligación tales como los descritos en Sambrook y otros, *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-PRO320.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC 50 CCL 1573) son cultivadas hasta confluir en placas de cultivo tisular en un medio tal como DMEM complementado con suero fetal de ternera y opcionalmente nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-PRO320 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen del ARN de VA ARN [Thimmappaya y otros, *Cell*, 31: 543 (1982)] y se disuelven en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl₂ 0,227 M. A esta mezcla se añaden, por goteo, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO₄ 1,5 mM, y ello permite la formación 55 de un precipitado a los 10 minutos a 25°C. El precipitado es suspendido y añadido a las células 293 y se deja reposar durante unas cuatro horas a 37°C. Se extrae el medio de cultivo y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación se lavan las células 293 con un medio libre de suero, se añade un medio fresco y se incuban las células durante aproximadamente 5 días.

Al cabo de aproximadamente 24 horas de las transfecciones, se elimina el medio de cultivo y se sustituye por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contenga 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S-metionina. Tras 12 horas de incubación, se extrae el medio condicionado, se concentra en un filtro de centrifugación y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede desecarse y dejar que forme una película durante un período de tiempo seleccionado para descubrir la presencia del polipéptido PRO320. Los cultivos que contienen células transfectadas 65 pueden someterse a otra incubación (en un medio libre de suero) y el medio es analizado en bioanálisis seleccionados.

En una técnica alternativa, puede introducirse transitoriamente el PRO320 en células 293 utilizando el procedimiento con sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 72: 7.575 (1981), las células

293 son cultivadas hasta una densidad máxima en un matraz de centrifugación y se añaden 700 μ g de ADN pRK5-PRO320. En primer lugar se concentran las células del matraz de centrifugación mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado ADN-dextrano es incubado en el sedimento celular durante cuatro horas. Las células son tratadas con glicerol al 20% durante 90 segundos, lavadas con medio de cultivo tisular y reintroducidas en el matraz de centrifugación que contiene medio de cultivo tisular, 5 μ g/ml de insulina bovina y 0,1 μ g/ml de transferrina bovina. Al cabo de unos cuatro días, el medio condicionado es centrifugado y filtrado para eliminar células y residuos. La muestra que contiene el PRO320 expresado puede concentrarse y purificarse a continuación mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como diálsis y/o cromatografía de columna.

10 En otra realización, puede ser expresado en células CHO. El pRK5-PRO320 puede ser transfectado en células CHO utilizando reactivos conocidos tales como CaPO o DEAE-dextrano. Tal como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden ser incubados y el medio sustituido por medio de cultivo (solo) o por un medio que contenga un marcador radioactivo tal como "S-metionina". Despues de determinar la presencia de un polipéptido PRO320, el medio de cultivo puede ser sustituido por un medio libre de suero. Preferiblemente, los cultivos son incubados durante 15 unos 6 días y a continuación se recoge el medio condicionado. A continuación, puede concentrarse y purificarse el medio que contiene el polipéptido PRO320 expresado mediante cualquier procedimiento seleccionado.

20 El PRO320 de epítopo etiquetado (*tagged*) también puede expresarse en células CHO huésped. El PRO320 puede subclonarse a partir del vector pRK5. El inserto del subclon puede someterse a RCP para fusionarse en marco con un epítopo *tag* seleccionado tal como un *tag* poli-his en un vector de expresión de baculovirus. A continuación puede 25 subclonarse el inserto del PRO320 etiquetado (*tagged*) poli-his en un vector dirigido SV40 que contenga un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Por último, las células CHO pueden ser transfectadas (tal como se ha descrito anteriormente) con un vector dirigido SV40. El marcado puede llevarse a cabo, tal como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. A continuación puede concentrarse y purificarse el medio de cultivo 25 que contiene el PRO320 etiquetado (*tagged*) poli-his expresado mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelatos Ni^{2+} .

30 El PRO320 también puede expresarse en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

35 La expresión estable en células CHO se lleva a cabo utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas son expresadas como una construcción IgG (inmunoadhesina), en el que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, dominios extracelulares) de las proteínas respectivas son fusionadas a una secuencia de regiones constantes IgGI que contiene la región bisagra, los dominios CH2 y CH2 y/o como una forma etiquetada (*tagged*) poli-his.

40 Tras la amplificación mediante RCP, los ADN respectivos son subclonados en un vector de expresión CHO utilizando técnicas estándar tal como se ha descrito en Ausubel y otros, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley y Sons (1997). Los vectores de expresión CHO se construyen para disponer de los sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el lanzamiento conveniente de los ADNc. El vector utilizado en la expresión en células CHO es tal como se ha descrito en Lucas y otros, *Nucl. Acids Res.*, 24: 9 (1.774-1.779 (1996) y utiliza el promotor/potenciador inmediato de SV40 para conducir la expresión del ADNc de interés y de la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de la DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

45 Se introducen doce microgramos del ADN plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando los reactivos de transfección comercialmente disponibles Superfect® (Quiagen), Dospers® o Fugene® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan tal como se describe en Lucas y otros, *supra*. Se congelan aproximadamente 3×10^{-7} células en un recipiente de vidrio para el posterior cultivo y producción tal como se describe a continuación.

50 Los recipientes de vidrio que contienen el ADN plásmido son licuados colocándolas en un baño de agua y se mezclan en vórtex. El contenido se pipetea a un tubo de centrifugación que contiene 10 ml de medio y se centrifuga a 1.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante es aspirado y las células son resuspendidas en 10 ml de medio selectivo (0,2 μ m de PS20 filtrado con 0,2 μ m de suero bovino fetal diafiltrado al 5%). A continuación se distribuyen las células en un centrifugador de 100 ml que contiene 90 ml de medios selectivos. Al cabo de 1-2 días, las células son 55 transferidas a un centrifugador de 250 ml que contiene 150 ml de medio de cultivo selectivo y se incuban a 37°C. Al cabo de otros 2-3 días, se siembran los centrifugadores de 250 ml, 500 ml y 2.000 ml con 3×10^3 células/ml. Los medios celulares son sustituidos por medios recién preparados mediante centrifugación y resuspensión en un medio de producción. Aunque puede utilizarse cualquier medio CHO adecuado, en realidad puede utilizarse un medio de producción descrito en la patente de EE.UU. US 5.122.469, publicada el 16 de junio de 1992. En un centrifugador de producción de 3 l se siembran $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determinan el número de células y el pH. El día 1, se muestrea el centrifugador y se inicia la agitación con aire filtrado. El día 2, se muestrea el centrifugador, se modifica la temperatura hasta 33°C y se toman 30 ml de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35%; Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). Durante la producción, se ajusta el pH 60 cuando sea necesario para mantenerlo alrededor de 7,2. Al cabo de 10 días, o hasta que la viabilidad disminuya por debajo del 70%, se recoge el cultivo celular mediante centrifugación y filtrando a través de un filtro de 0,22 μ m. El filtrado se almacena a 4°C o se carga de inmediato en columnas para su purificación.

En el caso de las construcciones etiquetadas (*tagged*) poli-his, las proteínas son purificadas utilizando una columna Ni²⁺-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado es bombeado en una columna Ni²⁺-NTA de 6 ml equilibrada en Hepes 20 mM, pH 7,4, un tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después de la 5 carga, se lava la columna con un tampón de equilibrio adicional y se eluye la proteína con un tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada es posteriormente desalada en un tampón de almacenado que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se almacena a -80°C.

10 Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) son purificadas de los medios condicionados tal como sigue. El medio condicionado es bombeado a una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que ha sido equilibrada en un tampón fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, se lava la columna a fondo con un tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida es inmediatamente neutralizada mediante extracción de fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 µl de tampón Tris 1 M, pH 9. Posteriormente 15 se desala la proteína altamente purificada en un tampón de almacenaje tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas (*tagged*) poli-his. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminales mediante degradación de Edman.

20 El PRO320 se expresa de manera estable en células CHO mediante el procedimiento descrito anteriormente. Además, los polipéptidos fueron expresados en células CHO mediante el procedimiento de expresión transitoria del documento WO 00/37638.

Ejemplo 6

25 Expresión del PRO320 en levadura

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante del PRO320 en levadura.

30 En primer lugar, se construyen los vectores de expresión de levaduras para la producción intracelular o secreción del PRO320 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica el PRO320 y el promotor es insertado en sitios adecuados de la enzima de restricción en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular directa del PRO320. Para la secreción, puede clonarse el ADN que codifica el PRO320 en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal del PRO320 natural u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, un factor alfa de levaduras o una secuencia líder/señal secretora de invertasa, y secuencias 35 conectoras (si hacen falta) para la expresión del PRO320.

40 A continuación pueden transformarse células de levaduras, tales como la cepa AB110 de levadura, con plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivados en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levaduras transformadas pueden ser analizados mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separados mediante SDS-PAGE, seguido de tinción de la descendencia con tinción de azul de Coomassie.

45 El PRO320 recombinante puede aislarse y purificarse eliminando posteriormente las células de levaduras del medio de fermentación mediante centrifugación y a continuación concentrando el medio utilizando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene el PRO320 también puede purificarse utilizando resinas de cromatografía de columna seleccionadas.

Ejemplo 7

50 Expresión del PRO320 en células de insecto infectadas por baculovirus

50 El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante en células de insecto infectadas por baculovirus.

La secuencia que codifica el PRO320 es fusionada en la dirección 5' de un epítopo *tag* contenido dentro de un vector de expresión de baculovirus. Tales epítopos *tag* incluyen *tags* poli-his y *tags* de inmunoglobulinas (como las 55 regiones Fc de la IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluidos los plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles tales como pVL1393 (Novagen). En resumen, la secuencia que codifica el PRO320 o la parte deseada de la secuencia codificante del PRO320 (tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular) es amplificada mediante RCP con cebadores complementarios hasta las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de la 60 enzima de restricción flanqueantes (seleccionados). A continuación el producto es digerido con aquellas enzimas de restricción seleccionadas y subclonado en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera mediante cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus Baculo-Gold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (comercialmente disponible en GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, se recogen los virus liberados y se utilizan en otras amplificaciones. La infección vírica y la expresión de proteínas se llevan a cabo tal como describieron O'Reilley y otros, *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

ES 2 281 704 T3

A continuación puede purificarse el PRO320 etiquetado (*tagged*) poli-his expresado, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad quelante Ni²⁺ tal como sigue. Los extractos se preparan a partir de células Sf9 recombinantes infectadas por virus tal como describieron Rupert y otros, *Nature*, 362: 175-179 (1993). En resumen, se lavan las células Sf9, se resuspenden en un tampón de sonicación (25 ml Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; KCl 0,4 M) y se someten dos veces a exposición de ultrasonidos durante 20 segundos en hielo. Se elimina mediante centrifugación el extracto sometido a sonicación, el sobrenadante se diluye 50 veces en un tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 mm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible en Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta que se recupera el estado inicial A₂₈₀ con un tampón de carga, en cuyo momento se inicia la recogida de fracciones. A continuación, se lava la columna con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM; NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína unida de un modo inespecífico. Después de alcanzar de nuevo el estado inicial A₂₈₀, la columna se pone a punto con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o mediante inmunotransferencia con Ni²⁺-NTA-conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el PRO320 etiquetado (*tagged*) His₁₀ eluidas son agrupadas y dializadas frente el tampón de carga.

Alternativamente, puede realizarse la purificación del PRO320 etiquetado (*tagged*) (o *tagged* Fc) de la IgG utilizando técnicas de cromatografía conocidas, entre las que se incluyen, por ejemplo, la cromatografía en columna de proteínas A o proteínas G.

Después de la amplificación mediante RCP, las secuencias codificantes respectivas son subclonadas en un vector de expresión de baculovirus (pb.PH.IgG para fusiones de IgG y pb.PH.His.c para proteínas etiquetadas *tagged* poli-his), y el vector y el ADN de baculovirus Baculogold® (Pharmingen) son cotransfectados en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") 105 (ATCC CRL 1711), utilizando lipofectina (Gibco BRL). pb.PH.IgG y pb.PH.His son modificaciones del vector de expresión de baculovirus comercialmente disponible pVL1393 (Pharmingen), con regiones policonectoras modificadas para incluir las secuencias *tag* his o Fc. Las células son cultivadas en medio TNM-FH de Hink complementado con FBS al 10% (Hyclone). Las células son incubadas durante 5 días a 28°C. Se recoge el sobrenadante y posteriormente se utiliza para la primera amplificación vírica mediante infección de células Sf9 en medio TNM-FH de Hink complementado con FBS al 10% a una multiplicidad de infección (MOI) aproximada de 10. Las células son incubadas durante 3 días a 28°C. Se recoge el sobrenadante y se determina la expresión de las construcciones en el vector de expresión de baculovirus mediante unión por lotes de 1 ml de sobrenadante con 25 ml de perlas Ni²⁺-NTA (QIAGEN) para proteínas etiquetadas (*tagged*) de histidina o con perlas CL-4B en una columna Sepharose de proteínas A (Pharmacia) para proteínas etiquetadas (*tagged*) de IgG seguido de análisis SDS-PAGE comparando con una concentración conocida de proteína estándar mediante tinción con azul de Coomassie.

El primer sobrenadante de la amplificación vírica se utiliza para infectar un cultivo celular con agitación centrífuga (500 ml) de células Sf9 cultivadas en medio ESF-921 (Expression Systems LLC) a una MOI aproximada de 0,1. Las células son incubadas durante 3 días a 28°C. Se recoge el sobrenadante y se filtra. Se repiten la unión por lotes y el análisis SDS-PAGE tantas veces como sea necesario hasta que se confirma la expresión del cultivo celular con agitación centrífuga.

El medio condicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 l) es recogido mediante centrifugación para eliminar las células y se filtra a través de filtros de 0,22 micrones. Para las construcciones etiquetadas (*tagged*) poli-his, se purifica la construcción proteínica utilizando una columna Ni²⁺-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado es bombeado a una columna Ni²⁺-NTA de 6 ml equilibrada en Hepes 20 mM, pH 7,4, un tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después de la carga, se lava la columna con un tampón de equilibrio adicional y se eluye la proteína con el tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada es posteriormente desalada en un tampón de almacenaje que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y almacenada a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) de proteínas son purificadas de los medios condicionados tal como sigue. El medio condicionado es bombeado en una columna de proteínas A de 5 ml (Pharmacia) que ha sido equilibrada en un tampón fosfato que contiene Na 20 mM y de pH 6,8. Después de la carga, se lava extensamente la columna con un tampón de equilibrio antes de llevar a cabo la elución con ácido cítrico 100 mM, a pH 3,5. La proteína eluida es neutralizada de inmediato mediante recogida de fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 ml de tampón Tris 1 M, a pH 9. La proteína altamente purificada es posteriormente desalada en un tampón de almacenaje tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas (*tagged*) poli-his. La homogeneidad de las proteínas se verifica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (PEG) y secuenciación de aminoácidos del extremo terminal mediante degradación de Edman.

En el documento WO 00/37638, los polipéptidos fueron expresados en células de insecto Sf9 infectadas por baculovirus.

Alternativamente, puede utilizarse un procedimiento con baculovirus modificado incorporando high-5 células. En este procedimiento, el ADN que codifica la secuencia deseada es amplificado con sistemas adecuados, tales como

Pfu (Stratagene), o fusionada en dirección 5' de un epítopo *tag* contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichos *tags* de epítopo incluyen *tags* poli-his y *tags* de inmunoglobulina (como las regiones Fc de la IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluidos plásmidos obtenidos a partir de plásmidos comercialmente disponibles tales como pIE1-1 (Novagen). Los vectores pIE1-1 y pIE1-2 se han diseñado para la expresión constitutiva de proteínas recombinantes a partir del promotor ie1 de baculovirus en células de insecto transformadas de manera estable (I). Los plásmidos difieren únicamente en la orientación de los múltiples sitios de clonación y contienen todas las secuencias promotoras que se sabe que son importantes para la expresión génica mediada por IE1 en células de insecto no infectadas, así como el elemento potenciador de hr5, pIE1-1 y pIE1-2 incluyen el sitio de inicio de la traducción y pueden utilizarse para producir proteínas de fusión. En resumen, la secuencia deseada o la parte deseada de la secuencia (tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana) es amplificada mediante RCP con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de la enzima de restricción flanqueantes (seleccionados). A continuación el producto es digerido con aquellas enzimas de restricción seleccionadas y subclonado en el vector de expresión. Por ejemplo, los derivados de pIE1-1 pueden incluir la región Fc de la IgG humana (pb.PH.IgG) o un *tag* de 8 histidinas (pb.PH.His) en dirección 3' de la secuencia deseada. Preferiblemente, la construcción del vector es secuenciada para confirmación.

Las células High-5 se cultivan hasta una confluencia del 50% en las siguientes condiciones: 27°C, ausencia de CO₂, NO pen/strep. Para cada placa de 150 mm, se mezclan 30 µg del vector basado en pIE que contiene la secuencia con 1 ml de medio Ex-Cell (medio: Ex.Cell 401 + 1/100 l-Glu JRH Biosciences n.º 14401-78P (nota: este medio es sensible a la luz)), y en un tubo separado se mezclan 100 µl de CellFectin (CellFECTIN (G ibcoBRL n.º 10362-010) (mezclado en vórtex)) con 1 ml de medio Ex-Cell. Las dos disoluciones se combinan y se dejan incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añaden 8 ml de medio Ex-Cell a los 2 ml de la mezcla de ADN/CellFECTIN y ésta se extiende sobre células high-5 que han sido lavadas una vez con medio Ex-Cell. A continuación se incuba la placa en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se aspira la mezcla de ADN/CellFECTIN y se lavan las células una vez con Ex-Cell para eliminar el exceso de CellFECTIN, se añaden 30 ml de medio Ex-Cell recién preparado y se incuban las células durante 3 días a 28°C. Se recoge el sobrenadante y se determina la expresión de la secuencia en el vector de expresión de baculovirus mediante unión por lotes de 1 ml de sobrenadante con 25 ml de perlas Ni²⁺-NTA (QIAGEN) para proteínas etiquetadas (*tagged*) de histidina o con perlas CL-4B Sepharose de proteína A (Pharmacia) para proteínas etiquetadas (*tagged*) de IgG seguido de análisis SDS-PAGE comparando con una concentración conocida de referencia de proteína mediante tinción con azul de Coomassie.

El medio condicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 l) es recogido mediante centrifugación para eliminar las células y se filtra a través de filtros de 0,22 micrones. Para las construcciones etiquetadas (*tagged*) poli-his, se purifica la proteína que comprende la secuencia utilizando una columna Ni²⁺-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración 5 mM. El medio condicionado es bombeado a una columna Ni²⁺-NTA de 6 ml equilibrada en Hepes 20 mM, pH 7,4, un tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 48°C. Después de la carga, se lava la columna con un tampón de equilibrio adicional y se eluye la proteína con el tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada es posteriormente desalada en un tampón de almacenaje que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y almacenada a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) son purificadas de los medios condicionados tal como sigue. El medio condicionado es bombeado a una columna de proteínas A de 5 ml (Pharmacia) que ha sido equilibrada en un tampón fosfato que contiene Na 20 mM y con un pH de 6,8. Después de la carga, se lava extensamente la columna con un tampón de equilibrio antes de llevar a cabo la elución con ácido cítrico 100 mM, a pH 3,5. La proteína eluida es neutralizada de inmediato mediante recogida de fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 ml de tampón Tris 1 M, a pH 9. La proteína altamente purificada es posteriormente desalada en un tampón de almacenaje tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas (*tagged*) poli-his. La homogeneidad de la secuencia es evaluada mediante geles de poliacrilamida SDS y por secuenciación de aminoácidos del extremo terminal N mediante degradación de Edman y otros procedimientos analíticos en función de lo que se desee o haga falta.

En el documento WO 00/37638, los polipéptidos fueron expresados en células de insecto Sf9 infectadas por baculovirus.

55 Ejemplo 8

Preparación de anticuerpos que se unen al PRO320

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente al PRO320.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en el estado de la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que pueden utilizarse se incluyen el PRO320 purificado, proteínas de fusión que contienen PRO320 y células que expresan el PRO320 recombinante en la superficie de la célula. La selección del inmunógeno puede ser llevada a cabo por cualquier experto en la materia.

Ratones, tales como los Balb/c, son inmunizados con el inmunógeno PRO320 emulsionado en adyuvante completo de Freund e inyectados por vía subcutánea o intraperitoneal en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno es emulsionado en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research. Hamilton. MT) e inyectado

en las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados reciben una inyección de refuerzo 10-12 días más tarde con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Después de esto, durante varias semanas, los ratones también pueden recibir inyecciones de refuerzo con inyecciones de inmunización adicionales. Periódicamente pueden obtenerse muestras séricas de los ratones mediante sangrado retroorbital para someterlas a análisis ELISA para detectar anticuerpos anti-PRO320.

Después de detectar una titulación adecuada de anticuerpos, los animales "positivos" para anticuerpos pueden recibir una última inyección intravenosa de PRO320. Al cabo de tres o cuatro días, los ratones son sacrificados y se extraen las células del bazo. A continuación se fusionan las células del bazo (utilizando polietilenglicol al 35%) con una línea celular de mieloma murino seleccionada, tal como P3X63AgU. 1, disponible en la ATCC, N.º CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que a continuación pueden sembrarse en placas de cultivo celular de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

Las células de hibridoma serán cribadas mediante ELISA en busca de reactividad contra el PRO320. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados anti-PRO320 forma parte de las habilidades de la técnica.

Las células de hibridoma positivas pueden ser inyectadas por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singeneicos para producir ascitis que contiene los anticuerpos monoclonales anti-PRO320. Alternativamente, las células de hibridoma pueden ser cultivadas en matraces de cultivo tisular o "roller bonles". La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis puede conseguirse mediante precipitación de sulfato de amoníaco, seguida de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede utilizarse la cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o a la proteína G.

25 Ejemplo 9

Purificación de polipéptidos PRO320 utilizando anticuerpos específicos

Los polipéptidos PRO320 naturales o recombinantes pueden purificarse mediante una variedad de técnicas estándar en el ámbito de la purificación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido pro-PRO320, el polipéptido PRO320 maduro o el polipéptido pre-PRO320 es purificado mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO320 de interés. En general, una columna de inmunoafinidad se prepara mediante unión covalente del anticuerpo del polipéptido anti-PRO320 con una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de suero inmune bien mediante precipitación con sulfato de amoníaco o mediante purificación sobre una proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Asimismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de líquido de ascitis de ratón mediante precipitación con sulfato de amoníaco o mediante cromatografía sobre proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se une a la resina, se bloquea la resina y se lava la resina obtenida de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dicha columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido PRO320 mediante la preparación de una fracción de células que contiene el polipéptido PRO320 en una forma soluble. Este preparado se obtiene mediante solubilización de la célula entera o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por medio de la adición de detergente o mediante otros procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica. Alternativamente, puede secretarse en cantidades útiles el polipéptido PRO320 soluble que contiene una secuencia señal en el medio donde se cultivan las células.

Se hace pasar un preparado que contiene el polipéptido PRO320 soluble por la columna de inmunoafinidad y se lava la columna en condiciones que permitan la absorbancia preferente del polipéptido PRO320 (por ejemplo, tampones de elevada fuerza iónica en presencia de detergente). A continuación, se eluye la columna en condiciones que interrumpen la unión anticuerpo/polipéptido PRO320 (por ejemplo, un tampón de pH bajo tal como aproximadamente pH 2-3, o una concentración elevada de un caotrópico tal como urea o ión tiocianato) y se recoge el polipéptido PRO320.

50 Ejemplo 10

Cribado de fármacos

Esta invención es particularmente útil para el cribado de compuestos mediante polipéptidos PRO320 o un fragmento de unión del mismo en cualquiera de una variedad de técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido PRO320 o fragmento utilizado en tal prueba puede estar libre en la solución, estar fijado a un soporte sólido, hallarse en la superficie de una célula, o localizarse intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármacos utiliza células huésped eucariotas o procariotas que son transformadas de manera estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO320 o fragmento. Los fármacos son cribados contra tales células transformadas en análisis de unión competitiva. Dichas células, bien en forma viable o fijada, pueden utilizarse para análisis de unión estándar. Puede mesurarse, por ejemplo, la formación de complejos entre un polipéptido PRO320 o un fragmento del mismo

y el agente que se está probando. Alternativamente, puede examinarse la disminución en la formación de complejos entre el polipéptido PRO320 y su célula diana o los receptores diana causada por el agente que se está probando.

De hecho, la presente invención proporciona procedimientos de cribado para fármacos u otros agentes que pueden 5 afectar a una enfermedad o trastorno asociado a un polipéptido PRO320. Estos procedimientos comprenden poner en contacto tal agente con un polipéptido PRO320 o un fragmento del mismo y analizar: (i) en busca de la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO320 o un fragmento del mismo, o (ii) en busca de la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO320 o fragmento del mismo y la célula, mediante procedimientos bien conocidos 10 en el estado de la técnica. En dichos análisis de unión competitiva, habitualmente el polipéptido PRO320, o fragmento del mismo, está marcado. Tras la incubación adecuada, se separa el polipéptido PRO320 libre, o fragmento del mismo, de aquel presente en forma unida, y la cantidad de marcador libre o que no ha formado complejos es una medida de la capacidad del agente particular para unirse al polipéptido PRO320 o para interferir con el complejo polipéptido 15 PRO320/célula.

Otra técnica para cribar fármacos proporciona un cribado muy productivo para compuestos que presentan una afinidad de unión adecuada a un polipéptido y se describe con detenimiento en el documento WO 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Para decirlo de una forma resumida, se sintetizan grandes cantidades de distintos compuestos de prueba de péptidos pequeños sobre un sustrato sólido, tal como agujas de plástico o alguna otra superficie. En cuanto al polipéptido PRO320, se hacen reaccionar los compuestos de prueba de péptidos con el polipéptido PRO320 20 y se lavan. El polipéptido PRO320 unido es detectado mediante procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica. El polipéptido PRO320 purificado también puede cubrir directamente placas de cultivo para utilizarlo en las técnicas de cribado de fármacos mencionadas anteriormente. Además, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para atrapar el péptido e inmovilizarlo en un soporte sólido.

Esta invención también contempla el uso de análisis de cribado de fármacos competitivos en los que los anticuerpos 25 neutralizantes capaces de unirse al polipéptido PRO320 compiten específicamente con un compuesto de prueba para unirse al polipéptido PRO320 o a fragmentos del mismo. De esta manera, pueden utilizarse los anticuerpos para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigenicos con un polipéptido PRO320.

30 Ejemplo 11

Diseño razonable de fármacos

El objetivo de un diseño razonable de fármacos es producir análogos estructurales de un polipéptido biológicamente activo de interés (es decir, un polipéptido PRO320) o de moléculas de bajo peso molecular con las que éstos interactúan, por ejemplo, agonistas, antagonistas, o inhibidores. Puede utilizarse cualquiera de estos ejemplos para crear fármacos que son formas más activas o estables del polipéptido PRO320 o que potencian la función del polipéptido PRO320 *in vivo*, o interfieren en la misma (c.f., Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

En un procedimiento, la estructura tridimensional del PRO320, o de un complejo inhibidor del polipéptido PRO320, se determina mediante cristalografía de rayos x, mediante modelado informatizado o, más habitualmente, mediante una combinación de ambos procedimientos. Deben determinarse tanto la forma como las cargas del polipéptido PRO320 para explicar la estructura y determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Con menor frecuencia, puede obtenerse 40 información útil sobre la estructura del polipéptido PRO320 mediante modelado basado en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural relevante se utiliza para diseñar moléculas análogas parecidas al polipéptido PRO320 o para identificar inhibidores eficaces. Entre los ejemplos útiles de diseño razonable de fármacos se incluyen moléculas que tienen una mejor actividad o estabilidad, tal como demostraron Braxton y Wells, *Biochemistry*, 31: 7.796-7.801 (1992), o que actúan como inhibidores, agonistas, o antagonistas de péptidos naturales 45 tal como demostraron Athauda y otros, *J. Biochem.*, 113: 742-746 (1993).

También puede aislar un anticuerpo específico de una diana, seleccionado mediante análisis funcional, tal como se ha descrito anteriormente, y a continuación resolver su estructura cristalina. Este procedimiento, en principio, proporciona un "pharmacore" sobre el cual puede basarse el posterior diseño de fármacos. Es posible prescindir por 50 completo de la cristalografía de proteínas mediante la generación de anticuerpos antiidiotípicos contra un anticuerpo funcional, farmacológicamente activo. Como una imagen espectral de una imagen espectral, se esperaría que el sitio de unión de los anticuerpos antiidiotípicos fuera un análogo del receptor original. Entonces podría utilizarse el anticuerpo antiidiotípico para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actuarían entonces como el "pharmacore".

En virtud de la presente invención, pueden ponerse a disposición cantidades suficientes del polipéptido PRO320 para realizar tales estudios analíticos como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO320 proporcionado en la presente orientará a quienes utilizan técnicas de modelado mediante ordenador en lugar, o además, de la cristalografía de rayos X.

Ejemplo 12

ANÁLISIS ANTITUMORAL IN VITRO

- 5 La actividad antiproliferativa de los polipéptidos PRO320 se determinó en el análisis experimental de identificación de fármacos anticancerosos *in vitro* orientado a la enfermedad del National Cancer Institute (NCI), utilizando un análisis de unión basado en tinción de sulforhodamina B (SRB), esencialmente tal como describieron Skehan y otros, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82: 1.107-1.112 (1990). Las 60 líneas celulares de tumores utilizadas en este estudio (“el panel NCI”), así como las condiciones para su mantenimiento y cultivo *in vitro* han sido descritas por Monks y otros, *J. Natl. Cancer Inst.*, 83: 757-766 (1991). El objetivo de este análisis es evaluar inicialmente la actividad citotóxica y/o citostática de los compuestos de prueba contra distintos tipos de tumores (Monks y otros, *supra*: Boyd, *Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update*, 3(10): 1-12 [1989]).

15 Se recogieron con tripsina/EDTA (Gibco) células de aproximadamente 60 líneas celulares de tumores humanos, se lavaron una vez, se resuspendieron en IMEM y se determinó su viabilidad. Las suspensiones celulares se añadieron mediante pipeta (volumen de 100 μ l) a distintas placas de microtitulación de 96 pocillos. La densidad celular a los 6 días de incubación fue menor que a los 2 días de incubación para evitar el sobrecrecimiento. Los cultivos se dejaron durante un período de preincubación de 24 horas a 37°C para su estabilización. Las diluciones dos veces superiores a la concentración de prueba pretendida se añadieron en el tiempo cero en partes iguales de 100 μ l a los pocillos de la 20 placa de microtitulación (dilución 1:2). Estos compuestos fueron evaluados en cinco diluciones semilogarítmicas (de 1.000 a 100.000 veces). Los períodos de incubación fueron de dos días y de seis días en una atmósfera de CO₂ al 5% y una humedad del 100%.

25 Tras la incubación, se eliminó el medio y se fijaron las células en 0,1 ml de ácido tricloroacético al 10% a 40°C. Las placas se lavaron cinco veces con agua desionizada, se secaron, se tiñeron durante 30 minutos con 0,1 ml de tinción de sulforhodamina B al 0,4% (Sigma) disuelta en ácido acético al 1%, se lavaron cuatro veces con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no unido, se secaron y a los cinco minutos se extrajo el colorante con 0,1 ml de Tris base [tris (hidroximetilo) aminometano] 10 mM, pH 10,5. La absorbancia (OD) de la sulforhodamina B a 492 nm se midió utilizando un lector de interfaz informática de placas de microtitulación de 96 pocillos.

30 Se considera que una muestra de prueba es positiva si muestra por lo menos un efecto inhibidor del crecimiento del 40% a una o más concentraciones. Los resultados se representan en la siguiente tabla 4 donde las abreviaciones del tipo de célula tumoral son las siguientes:

35 NSCL = carcinoma de pulmón no microcítico; SNC = sistema nervioso central

TABLA 4

40	Compuesto	Tipo de célula tumoral	Designación
	PRO320	Leucemia	CCRF-CEM: RPM1-8226
45	PRO320	NSCL	HOP62; NCI 11322M
	PRO320	Colon	HCT-116
	PRO320	Renal	SN12C
50	PRO320	Mama	MDA-N
	PRO320	Ovario	OVCAR-3
55	PRO320	Melanoma	MALME-3M

Depósito del material

60 Los siguientes materiales han sido depositados junto con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

	Material	N.º dep. ATCC	Fecha de presentación
65	ADN32284-1307	209670	11 de marzo de 1998

Este depósito se llevó a cabo bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y sus regulaciones (Tratado de Budapest). Esto garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los depósitos serán puestos a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y 5 estarán sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc.. y ATCC, que garantizan la disponibilidad pública permanente e ilimitada de la descendencia del cultivo del depósito desde la publicación de la patente de EE.UU. pertinente o desde la presentación pública de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o del extranjero, la que llegue primero, y garantiza la disponibilidad de la descendencia a uno determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas Registradas de EE.UU. 10 a ser autorizado a eso de acuerdo con 35 U.S.C. § 122 y las reglas del Comisionado conforme a eso (incluida 37 CFR § 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud de patente ha acordado que si un cultivo de materiales en depósito muriera o se perdiera o destruyera habiendo sido cultivado en condiciones adecuadas, los materiales serán remplazados de inmediato tras notificación por otros de iguales. La disponibilidad del material depositado no tiene que entenderse 15 como una autorización para poner en práctica la invención en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes en materia de patentes.

La anterior memoria escrita se considera suficiente para permitir a un experto en la materia poner en práctica la invención. El alcance de la presente invención no se ve limitado por la construcción presentada, ya que la realización 20 presentada se considera una simple ilustración de algunos aspectos de la invención y otras construcciones que son funcionalmente equivalentes se hallan dentro del alcance de esta invención tal como se define en las reivindicaciones. La presentación de material de la presente no es una aceptación de que la descripción escrita contenida en la presente sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluida la mejor manera de la misma, ni pretende su construcción limitar el alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. En 25 realidad, son varias las modificaciones que además de las representadas y descritas en la presente serán claras para los expertos en la materia a partir de la descripción precedente y que se hallan dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un agente para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un tumor en un mamífero, en el que el agente es un polipéptido que tiene por lo menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos respecto de la longitud total de:
- (i) la secuencia de aminoácidos de residuos 1 o X a 338 que aparecen en la figura 2 (SEC ID N.º: 2), en la que X es cualquier residuo aminoácido del 17 al 26, o
- 10 (ii) un fragmento de la secuencia de aminoácidos que aparece en la figura 6, en el que el polipéptido tiene por lo menos una longitud de 10 aminoácidos y tiene actividad antiproliferativa *in vitro* contra las células del tumor.
- 15 2. Uso según la reivindicación 1, en la que el tumor es un cáncer.
3. Uso según la reivindicación 2, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de ovarios, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer uterino, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga urinaria, cáncer del sistema nervioso central, melanoma y leucemia.
- 20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el grado de identidad es de por lo menos un 90%.
5. Uso según la reivindicación 4, en el que el grado de identidad es de por lo menos un 95%.
- 25 6. Uso según la reivindicación 5, en el que el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de los residuos 1 o X a 338 que se muestra en la figura 2 (SEC ID N.º: 2), en el que X es cualquier residuo aminoácido de 17 a 26.
7. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X es 22.
- 30 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 7, en el que el polipéptido tiene una longitud de por lo menos 50 aminoácidos.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que el polipéptido tiene una longitud de por lo menos 100 aminoácidos.
- 35 10. Uso según la reivindicación 8, en el que el polipéptido tiene una longitud de por lo menos 150 aminoácidos.
11. Uso según la reivindicación 8, en el que el polipéptido tiene una longitud de por lo menos 200 aminoácidos.
- 40 12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el medicamento comprende además otro agente inhibidor del crecimiento, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico.
13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el mamífero es un ser humano.
- 45 14. Procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula tumoral, el procedimiento comprende exponer dicha célula tumoral a una cantidad eficaz de un agente tal como se ha definido en cualquier otra de las reivindicaciones 1 a 11.
15. Procedimiento de la reivindicación 14, en el que el tumor es tal como se define en la reivindicación 2 o en la reivindicación 3.

50

55

60

65

FIGURE 1

CGGACGGCTGGGTGGAGTGGAGCGGAGGACCCGAGCGCTGAGGAGAGAGGGAGGCGGGCGCTTAGCTGCTACGGGGTCCGGCGGCCCTCCCGAGGGGGCTCAGGAGGAGGAAGGAGGACCGCTGCGAGAATGCCTCTGCCCTGGA
GCCCTGGCGCTCCCGCTGCTCTCCTGGTGGCAGGTGGTTTCCGGAAACCGCGCCAGTGCAAGGCATCACGGGT
TGTTAGCATCGGCACGTCAGCCTGGGTCTGTCACTATGGAACCTAAACTGGCCTGCTGCTACGGCTGGAGAAGAA
ACAGCAAGGGAGTCTGTCAAGCTACATCGGAACCTGGATGTAAGTTGGTGAGTGCGTGGAGCCAACAAATGCA
GATGCTTTCAGGATAACACGGGAAAAACCTGCAAGTCAGATGTAAGTGAAATGAGTGGAATGAAACCCCGGCCATGCC
AACACAGATGTGAAATACACACCGGAAGCTACAAGTGCTTTGCCCTCAGTGGCCACATGCTCATGCCAGATGCTA
CGTGTGAACTCTAGGACATGTGCCATGATAACCTGTCAAGTCAGCTGTGAAGACACAGAAGAAGGGCCACAGT
GCCCTGTGTCATCCTCAGGACTCCGCTGGGCCCCAAATGGAAGAGACTGTCTAGAATATTGATGAAATGTGCCCTG
GTAAAGTCATCTGTCCCTACAATCGAAGATGTGTAACACATTTGGAAGCTACTACTGCAATGTCACATTGGTT
TCGAAC TGCAATATATCAGTGAACTGATATGACTGTATAAGATAAAATGAATGTACTATGGATAGCCATACGTGCA
GCCACCATGCCAATGCTCAATACCCCAAGGGTCTTCAGGTGTAATGCAAGCAGGGATATAAAGGCAATGGAC
TTCGGTGTCTGCTATCCTGCTACAATGGGAGGAACTTCCTCAGGCCACCTGGTACCATCAAGACAGAAATGCA
AGAAGTTGCTTGCTACAACAAACAGCATGAAAAGAAGGCAAAATTAAAATTTACCCAGAACCCACCCAGGA
CTCCTACCCCTAACGGTCAACTATGGAAGAGATAGTTCCAGAGGGGGAACTCTCATGGAG
GTAAAAAAGGAAATGAAAGAGAAATGAAAGAGGGGCTTGAGGATGAGAAAAGAGAAGAGAAGGGCAATGGAC
CATAGAGGAGGCCAGGCTTGAGGAGATGTGTTTCTCTAACGGTGAATGAAAGCAGGTGAAATTGGGCTGATTTCT
GGTCCAAGGAAAGCCCTAACGGTCAACTTCCAAACTGGAACATAAAAGATTAAATATCTGGTTGACTGCAGCTTCAATCA
TGGGATCTGTGACTCGAACCGGATAGAGAAGATGATTTCAGTGAATCCTGCTGATCGAGATAATGCTATTGG
CTTCTATATGGCAGTTCCGGCTTGGCAGGTACAGGAAAGACATGGCCGATTGAAACTTCTCCTACCTGACCT
GCAACCCCAAGCAACTTCGTTGCTCTTGATTACCGGCTGGCCGGAGACAAAGTCGGAAAACCTCGAGTGTT
TGTGAAAACAGTAAACAATGCCCTGGCATGGGAGAAGAGACCACGAGTGAGGATGAAAAGTGGAGAGACAGGGAAAAT
TCAGTTGTATCAAGGAAGTGTGATGCTACCAAAAGCATCATTTGAGCAGAACGTGGCAAGGGCAAAACCGGCGA
AATGGCAGTGGATGGCGCTTGCTTGGCTTGGCTTGTCCAGGCTTGTCCAGATAGCCTTATCTGTGGATGACTGAATGTT
ACTATCTTATATTGACTTTGTATGTCAGTTCCCTGGTTTTTGATATTGCACTCATAGGACCTCTGGCATT
AGAATTACTAGCTGAAAATTGTAATGTAACCAACAGAAATATTATGTAAGATGCCCTTCTGTATAAGATATGC
CAATATTGCTTAAATATCATACATGTAATCTCTCAGTCATTCTGAACTCTTCCNCATTATATTATAAAAT
NTGGAAAAGTCAGTTTATCCCTCTCNGTATATCTGATTGATANGTANGTTGATGNGCTCTCTCCTACAA
CATTTCTAGAAAATGAAAAAGCACAGAGAAATGTTAAGTGGACTCTTATGATACTTCTTGAAACT
TGACATCAAAGATAGACTTTGCCATAAGTGGCTTAGCTGGGTCTTCTAGCCAAACTTGATATTAAATTCTT
GTAATAATAA

FIGURE 2

Signal peptide:	Amino acids 1-21
Amidation site:	Amino acids 330-334
Aspartic acid and asparagine hydroxylation sites:	Amino acids 109-121; 191-203;236-248
EGF-like domain cysteine pattern signature:	Amino acids 80-91
Calcium-binding EGF-like domains:	Amino acids 103-125;230-252; 185-207

MPLPWSLALP¹LLSWVAGGFGNAASARHHGLLASARQPGVCHYG²TKLACCYG³WRRNSKG⁴VC⁵SATCEPGCKF⁶GECV⁷GPNKCR⁸C⁹FP¹⁰GYTG¹¹KTCSQ¹²DVN¹³ECGM¹⁴KPR¹⁵PCQ¹⁶HRC¹⁷VNT¹⁸HGSY¹⁹KC²⁰F²¹CLSG²²H²³MLMP²⁴DATC²⁵VNSRT²⁶CA²⁷MINC²⁸QYS²⁹CDT³⁰E³¹EGP³²PQ³³C³⁴L³⁵C³⁶P³⁷S³⁸G³⁹L⁴⁰R⁴¹L⁴²A⁴³P⁴⁴N⁴⁵R⁴⁶D⁴⁷C⁴⁸L⁴⁹D⁵⁰I⁵¹D⁵²I⁵³N⁵⁴E⁵⁵C⁵⁶T⁵⁷M⁵⁸D⁵⁹S⁶⁰H⁶¹T⁶²C⁶³S⁶⁴H⁶⁵N⁶⁶A⁶⁷N⁶⁸C⁶⁹F⁷⁰M⁷¹T⁷²O⁷³G⁷⁴S⁷⁵F⁷⁶K⁷⁷C⁷⁸K⁷⁹Q⁸⁰G⁸¹Y⁸²K⁸³G⁸⁴N⁸⁵L⁸⁶R⁸⁷C⁸⁸S⁸⁹A⁹⁰I⁹¹P⁹²E⁹³N⁹⁴S⁹⁵V⁹⁶K⁹⁷E⁹⁸V⁹⁹L¹⁰⁰R¹⁰¹P¹⁰²G¹⁰³T¹⁰⁴I¹⁰⁵K¹⁰⁶R¹⁰⁷I¹⁰⁸K¹⁰⁹L¹¹⁰A¹¹¹H¹¹²K¹¹³N¹¹⁴S¹¹⁵M¹¹⁶I¹¹⁷K¹¹⁸K¹¹⁹A¹²⁰K¹²¹I¹²²K¹²³N¹²⁴V¹²⁵U¹²⁶T¹²⁷P¹²⁸T¹²⁹P¹³⁰K¹³¹V¹³²N¹³³L¹³⁴Q¹³⁵P¹³⁶F¹³⁷N¹³⁸Y¹³⁹E¹⁴⁰E¹⁴¹I¹⁴²V¹⁴³S¹⁴⁴R¹⁴⁵G¹⁴⁶G¹⁴⁷N¹⁴⁸H¹⁴⁹G¹⁵⁰K¹⁵¹G¹⁵²N¹⁵³E¹⁵⁴E¹⁵⁵K¹⁵⁶N¹⁵⁷

ES 2 281 704 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.
5 <120> PROCEDIMIENTOS y COMPUESTOS PARA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS
<130> P2834RIPCT
<140> EP04007617.6
10 <141> 1999-12-02
<150> EP99960644.5
<151> 1999-12-02
15 <150> PCT/US99/28565
<151> 1999-12-02
<150> US 60/113.296
<151> 1998-12-22
20 <150> PCT/US99/05028
<151> 1999-03-08
<150> US 60/130.232
<151> 1999-04-21
25 <150> US 60/131.445
<151> 1999-04-28
<150> US 60/134.287
30 <151> 1999-05-14
<150> US 60/144.758
<151> 1999-07-20
<150> US 60/145.698
35 <151> 1999-07-26
<150> PCT/US99/21090
<151> 1999-09-15
40 <150> PCT/US99/21547
<151> 1999-09-15
<160> 5
<210> 1
45 <211> 2260
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
50 <220>
<221> dudoso
<222> 2009, 2026, 2033, 2055, 2074, 2078, 2086
<223> base desconocida
55 <400> 1

cggaacgtgt ggtgcgttgt gagcggaggaa cccgagcggtc tgaggagaga 50
60 ggaggcggtcg gcttagctgc tacgggttcc ggccggcgcc ctccccgaggg 100
gggtctggaa ggaggaaaggaa ggacccgtgc gagaatgtct ctgccttgaa 150

ES 2 281 704 T3

5 gccttgcgt cccgctgctg ctctcctggg tggcaggtgg tttcgaaac 200
gcggccagtg caaggcatca cgggttgtta gcacggcac gtcagcctgg 250
9 ggtctgtcac tatggaacta aactggcctg ctgctacggc tggagaagaa 300
acagcaaggg agtctgtgaa gctacatgcg aacctggatg taagtttgtt 350
14 gagtgcgtgg gaccaaacaa atgcagatgc tttccaggat acaccggaa 400
aacctgcagt caagatgtga atgagttgtgg aatgaaaaccc cggccatgcc 450
19 aacacagatg tgtgaataca cacggaaatc acaagtgttt ttgcctcagt 500
ggccacatgc tcatgccaga tgctacgtgt gtgaacttta ggacatgtgc 550
catgataaaac tgtcagtaca gctgtgaaga cacagaagaa gggccacagt 600
24 gcctgtgtcc atcctcagga ctccgcctgg ccccaaattgg aagagactgt 650
ctagatattg atgaatgtgc ctctggtaaa gtcatctgtc cctacaatcg 700
aagatgtgtg aacacatttg gaagctacta ctgcaaattgt cacattggtt 750
29 tcgaactgca atataatcagt ggacgatatg actgtataga tataaatgaa 800
tgtactatgg atagccatac gtgcagccac catgccaatt gttcaatac 850
34 ccaagggtcc ttcaagtgtt aatgcaagca gggatataaa ggcaatggac 900
tttgtgttc tgcataatccct gaaaattctg tgaaggaaatgt cttcagagca 950
cctggtacca tcaaagacag aatcaagaag ttgtttgttc acaaaaacag 1000
cataaaaaag aaggcaaaaa ttaaaaatgt taccggcggaa cccaccaggaa 1050
39 ctccatcccc taaggtgaac ttgcagccct tcaactatga agagatagtt 1100
tccagaggcg ggaactctca tggaggtaaa aaagggaaatg aagagaatgg 1150
aaagaggggc ttgaggatga gaaaagagaa gagaagccccc tgaagaatga 1200
44 catagaggag cgaaggcctgc gaggagatgt gttttccct aaggtgaatg 1250
aagcaggtga attcggcctg attctggtcc aaaggaaacg gctaacttcc 1300
aaactggAAC ataaagattt aaatatctcg gttgactgca gttcaatca 1350
59 tggatctgt gactggaaac aggatagaga agatgatTTT gactggaaatc 1400
ctgctgatcg agataatgtt attggcttct atatggcagt tccggcctgg 1450
gcaggtcaca agaaagacat tggccgattt gaaacttctcc tacctgaccc 1500
64 gcaaccccaa agcaacttct gtttgcttt tgattaccgg ctggccggag 1550
acaaagtccgg gaaacttcga gtgtttgtga aaaaacagtaa caatggcctg 1600
gcatggaga agaccacgag tgaggatgaa aagtggaaaga cagggaaaat 1650
79 tcagttgtat caaggaactg atgctaccaa aagcatcatt tttgaagcag 1700
aacgtggcaa gggcaaaacc ggcgaaatcg cagtggatgg cgtttgttt 1750

ES 2 281 704 T3

5 gtttcaggct tatgtccaga tagcctttta tctgtggatg actgaatgtt 1800
actatcttta tatttgactt tgtatgtcag ttcccctggtt tttttgatat 1850
tgcacatcatag gacccctctggc attttagaat tactagctga aaaattgtaa 1900
tgtacccaaca gaaatattat tgtaagatgc ctttcttgc taagatatgc 1950
10 caaatatttgc tttaaatatc atatcactgt atcttctcag tcatttctga 2000
atctttccnc attatattat aaaatntgga aangtcagtt tatctccct 2050
cctengtata tctgatttgt atangtangt tgatgngctt ctctctacaa 2100
15 catttctaga aaatagaaaaaaa aaaagcacag agaaaatgttt aactgtttga 2150
ctcttatgtat accttcttggaa aactatgaca tcaaagatag acctttgcct 2200
aagtggctta gctgggtctt tcatacgccaa acttgtatat ttaatttttt 2250
20 gtaataataaa 2260

25 <210> 2
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> *Hom*

30 <400> 2

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

ES 2 281 704 T3

	155	160	165
5	Ala Pro Asn Gly Arg Asp Cys Leu Asp Ile Asp Glu Cys Ala Ser		
	170	175	180
	Gly Lys Val Ile Cys Pro Tyr Asn Arg Arg Cys Val Asn Thr Phe		
	185	190	195
10	Gly Ser Tyr Tyr Cys Lys Cys His Ile Gly Phe Glu Leu Gln Tyr		
	200	205	210
	Ile Ser Gly Arg Tyr Asp Cys Ile Asp Ile Asn Glu Cys Thr Met		
	215	220	225
15	Asp Ser His Thr Cys Ser His His Ala Asn Cys Phe Asn Thr Gln		
	230	235	240
20	Gly Ser Phe Lys Cys Lys Cys Lys Gln Gly Tyr Lys Gly Asn Gly		
	245	250	255
	Leu Arg Cys Ser Ala Ile Pro Glu Asn Ser Val Lys Glu Val Leu		
	260	265	270
25	Arg Ala Pro Gly Thr Ile Lys Asp Arg Ile Lys Lys Leu Leu Ala		
	275	280	285
	His Lys Asn Ser Met Lys Lys Lys Ala Lys Ile Lys Asn Val Thr		
	290	295	300
30	Pro Glu Pro Thr Arg Thr Pro Thr Pro Lys Val Asn Leu Gln Pro		
	305	310	315
	Phe Asn Tyr Glu Glu Ile Val Ser Arg Gly Gly Asn Ser His Gly		
	320	325	330
35	Gly Lys Lys Gly Asn Glu Glu Lys		
	335	338	

	<210> 3	
40	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> Sonda de oligonucleótidos sintética	
	<400> 3	
50	cctcagtggc cacatgctca tg	
	<210> 4	
	<211> 24	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Sonda de oligonucleótidos sintética	
	<400> 4	
65	ggctgcacgt atggctatcc atag	
	<210> 5	

ES 2 281 704 T3

<211> 50
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5 <220>
<223> Sonda de oligonucleótidos sintética

<400> 5
10 gataaactgt cagtacagct gtgaagacac agaagaaggg ccacagtgcc 50

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65