



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 288 649**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04010433 .3**

(86) Fecha de presentación : **20.11.1998**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1481990**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2004**

(54) Título: **Antígenos tipo A-33 y sus utilizaciones farmacológicas.**

(30) Prioridad: **21.11.1997 US 66364 P
20.03.1998 US 78936 P
17.09.1998 WO PCT/US98/19437**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2008

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

(72) Inventor/es: **Ashkenazi, Avi;
Fong, Sherman;
Goddard, Audrey;
Gurney, Austin L.;
Napier, Mary A.;
Tumas, Daniel 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

Antígenos tipo A-33 y sus utilizaciones farmacológicas.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la identificación, aislamiento y producción recombinante de ADN novedoso y polipeptídicos novedosos, la presencia de los cuales está asociada con enfermedades inflamatorias (antígenos asociados con la inflamación) y/o cáncer, y a composiciones y procedimientos para el diagnóstico y el tratamiento de 10 condiciones caracterizadas por dichos antígenos.

Antecedentes de la invención

La respuesta inflamatoria es compleja y está mediada por una serie de moléculas de señalización producidas de 15 forma local por células mast, terminaciones nerviosas, plaquetas, leucocitos y activación de complementos. Ciertas moléculas de señalización provocan que el recubrimiento de células endoteliales se vuelva más poroso y/o incluso expresen selectinas que actúan como moléculas de la superficie celular que reconocen y atraen leucocitos a través del reconocimiento de carbohidratos específicos. La unión más fuerte de los leucocitos está mediada por las integrinas, las cuales median en el movimiento de los leucocitos a través del endotelio. Las moléculas de señalización adicionales 20 actúan como quimioatractores, provocando que los leucocitos unidos avancen lentamente hacia la fuente del atractor. Otras moléculas de señalización producidas en la evolución de una respuesta inflamatoria escapan a la sangre y estimulan la médula espinal para que produzca más leucocitos y se liberen al torrente sanguíneo.

La inflamación es iniciada habitualmente por un antígeno, el cual puede ser a la práctica cualquier molécula 25 capaz de iniciar una respuesta inmune. En condiciones fisiológicas normales éstas son moléculas exógenas, pero las moléculas generadas por el propio organismo pueden servir como catalizador como se sabe que pasa en varios estados de la enfermedad.

La proliferación de células T en un cultivo mixto de leucocitos o una reacción linfocitaria mixta (MLR) es una indicación establecida de la capacidad de un compuesto para estimular el sistema inmune. En una respuesta inflamatoria, 30 los leucocitos de respuesta pueden ser neutrofílicos, eosinofílicos, monocíticos o linfocíticos. El examen histológico de los tejidos afectados proporciona evidencias de una respuesta estimulante o inhibidora inmune. Ver *Current Protocols in Immunology*, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley and Sons, Inc.

La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) es un término utilizado para describir colectivamente trastornos de 35 los intestinos que incluyen tanto la colitis ulcerativa (UC) como la enfermedad de Crohn. Ambas se clasifican como trastornos diferentes, pero comparten características comunes y probablemente comparten patología. Lo común del criterio de diagnóstico dificulta determinar con precisión cuál de los dos trastornos sufre el paciente; sin embargo, el tipo y la localización de la lesión son habitualmente diferentes en cada uno. Las lesiones de la UC son de forma 40 característica una úlcera superficial de la mucosa y aparecen en el colon, proximal al recto. Las lesiones de la CD son de forma característica fisuras lineales extensas y pueden aparecer en cualquier parte del intestino, implicando ocasionalmente el estómago, el esófago y el duodeno.

Los tratamientos convencionales para IBD implican habitualmente la administración de agentes antiinflamatorios o inmunosupresores, tales como sulfasalacina, corticosteroides, 6-mercaptopurina/azatropina o ciclosporina, todos ellos sólo aportan un alivio parcial al paciente afectado. Sin embargo, cuando fallan las terapias antiinflamatorias/inmunosupresoras, las colectomías son la última línea de defensa. La cirugía es requerida para aproximadamente el 30% de los pacientes de CD durante el primer año después del diagnóstico, con un aumento de la probabilidad para un proceso quirúrgico de aproximadamente un 5% anualmente desde ese momento. Desafortunadamente, la CD 50 también tiene una tasa elevada de reaparición, ya que aproximadamente un 5% de los pacientes requieren cirugía posterior después del año inicial. Los pacientes de UC tienen además un riesgo sustancialmente creciente de desarrollar cáncer colorrectal. Presumiblemente, esto es debido a los ciclos recurrentes de lesión en el epitelio, seguido de un recrecimiento que aumenta continuamente el riesgo de transformación neoplásica.

Un miembro recientemente descubierto de la superfamilia de inmunoglobulinas conocida como Molécula de Adhesión de Unión (JAM) se ha identificado que está selectivamente concentrada en las uniones intercelulares de células 55 endoteliales y epiteliales de órganos diferentes. Manin-Padura, I. et al., *J. Cell Biol.* 142(1): 117-27 (1998). JAM es una proteína de membrana integral del tipo I con dos bucles disulfuro extracelulares entre cadenas del tipo V. JAM porta una sustancial homología con el antígeno A33 (figura 1 o figura 18). Se halló que un anticuerpo monoclonal dirigido a JAM inhibía la transmigración de monocitos espontánea e inducida por quimioquinas a través de una capa de células endoteliales *in vitro*. Martin-Padura, *supra*.

Recientemente se ha descubierto que aumenta la expresión de JAM en el colon de ratones CRF2-4 -/- con colitis. CRF2-4 -/- (ratones knockout con subunidad IL-10R) desarrollan una colitis espontánea mediada por linfocitos, 60 monocitos y neutrófilos. Varios animales también desarrollaron adenocarcinoma de colon. Como resultado, es probablemente previsible que los compuestos de la presente invención se expresen en niveles elevados en, o en cualquier caso, asociados con enfermedades humanas, tales como la enfermedad inflamatoria de intestino, otras enfermedades inflamatorias de intestino, así como carcinoma colorrectal.

Los compuestos de la presente invención también portan una homología significativa con el antígeno A33, un conocido marcador asociado con el cáncer colorrectal. El antígeno A33 se expresa en más del 90% de los cánceres de colon primarios o metastásicos, así como epitelio de colon normal. En los carcinomas que se originan de la mucosa colónica, el antígeno A33 se expresa de forma homogénea en más de un 95% de los casos. Sin embargo, el antígeno A33 no se ha detectado en un amplio rango de otros tejidos normales, es decir, su expresión parece ser específico de órgano. Por lo tanto, el antígeno A33 parece jugar un papel importante en la inducción del cáncer colorrectal.

Dado que el cáncer de colon es una enfermedad ampliamente extendida, el diagnóstico y tratamiento precoz es un objetivo médico importante. El diagnóstico y tratamiento del cáncer de colon se puede llevar a cabo utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos que tienen por tanto etiquetas (*tags*) fluorescentes, magnéticos nucleares o radioactivos. Se pueden utilizar mAbs etiquetados con genes radioactivos, toxinas y/o fármaco para el tratamiento *in situ* con la descripción mínima del paciente, mAbs también se pueden utilizar para el diagnóstico durante el diagnóstico y el tratamiento de los cánceres de colon. Por ejemplo, cuando los niveles en suero del antígeno A33 son elevados en un paciente, una caída de los niveles después de la cirugía indicaría que la resección del tumor fue un éxito. Por otro lado, un aumento posterior en los niveles de antígeno A33 en el suero después de la cirugía indicaría que podría haberse formado la metástasis del tumor original o que podrían haber aparecido nuevos tumores primarios.

Dichos anticuerpos monoclonales se pueden utilizar en lugar de, o conjuntamente con cirugía y/u otras quimioterapias. Por ejemplo, los análisis preclínicos y los estudios de localización en pacientes infectados con carcinoma colorrectal con un mAb para A33 se describen en Welt *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 8: 1894-1906 (1990) y Welt *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 12: 1561-1571 (1994), mientras que U.S.P. 4.579.827 y U.S.S.N. 424.991 (E.P. 199.141) están dirigidos a la administración terapéutica de anticuerpos monoclonales, el último de los cuales se refiere a la aplicación de mAb anti-A33.

WO98/40483 y WO98/42739, que publicamos en la tercera fecha de prioridad de la presente solicitud o posteriormente, describen secuencias similares a la de PRO245.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere además a composiciones y procedimientos para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades inflamatorias en mamíferos, incluyendo los humanos. La presente invención se basa en la identificación de proteínas (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) que estimulan o bien inhiben la respuesta inmunitaria en mamíferos. Las enfermedades inflamatorias se pueden tratar mediante la supresión de la respuesta inflamatoria. Las moléculas que aumentan una respuesta inflamatoria estimulan o potencian la respuesta inmunitaria a un antígeno. Las moléculas que estimulan una respuesta inflamatoria pueden inhibirse en el caso en el que la supresión de la respuesta inflamatoria sea beneficiosa. Las moléculas que estimulan la respuesta inflamatoria pueden utilizarse terapéuticamente en el caso en el que el aumento de la respuesta inflamatoria sea beneficiosa. Dichas moléculas estimulantes pueden inhibirse también en el caso en el que la supresión de la respuesta inflamatoria sea válida. Los anticuerpos neutralizantes son ejemplos de moléculas que inhiben moléculas que tienen actividad estimuladora inmune y que serían beneficiosos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias. Las moléculas que inhiben la respuesta inflamatoria pueden utilizarse también (proteínas directamente o mediante la utilización de agonistas de anticuerpo) para inhibir la respuesta inflamatoria y de ese modo mejorar las enfermedades inflamatorias.

Por consiguiente, las proteínas de la presente invención son útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento (incluyendo la prevención) de enfermedades de tipo inmune. Los anticuerpos que se unen a las proteínas estimuladoras son útiles para suprimir la respuesta inflamatoria. Los anticuerpos que se unen a proteínas inhibidoras son útiles para estimular la respuesta inflamatoria y el sistema inmune. Las proteínas y los anticuerpos de la presente invención también son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades de tipo inflamatorio e inmune.

Tal y como se explica en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a usos médicos del polipéptido PRO245, y antagonistas del polipéptido PRO245 que inhiben una o más de las funciones o actividades de los polipéptidos PRO301, PRO362 o PRO245, para su uso en un procedimiento del tratamiento.

El antagonista PRO245 puede emplearse en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, mediante la administración de una cantidad terapéutica eficaz a un paciente necesitado del mismo para el tratamiento de una enfermedad seleccionada entre: enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopenia idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis limfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática, enfermedades hepatobiliarias tales como las hepatitis infecciosas (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis crónica activa autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y conlangitis esclerosante, enfermedades inflamatorias y fibróticas del pulmón (por ejemplo, fibrosis quística, neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad), enteropatía sensible al gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune incluyendo las enfermedades de piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto,

ES 2 288 649 T3

psoriasis, enfermedades alérgicas del pulmón, tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes incluido el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped.

5 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una comparación entre los polipéptidos codificados por el antígeno A33 (SEC. ID NO: 6), el DNA40628 (SEC. ID NO: 1), el DNA45416 (SEC. ID NO: 2), el DNA35638 (SEC. ID NO: 9) y JAM (SEC. ID NO: 10). En la presente invención se describe el DNA35638, y el DNA45416 y el DNA40628 se describen en WO99/27098, de la cual la presente solicitud es divisionaria.

La figura 2 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC. ID NO: 8) de ADNc de PRO245 de secuencia nativa, en la que la secuencia de nucleótidos se designa como “UNQ219” y/o “DNA35638”.

15 La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido PRO245 de secuencia nativa (SEC. ID NO: 9) codificada por la secuencia de nucleótidos de la Figura 2 (DNA35638, SEC. ID NO: 8).

La figura 4 indica un identidad del 24,3% entre la secuencia de aminoácidos codificada por el DNA35638 (SEC. ID NO: 9) y el antígeno A33 (SEC. ID NO: 6).

20 La figura 5 indica una identidad del 34,2% entre la secuencia de aminoácidos codificada por el DNA35638 (SEC. ID NO: 29) y JAM (SEC. ID NO: 10).

La figura 6 indica una identidad del 26% entre la secuencia de aminoácidos codificada por el antígeno A33 (SEC. ID NO: 6) y JAM (SEC. ID NO: 10).

La figura 7 muestra los resultados del ensayo de expresión del ARNm de Taqman descrito en el Ejemplo 5.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes

30 1. Definiciones

Los términos “PRO245”, o “polipéptido PRO245” y “antígeno asociado al cáncer” cuando se utiliza en la presente invención engloba a PRO245 de secuencia nativa y a las variantes del mismo (que más adelante también se definen en la presente). El PRO245 puede aislararse a partir de una serie de orígenes, tales como a partir de tipos de tejido humano o de algún otro origen, o prepararse mediante procesos de recombinación o sintéticos.

El término “enfermedad inflamatoria” significa una enfermedad en la que un componente del sistema inmune de un mamífero causa, media o de algún otro modo contribuye a una respuesta inflamatoria que contribuye a la morbilidad del mamífero. También se incluyen enfermedades en las que la estimulación o intervención de la respuesta inflamatoria tienen un efecto de mejora en la progresión de la enfermedad. Las enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune se incluyen dentro de este término.

El término enfermedad “mediada por células T” significa una enfermedad en la cual las células T directa o indirectamente median o de algún otro modo contribuyen a la morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por células T puede estar asociada con efectos mediados por la célula, efectos mediados por linfoquinas, etc. e incluso los efectos asociados con las células B, si las células B se estimulan, por ejemplo, mediante linfoquinas secretadas por las células T.

Entre los ejemplos de enfermedades de tipo inmune e inflamatorias, algunas de las cuales están mediadas por células T, que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención se incluyen: enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis limfocítica juvenil, tiroiditis artrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática, enfermedades hepatobiliarias tales como hepatitis infecciosas (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis crónica activa autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y conlangitis esclerosante, enfermedades inflamatorias y fibróticas del pulmón (por ejemplo, fibrosis quística), enteropatía sensible al gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades de piel autoinmune o mediadas por el sistema inmune, incluyendo las enfermedades de piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas del pulmón, tales como las neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes incluyendo el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped.

“Tumor”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todos los tejidos y células pre-cáncerosos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitación, el carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma y la leucemia, pero no se limita a éstos. Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de colon, el cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrónico, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de vulva, el cáncer tiroidal, el carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

“Tratamiento” es una intervención realizada con la intención de evitar el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Entre los necesitados del tratamiento se incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que se previene la enfermedad. En el tratamiento de una enfermedad de tipo inmune, un agente terapéutico puede aumentar o disminuir directamente la magnitud de la respuesta de un componente de la respuesta inmune, o volver la enfermedad más susceptible al tratamiento con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, antimicóticos, agentes antinflamatorios, quimioterapéuticos, etc.

La “patología” de una enfermedad relacionada con el sistema inmune incluye todo fenómeno que compromete el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, el crecimiento celular anormal o incontrolable (células neutrofílicas, eosinofílicas, monocíticas, linfocíticas), la producción de anticuerpos, la auto-producción de anticuerpos, la producción de complemento, la interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, la liberación a niveles anormales de citoquinas u otros productos de secreción, la supresión o el empeoramiento de cualquier respuesta inflamatoria o inmunológica, la infiltración de células inflamatorias (neutrofílicas, eosinofílicas, monocíticas, linfocíticas) en los espacios celulares, etc.

El término “mamífero” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier mamífero clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, de deporte, o de compañía, tales como caballos, cerdos, ganado, perros, gatos y hurones, etc. En una realización preferente de la presente invención, el mamífero es un hombre.

La administración “combinada con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administraciones simultáneas (concurrente) y consecutivas en cualquier orden.

El término “agente citotóxico” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas activadas enzimáticamente de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen la adriamicina, la doxorubicina, la epirubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina (“Ara-C”), la ciclofosfamida, el tiotepa, el busulfano, la citoxina, los taxoídes, por ejemplo el paclitaxel (Taxol®. Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y el docetaxel (Taxotere®, Rhône-Poulenc Roher, Antony, Francia), el toxotere, el metotrexato, el cisplatino, el malfalán, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C., la mitoxantrona, la vincristina (Louchristina), la vinorrelbina, el carboplatino, el tenipósido, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (ver Patente de Estados Unidos Nº 4.675.187), el melfalán, y otros gases de nitrógeno relacionados. También se incluyen en esta definición los agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como el tamoxifeno y la onapristona.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente células cancerígenas que expresan o sobreexpresan cualquiera de los genes identificados en la presente invención, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de las células que expresan o sobreexpresan dichos genes en fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los alcaloides vinca (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores topo II como por ejemplo doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como por ejemplo tamoxifeno, prednisona, dacarbazine, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Chapter 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.*, (WB Saunders: filadelfia, 1995), especialmente la página 13.

El término “citoquina” es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas de polipéptidos tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino;

ES 2 288 649 T3

hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteína (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor 5 de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, 10 IL-4, IL-5 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β , y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término 15 citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

15 “Cantidad terapéuticamente efectiva” es la cantidad de PRO245 activo o antagonista que se requiere para conseguir una inhibición o estimulación medible, según sea el caso, de la respuesta inflamatoria.

Una “PRO245 de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un PRO245 derivado de la naturaleza. Dicho PRO245 de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o se puede producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “PRO245 de secuencia nativa” comprende específicamente formas truncadas o secretadas naturales de PRO245 (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formar de corte y empalme alternativas y variantes alélicas naturales de PRO245).

En una realización, el polipéptido PRO245 de secuencia nativa es un polipéptido PRO245 de secuencia nativa 25 madura o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 312 de la figura 3 (SEC ID No: 9).

“Variante de PRO245” significa un PRO245 activo tal como se define posteriormente que tiene por lo menos 30 aproximadamente un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con PRO245 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la figura 3 (SEC ID No: 9) para un polipéptido PRO245 de secuencia nativa de longitud completa, con o sin su secuencia señal nativa, con o sin la metionina de iniciación, con o sin el posible dominio transmembrana, y con o sin el dominio intracelular. Dichas variantes de PRO245 incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO245 en los que se añaden o eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de la figura 3 (SEC ID NO: 9). Preferiblemente, la identidad de la secuencia de aminoácidos es por lo menos aproximadamente un 85%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% e incluso más 35 preferiblemente por los menos aproximadamente un 95%.

El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de PRO245 identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de PRO245, respectivamente, después de la alineación 40 de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar 45 parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias que codifican PRO245 identificadas en la presente invención (por ejemplo, DNA35638) se define como el porcentaje de nucleótidos 50 en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia que codifica PRO245, respectivamente, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o 55 Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

El término “aislado” cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, 60 significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de 65 copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural de PRO245 no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

ES 2 288 649 T3

Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica el polipéptido PRO245 es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el PRO245. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido PRO245 está en una forma o disposición diferente de la que se encuentra en la naturaleza.

- 5 Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el polipéptido PRO245 se distinguen de la molécula de ácido nucleico DNA40628 ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido PRO245 incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido PRO245 contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido PRO245 que se codifica, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

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

15 Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o 20 un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

25 El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-PRO245 individuales (incluyendo agonista, antagonista, y anticuerpos neutralizantes) y composiciones de anticuerpo anti-PRO245 con especificidad poliepitópica. El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente 30 homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

“Activo” o “actividad” para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de PRO245 que retienen la actividad biológica y/o inmunológica de PRO245 nativo o natural. Una actividad preferida es la capacidad de unirse y afectar, por ejemplo bloquear o en cualquier caso modular, una actividad de unión a antígeno. La actividad implica preferiblemente la regulación de la actividad de antígenos asociados a actividad del cáncer y/o asociados a virus.

La “astringencia” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la 40 materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre 45 la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

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

Las “condiciones moderadamente astringentes” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluye la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 40°C.

ES 2 288 649 T3

damente 37-50°C. El experto en la materia sabrá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

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

“Activo” o “actividad” en el contexto de variantes del polipéptido de la presente invención se refiere a forma o formas de proteínas de la presente invención que retienen las actividades biológica y/o inmunológica de un polipéptido nativo o natural de la presente invención.

“Actividad biológica” en el contexto de un anticuerpo u otra molécula que se pueden identificar mediante los ensayos de cribado descritos en la presente invención (por ejemplo, una molécula pequeña orgánica o inorgánica, péptido, etc.) se utiliza para referirse a la capacidad de dichas moléculas de inducir o inhibir la infiltración de células inflamatorias en un tejido, de estimular o inhibir la proliferación de células T y de estimular o inhibir la liberación de linfoquinas por las células. Otra actividad preferida es el aumento de la permeabilidad vascular o la inhibición de la misma.

El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido nativo descrito en la presente invención. De forma similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido nativo descrito en la presente invención. Entre las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas se incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos nativos de la presente invención, péptidos, pequeñas moléculas orgánicas, etc., agonistas o antagonistas.

Una “molécula pequeña” se define en la presente invención como una molécula que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 600 daltons.

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

“Anticuerpos nativos” e “inmunoglobulinas nativas” son glicoproteínas habitualmente heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuros entre cadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un conjunto de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante (V_H) 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 interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan el armazón (FR). Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres CDRs, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Rabat *et al.*, NIH Publ. No. 91-3142, Vol. 1, páginas 647-669 (1991)). Los dominios constantes no están implicados 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 de anticuerpo.

ES 2 288 649 T3

El término “fragmentos de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno de los cuales posee un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual. La designación “Fc” refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento 10 F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y que incluso es capaz de entrecruzar el antígeno.

“Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada -y uno de cadena ligera- en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir 15 un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDRs específicas para antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

20 El fragmento Fab contiene también 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 en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio de la cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región de la bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente invención para Fab' en el cual el residuo o 25 residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tiene cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno entre dos tipos claramente diferentes, denominados kappa (κ) y lambda(λ), en base a las secuencias de aminoácidos 30 de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e 35 IgM y varias de ellas pueden dividirse a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales 40 de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término “anticuerpo monoclonal” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo 45 obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (políclonales) que incluyen habitualmente 50 diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, sin estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo por obtenerse a partir de una población sustancialmente 55 homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención, se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o se puede fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también se pueden aislar de las bibliotecas de fagos-anticuerpos fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo. Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.750.373, 5.571.698, 5.403.484 y 5.223.409 que describen la preparación de anticuerpos utilizando fagémidos y vectores tipo fago.

Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen específicamente anticuerpos “químéricos” (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

60 Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que varios o

todos los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, ciertos residuos de la región armazón (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana también se pueden sustituir por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o armazón importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y optimizar la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de, como mínimo, uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente, como mínimo, una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann *et al.*, *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo "primatizado" en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido mediante la inmunización de monos macaco con el antígeno de interés. Los anticuerpos que contienen residuos de monos del Viejo Mundo también son posibles en la presente invención. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.658.570; 5.693.780; 5.681.722; 5.750.105 y 5.756.096.

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

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

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

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

Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el compuesto de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas que se engloban en la presente invención se incluyen las formadas parcial o totalmente de cristal (por ejemplo, cristal de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, polivinilalcohol y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149.

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en la presente invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "inmunoadhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es otra aparte del reconocimiento y sitio de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina.

La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

5

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Preparación de los polipéptidos PRO245

10 *1. Polipéptidos PRO245 de longitud completa*

Junto con WO 99/27098, de la que es divisionaria, la presente solicitud identifica y aísla secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como PRO301, PRO362 o PRO245. En particular, los Solicitantes han identificado y aislado ADNc que codifica un polipéptido PRO245, tal y como se describe con mayor detalle en los Ejemplos siguientes. Utilizando los programas informáticos de alineación de secuencias BLAST y FastA, los solicitantes hallaron que PRO301 de secuencia nativa de longitud completa (SEC ID No: 1), PRO362 (SEC ID No: 3) y PRO245 (figura 3, SEC ID No: 9) tienen una homología significativa tanto para antígeno A33 y JAM. (Ver las figuras 4-6). Por consiguiente, actualmente se cree que PRO301, descrito en la presente solicitud, es un miembro recientemente identificado de la familia de proteínas del antígeno A33 y se puede asociar con trastornos inflamatorios, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino, así como enfermedades neoplásicas humanas, tales como cáncer colorrectal.

2. Variantes de PRO245

25 Además del PRO245 de secuencia nativa de longitud completa descrita en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de PRO245. Las variantes de PRO245 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de PRO245, respectivamente, o mediante la síntesis de los polipéptidos PRO245 deseados. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del PRO245, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración 30 de las características de anclamiento a la membrana.

35 Las variaciones en el PRO245 de secuencia nativa de longitud completa o en varios dominios del PRO245 descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente USA 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones que codifican el PRO245 que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del PRO245 en comparación con el PRO245 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del PRO245. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia 40 del PRO245 con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizadas en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La 45 variación permitida se puede determinar realizando de forma sistemática inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad en el ensayo *in vitro* descrito en los Ejemplos siguientes.

50 Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para producir el ADN de variante de PRO245 se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells *et al.*, *Gene*, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

55 El análisis de aminoácidos por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente una aminoácido de rastreo preferido entre este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es 60 menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

65 *3. Modificaciones de PRO245*

Las modificaciones covalentes de PRO245 están incluidas en el alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados del PRO245 con un agente derivatizante

orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del PRO245. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular PRO245 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO245, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, 5 glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimido.

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

15 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO245 incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. Por “alteración del patrón de glicosilación nativo” para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en PRO245 de secuencia nativa y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes 20 en el PRO245 de secuencia nativa y/o la alteración de la proporción y/o composición de los residuos azúcares unidos al sitio o sitios de glicosilación.

25 La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO245 se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en el PRO245 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos de PRO245 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO245 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

30 Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido PRO245 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, páginas 259-306 (1981).

35 La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido PRO245 se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación químicas son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et. al. Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge, *et al. Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato del polipéptido se puede conseguir mediante la utilización de 40 un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura *et al. Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de PRO245 comprende la unión del polipéptido PRO245 a uno de un conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

45 El PRO245 de la presente invención también se puede modificar de manera que forme una molécula químérica que comprenda PRO245 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. En una realización, dicha molécula químérica comprende una fusión del PRO245 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítopo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítopo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo terminal amino o carboxilo del PRO245. La presencia de dichas formas epítopo etiquetadas del PRO245 se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítopo-etiqueta permite que el PRO245 se purifique fácilmente mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítopo-etiqueta. En una realización alternativa, la molécula químérica puede comprender una fusión del PRO245 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para 55 una forma bivalente de la molécula químérica, dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula IgG.

En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field *et al., Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 60 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan *et al., Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de gliproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al., Protein Engineering*, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido-Flag [Hopp *et al., BioTechnology*, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítopo KT3 [Martin *et al., Science*, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítopo de α -tubulina [Skinner *et al., J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido-etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397 (1990)].

4. Producción y aislamiento de PRO245

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de PRO245 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de PRO245. Naturalmente, se prevé que 5 se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar PRO245. Por ejemplo, la secuencia de PRO245, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewen *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se 10 pueden realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes del PRO245 de forma separada y se pueden combinar utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir PRO245 de longitud completa.

a. Aislamiento del ADN que codifica PRO245

15 El ADN que codifica PRO245 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO245 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de PRO245 humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica PRO245 también se puede obtener a partir de una biblioteca 20 genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para PRO245 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. 25 El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica PRO245 es utilizar la metodología de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

30 Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca para que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ^{32}P , biotinilación o marcaje enzimático. Las condiciones 35 de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear 40 a otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en los bancos de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otros bancos de datos de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las 45 regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar a través de la alineación de secuencias utilizando programas de software informático, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN, DNAstar e INHERIT que utilizan varios algoritmos para medir la homología.

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

50 **b. Selección y transformación de células huésped**

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción de PRO245 y se cultivan en medios nutriente convencionales modificados para que sean adecuados 55 para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un técnico en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

60 Los procedimientos de transfección son conocidos por el técnico en la materia, por ejemplo, CaPO y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento de calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas u otras células que contienen barreras célula-pared sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito

ES 2 288 649 T3

aspectos generales de transformaciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en la levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown *et al.*, *Methods in enzymology*, 185:527-537 (1990) y Manssur *et al.*, *Nature*, 336, 348-352 (1988).

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635).

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican PRO245. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente.

Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO245 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO. Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se estima que está dentro de la técnica.

30 c. Selección y utilización de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica PRO245 se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un técnico en la materia.

El PRO245 se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el PRO245 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líferas de fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo secuencias líderes de α -factor de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como líderes virales secretores.

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

Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicillina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

ES 2 288 649 T3

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica PRO245, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo natural es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, se prepara y se propaga tal y como se describe por Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica PRO245 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales son conocidos. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor tac [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica PRO245.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], 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 levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657.

La transcripción de PRO245 desde vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del poliomielitis, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el PRO245 por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliomielitis en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de PRO245, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica PRO245.

En Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de PRO245 en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

60 d. Detección de la amplificación/expresión de los genes

La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN, cadenas dobles de híbridos de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la doble cadena

ES 2 288 649 T3

está unida a una superficie, de manera que tras la formación de cadenas dobles en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la cadena doble.

La expresión génica se puede medir, alternativamente, mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción

- 5 inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de ejemplo pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido PRO245 de secuencia nativa o contra un 10 péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de PRO245 y codifica un epítopo de anticuerpo específico.

e. Purificación de polipéptido

Las formas de PRO245 se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisatos de células huésped. Si está

- 15 unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Tritón X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión de PRO245 se pueden interrumpir mediante diversos medios físicos o químicos, tales como el ciclo congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar células.

- 20 Se puede desear purificar PRO245 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefara para eliminar contaminantes, tales 25 como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítopo del PRO245. Se pueden utilizar varios procedimientos de purificación de proteínas y dichos procedimientos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el PRO245 concreto producido.

30 2. Distribución del tejido

- La localización de tejidos que expresan los polipéptidos de la presente invención se pueden identificar mediante la determinación de la expresión del ARNm en varios tejidos humanos. La localización de dichos genes proporciona 35 información sobre qué tejidos está probablemente afectados por las actividades estimuladoras e inhibidoras de los polipéptidos de la presente invención. La localización de un gen en un tejido específico también proporciona un tejido de muestra para los ensayos de bloqueo de actividad descritos a continuación.

- 40 La expresión génica en varios tejidos se puede medir mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:5201-5205 [1980]), transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN y cadenas dobles de híbridos de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína.

- 45 Alternativamente, la expresión génica en varios tejidos se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o bien policlonales, y se pueden preparar en 50 cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra una secuencia nativa de un polipéptido de la presente invención o contra un péptido sintético basado en la secuencia de ADN que codifican el polipéptido de la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a un ADN que codifica un polipéptido de la presente invención y que codifica un epítopo de anticuerpo específico. A continuación, se proporcionan técnicas generales para generar anticuerpos y protocolos especiales para la transferencia Northern e hibridación 55 *in situ*.

3. Estudios de unión a anticuerpo

- La actividad de los polipéptidos de la presente invención se puede verificar adicionalmente mediante estudios 60 de unión a anticuerpo, en los que se prueba la capacidad de los anticuerpos de PRO245 para inhibir el efecto de los polipéptidos PRO245 en las células de los tejidos. Entre los ejemplos de anticuerpos se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describirá posteriormente en la presente invención.

- 65 Los estudios de unión a anticuerpo se pueden llevar a cabo en cualquier de los procedimientos de ensayo conocidos, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* páginas 147-158 (CRC Press Inc. 1987).

ES 2 288 649 T3

Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito muestra de prueba por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos se insolabilizan preferiblemente antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar convenientemente del patrón y el analito que permanece sin unir.

Los ensayos sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmungénica diferente, o epítopo, de la proteína a detectar. En un ensayo sándwich, el analito muestra de prueba se une mediante un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido y, a continuación, un segundo anticuerpo se une al analito, formando de esta manera un complejo de tres partes insoluble. Ver, por ejemplo, la Patente USA No. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede marcarse a sí mismo con un grupo detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es una enzima.

Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser nueva o congelada o puede estar incrustada en parafina y fijada con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

20 4. *Ensayos basados en células*

Los ensayos basados en células y modelos animales para enfermedades relacionadas con el sistema inmune se pueden utilizar para entender con mayor detalle la relación entre los genes y los polipéptidos identificados en la presente invención y el desarrollo y patogénesis de la enfermedad relacionada con el sistema inmune.

25 En un enfoque diferente, las células de un tipo conocido de células que estarán implicadas en una enfermedad concreta relacionada con el sistema inmune se transfecan con los ADNcs descritos en la presente invención, y se analiza la capacidad de estos ADNcs para estimular o inhibir la función inmune. Las células adecuadas se pueden transfecar con el gen deseado y se monitoriza la actividad de la función inmune. Dichas líneas celulares transfecadas se pueden utilizar entonces para probar la capacidad de los anticuerpos poli- o monoclonales o composiciones de anticuerpos para inhibir o estimular la función inmune, por ejemplo, para modular la proliferación de células T o la infiltración de células inflamatorias. Las células transfecadas con las secuencias codificantes de los genes identificados en la presente invención se pueden utilizar adicionalmente para identificar candidatos de fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

35 Además, se pueden utilizar cultivos primarios derivados de animales transgénicos (tal y como se ha descrito a continuación) en los ensayos basados en células de la presente invención, aunque se prefieren líneas celulares estables. Las técnicas para衍生 las líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos son conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Small *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5, 642-648 [1985]).

40 Un ensayo basado en células adecuado es la reacción de linfocitos mezclados (MLR). *Current Protocols in Immunology*, unidad 3.12; editada por J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober. National Institutes of Health, publicada por John Wiley and Sons, Inc. En este ensayo, se ensaya la capacidad de un compuesto de prueba para estimular la proliferación de células T activadas. Se cultiva una suspensión de células T de respuesta con células estimuladoras alogénicas y se mide la proliferación de células T mediante la captación de timidina tritiatda. Este ensayo es una medida general de la reactividad de células T. Dado que la mayoría de células responde a y producen IL-2 después de la activación, las diferencias de respuesta en este ensayo refleja en parte las diferencias en la producción de IL-2 por las células de respuesta. Los resultados de MLR pueden verificarse mediante un ensayo de detección de linfoquinas (IL-2) estándar. *Current Protocols in Immunology*, supra 3.15, 6.3.

50 Una respuesta proliferativa de células T en un ensayo MLR puede ser debida a una respuesta mitogénica o puede ser debida a una respuesta estimuladora por las células T. La verificación adicional de la actividad estimuladora de células T de los polipéptidos de la presente invención se puede obtener mediante un ensayo de estimulación. La activación de células T requiere una señal específica de antígeno mediada a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y una señal coestimuladora mediada a través de una segunda interacción de unión a ligando, por ejemplo, la interacción de unión a B7(CDBO.CD86)/CD28. El entrecruzamiento con Cd28 aumenta la secreción de linfoquinas por células T activadas. La activación de células T tiene controles tanto negativos como positivos a través de la unión de ligandos que tienen un efecto negativo o positivo. CD28 y CTLA-4 son glicoproteínas relacionadas en la superfamilia de Ig que se unen a B7. La unión de CD28 a B7 tiene un efecto de coestimulación positiva de la activación de células T; en cambio, la unión de CTLA-4 a B7 tiene un efecto de desactivación de células T negativo. Chambers, C. A. y Allison, J. P., *Curr. Opin. Immunol.* (1997) 9:396. Schwartz, R. H., *Cell* (1992) 71:1065; Linsey, P.S. y Ledbetter, J.A., *Annu. Rev. Immunol.*, (1993) 11:191; June, C.H. *et al.*, *Immunol. Today* (1994) 15:321; Jenkins, M.K., *Immunity* (1994) 1:405. En un ensayo de coestimulación, se ensayan los polipéptidos de la presente invención por la actividad coestimuladora o inhibidora de las células T.

65 Los polipéptidos de la presente invención, así como otros compuestos de la presente invención, que son estimuladores (coestimuladores) de la proliferación de células T, tal como se ha determinado mediante MLR y ensayos de coestimulación, por ejemplo, son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune carcteri-

zadas por una función inmune escasa, subóptima o inadecuada. Estas enfermedades se tratan mediante la estimulación de la proliferación y activación de células T (e inmunidad mediada por células T) y la potenciación de la respuesta inmune en un mamífero a través de la administración de un compuesto estimulador, tal como los polipéptidos estimulantes de la presente invención. El polipéptido estimulante puede ser un polipéptido PRO301, PRO362 o PRO245 o un anticuerpo agonista para el mismo. La terapia inmunoadyuvante para el tratamiento de tumores, descrito con más detalle a continuación, es un ejemplo de esta utilización de los compuestos estimulantes de la presente invención. Los anticuerpos que se unen a polipéptidos inhibidores actúan para potenciar la respuesta inmune mediante la eliminación del efecto inhibidor de los polipéptidos inhibidores. Este efecto se observa en experimentos que utilizan anticuerpos anti-CTLA-4 que aumentan la proliferación de células T, supuestamente mediante la eliminación de la señal inhibidora provocada por la unión a CTLA-4. Walunas, T.L. *et al.*, *Immunity* (1994) 1:405. Esta utilización también se confirma en experimentos con glicoproteínas 4-1BB, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral que se une a un ligando (4-1BBL) expresado en células T cebadas y señala la activación y crecimiento de células T. Alderson, M. E. *et al.*, *J. Immunol.* (1994) 24:2219. La inhibición de la unión a 4-1BB mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-41BB aumenta la gravedad de la enfermedad injerto contra huésped y se puede utilizar para erradicar tumores. Hellstrom, I. y Hellstrom, H.E. *Crit. Rev. Immunol.* (1998) 18:1.

Por otro lado, los polipéptidos de la presente invención, así como otros compuestos de la presente invención, que son inhibidores de la proliferación/activación de células T y/o la secreción de linfoquinas, se pueden utilizar directamente para suprimir la respuesta inmune. Estos compuestos son útiles para reducir el grado de la respuesta inmune y para tratar las enfermedades relacionadas con el sistema inmune caracterizadas por una respuesta hiperactiva, superóptima o autoinmune. Alternativamente, los anticuerpos que se unen a los polipéptidos estimulantes de la presente invención y bloquean el efecto estimulante de estas moléculas se pueden utilizar para suprimir la respuesta inmune mediada por células T mediante la inhibición de la proliferación/activación de células T y/o la secreción de linfoquinas. El bloqueo del efecto estimulante de los polipéptidos suprime la respuesta inmune del mamífero.

5. Modelos de animales

Los resultados de los ensayos *in vitro* basados en células se pueden verificar adicionalmente utilizando modelos de animales *in vivo* y ensayos de la función de las células T. Se puede utilizar una serie de modelos de animales bien conocidos para entender adicionalmente el papel de los genes identificados en la presente invención en el desarrollo y la patogénesis de enfermedades relacionadas con el sistema inmune, y para ensayar la eficacia de agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos, y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo antagonistas de moléculas pequeñas. La naturaleza *in vivo* de dichos modelos los hace particularmente predictivos de las respuestas en pacientes humanos. Entre los modelos de animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmune se incluyen animales no recombinantes y recombinantes (transgénicos). Entre los modelos de animales no recombinantes se incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos de murinos. Dichos modelos se pueden generar mediante la introducción de células en ratones singeneicos utilizando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en vena de cola, implante de bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la cápsula renal, etc.

La hipersensibilidad por contacto es un ensayo *in vivo* simple de la función inmune mediada por células. En este procedimiento, las células epidérmicas se exponen a haptenos exógenos que ocasionan a una reacción de hipersensibilidad de tipo retrasado que se mide y se cuantifica. La sensibilidad por contacto implica una fase de sensibilización inicial seguido de una fase de estimulación. La fase de estimulación aparece cuando las células epidérmicas encuentran un antígeno con el que previamente han tenido contacto. Tiene lugar un hinchamiento e inflamación, haciendo que éste sea un excelente modelo de dermatitis de contacto alérgica humana. En *Current Protocols in Immunology*, Eds., J. E. Cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unidad 4.2 se describe con detalle un procedimiento adecuado. Ver también, Grabbe, S. y Schwarz, T. *Immun. Today* 19(1): 37-44 (1998).

La enfermedad injerto contra huésped aparece cuando células inmunocompetentes se trasplantan en pacientes inmunosupresores o tolerantes. Las células donantes reconocen y responden a antígenos huésped. La respuesta puede variar desde inflamación aguda amenazadora de la vida hasta casos suaves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos de enfermedad injerto contra huésped proporcionan un medio de valoración de la reactividad de células T contra antígenos de MHC y antígenos de transplantes menores. En *Current Protocols in Immunology*, supra, unidad 4.3 se describe con detalle un procedimiento adecuado.

Un modelo de animal para rechazo de aloinjerto de piel es un medio de valorar la capacidad de las células T para mediar en la destrucción de tejido *in vivo* que es indicativo de y una medida de su papel en la inmunidad antiviral y de tumores. Los modelos más comunes y aceptados utilizan injertos de cola-piel murinos. Los experimentos repetidos han demostrado que el rechazo de aloinjerto de piel está mediado por células T, células T ayudantes y células T efectoras agresoras, y no anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. Y Sachs, D. H., *Fundamental Immunology*, 2^a Edición, W. E. Paul, ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. En *Current Protocols in Immunology*, supra, unidad 4.4 se describe con detalle un procedimiento adecuado. Otros modelos de rechazo del transplante que se pueden utilizar para ensayar los compuestos de la presente invención son los modelos de transplante alógeneico de corazón descritos por Tanabe, M *et al.* *Transplantation* (1994) 58:23 y Tinubu, S.A. *et al.* *J. Immunol.* (1994) 4330-4338.

Los modelos de animales para la hipersensibilidad de tipo retrasado proporciona un ensayo de función inmune mediada por células también. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasado son una respuesta inmune *in vivo*

mediada por células T caracterizada por la inflamación que no alcanza un máximo hasta después de que haya pasado un periodo de tiempo después de la estimulación con un antígeno. Estas reacciones también aparecen en enfermedades autoinmunes específicas de tejido, tales como esclerosis múltiple (MS) y encefalomielitis autoinmune experimental (EAE, un modelo para MS). En *Current Protocols in Immunology, supra*, unidad 4.5 se describe con detalle un procedimiento adecuado.

EAE es una enfermedad autoinmune mediada por células T caracterizada por la inflamación de células T y células mononucleares y la posterior desmielinización de axones en el sistema nervioso central. EAE se considera generalmente un modelo animal relevante para MS en humanos. Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995) 1:143. Se han desarrollado 10 modelos agudos y de recaída-remisión. Se puede ensayar la actividad estimuladora o inhibidora de las de células T contra la enfermedad desmielinizante mediante por el sistema inmune para los compuestos de la presente invención utilizando el protocolo descrito en *Current Protocols in Immunology*, anterior, unidades 15.1 y 15.2. Ver también los modelos para la enfermedad de mielina en la que oligodendrocitos o células de Schwann se injertan en el sistema nervioso central tal como se ha descrito en Duncan I. D. *et al.*, *Molec. Med Today* (1997) 554-561.

Un modelo animal para artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte características clínicas, histológicas e inmunológicas de la artritis reumatoide autoinmune humana y es un modelo aceptable para la artritis autoinmune humana. Los modelos de ratón y rata se caracterizan por sinovitis, erosión del cartílago y hueso subcondrial. Se puede ensayar la actividad contra la artritis autoinmune para los compuestos de la presente invención utilizando los protocolos descritos en *Current Protocols in Immunology*, anterior, unidades 15.5. Ver también el 20 modelo que utiliza un anticuerpo monoclonal para las integrinas CD18 y VLA-4 descritas en Issekutz, A. C. *et al.*, *Immunology* (1996) 88:569.

Se ha descrito un modelo de asma en el que se inducen una hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por 25 antígeno, eosinofilia e inflamación pulmonar mediante la sensibilización de un animal con ovoalbúmina y a continuación la estimulación del animal con la misma proteína suministrada mediante un aerosol. Varios modelos de animales (cobaya, rata, primate no humano) muestran síntomas similares al asma atópica en humanos tras el estímulo con antígenos del aerosol. Los modelos murinos tienen muchas de las características del asma humana. En Wolyniec, W. W. *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1998) 18: 777 y las referencias citadas en la misma se describen procedimientos 30 adecuados para ensayar la actividad y la efectividad en el tratamiento del asma para los compuestos de la presente invención.

Adicionalmente, se puede ensayar en modelos de animales la psoriasis como enfermedad para los compuestos de la 35 presente invención. La evidencia sugiere una patogénesis de las células T para la psoriasis. Los compuestos de la presente invención se pueden ensayar en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. *et al.*, *Nat. Med.* (1997) 3:183, en el que los ratones demuestran lesiones histopatológicas en la piel que se parece a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera de piel humana/ratón scid preparada tal como se ha descrito por Nickoloff, B. J. *et al.*, *Am. J. Path.* (1995) 146:580.

Los modelos de animales recombinantes (transgénicos) se pueden diselar mediante la introducción de la parte 40 codificante de los genes identificados en la presente invención en el genoma de los animales de interés, utilizando técnicas estándar para la producción de animales transgénicos. Entre los animales que pueden servir como diana para la manipulación transgénica se incluyen, sin limitación, babuinos, chimpanzés y monos. Entre las técnicas conocidas en el sector para introducir un transgén en dichos animales se incluyen microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, 45 Patente USA No. 4.873.191); transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-615 [1985]); marcaje de genes en células madre embrionarias (Thompson *et al.* *Cell* 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (*Lo. Mol. Cel., Biol.* 3, 1803-1814 [1983]); transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano *et al.* *Cell* 57, 717-73 [1989]). Para una revisión, ver, por ejemplo, la Patente USA No. 4.736.866.

Para el objetivo de la presente invención, entre los animales transgénicos se incluyen aquellos que portan el transgén 50 sólo en parte de sus células ("animales mosaicos"). El transgén se puede integrar como un transgén individual o en concatámeros, por ejemplo, los tándems cabeza con cabeza o cabeza con cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula concreta también es posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 623-636 (1992).

La expresión del transgén en animales transgénicos se puede monitorizar mediante técnicas estándar. Por ejemplo, el análisis con transferencia Southern o la amplificación por PCR se pueden utilizar para verificar la integración del transgén. A continuación, se puede analizar el nivel de expresión de ARNm utilizando técnicas, tales como la 60 hibridación *in situ*, análisis con transferencia Northern, PCR o inmunocitoquímica.

En los animales se pueden examinar además los signos de patología de enfermedad inmune, por ejemplo, mediante un examen histológico para determinar la infiltración de células inmunes en tejidos específicos. También se pueden llevar a cabo experimentos de bloqueo en los que los animales transgénicos son tratados con los compuestos de la 65 presente invención para determinar la extensión de la estimulación o inhibición de la proliferación de las células T por parte de los compuestos de la presente invención. En estos experimentos, se administran al animal los anticuerpos de bloqueo que se unen al polipéptido de la presente invención, preparado tal y como se ha descrito anteriormente, y se determina el efecto en la función inmune.

Alternativamente, se pueden construir animales “knock out” que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en la presente invención, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y el ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica un polipéptido concreto se puede utilizar para 5 clonar el ADN genómico que codifica ese polipéptido según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica un polipéptido concreto se puede eliminar o reemplazar por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3') están incluidos en el vector [ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, 10 *Cell*. 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno [ver, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992)]. A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimera de agregación [ver, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152]. A continuación, los 15 embriones quiméricos se pueden implantar en un animal criado hembra pseudoembarazada y el embrión se lleva a término para crear un animal “knock out”. La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y se utiliza para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knockout se pueden 20 caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de las condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

6. Terapia con inmunoadyuvantes

En una realización, los compuestos de la presente invención que tienen un efecto inmunoestimulador se pueden 25 utilizar en terapia con inmunoadyuvantes para el tratamiento de tumores (cáncer). Actualmente se sabe bien que las células T reconocen antígenos específicos de tumores humanos. Un grupo de antígenos de tumores, codificados por las familias de genes MAGE, BAGE y GAGE son silenciosos en todos los tejidos normales adultos, pero se expresan en cantidades significativas en tumores, tales como melanomas, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, y carcinomas de la vejiga. DeSmet C. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7149. Se ha observado que la coestimulación de células T induce la regresión tumoral y una respuesta antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Melero, I. *et al.* *Nature Medicine* (1997) 3: 682; Kwon E. D. *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94: 8099; Lynch D. H. *et al.* *Nature Medicine* (1997) 3:625; Finn, O. J. y Lotze M. T. J. *Immunol.* (1998) 21:114. Los compuestos estimuladores de la presente invención se pueden administrar como adyuvantes, solos o junto con un agente regulador del crecimiento, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico, para estimular la proliferación/activación de células T y una 35 respuesta antitumoral a antígenos de tumores. El agente regulador del crecimiento, citotóxico o quimioterapéutico se puede administrar en cantidades convencionales utilizando pautas de administración conocidos. La activación inmunoestimuladora por los compuestos de la presente invención permite cantidades reducidas del agente regulador del crecimiento, citotóxico o quimioterapéutico, disminuyendo potencialmente de este modo la toxicidad al paciente.

40 El cáncer se caracteriza por el incremento en el número de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas, y la generación de células malignas que finalmente se extienden a través de la sangre o el sistema linfático hasta nódulos linfáticos regionales y hasta sitios distantes (metástasis). En un estado canceroso, una célula prolifera bajo condiciones en las que células normales no crecerían. El cáncer manifiesta por sí mismo en una gran variedad de 45 formas, caracterizadas por diferentes grados de invasión y agresividad.

La alteración de la expresión génica está íntimamente relacionada con el crecimiento incontrolado de células y la desdiferenciación, las cuales son una característica común a todos los cánceres. Se ha observado que los genomas de ciertos tumores bien estudiados muestran una menor expresión de genes recesivos, a los que habitualmente se hace 50 referencia como genes supresores de tumores, que funcionarían normalmente para evitar el crecimiento de células malignas, y/o la sobreexpresión de ciertos genes de dominio, tales como oncogenes, que actúan para inducir el crecimiento maligno. Cada uno de estos cambios genéticos parece ser responsable de la importación de algunos de los rasgos que, agregados, representan el fenotipo neoplásico completo (Hunter. *Cell* 64, 1129 [1991]; Bishop, *Cell* 64, 235-248 [1991]).

55 Un mecanismo bien conocido de sobreexpresión de genes (por ejemplo, encogen) en células cancerígenas es la amplificación génica. Este es un proceso en el que en el cromosoma de células ancestrales se producen múltiples copias de un gen particular. El proceso implica la replicación no programada de la región del cromosoma que comprende el gen, seguido por la recombinación de los segmentos replicados de nuevo en el cromosoma (Alitalo *et al.*, *Adv. Cancer Res.* 47, 235-281 [1986]). Se cree que la sobreexpresión del gen va en paralelo con la ampliación génica, es decir, es proporcional al número de copias realizadas.

Se ha identificado que los proto-oncogenes que codifican factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento juegan papeles importantes en la patogénesis de varios tumores humanos, incluyendo cáncer de mama. 60 Por ejemplo, se ha observado que el gen de ErbB2 humano (*erbB2*, también conocido como *her2* o *c-erbB-2*), que codifica un receptor de glicoproteína transmembrana de 185 kD (p185^{HER3}, HER2) relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se sobreexpresa en aproximadamente de un 25% a un 30% del cáncer de mama humano (Slamon *et al.*, *Science* 235: 177-182 [1987]; Slamon *et al.*, *Science* 244: 707-712 [1989]).

Se ha descrito que la amplificación génica de un protooncogén en un suceso implicado habitualmente en las formas más malignas de cáncer, y podría actuar como factor de pronóstico del resultado clínico (Schwab *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer* 1, 181-193 [1990]; Alitalo *et al.*, *supra*). De este modo, la sobreexpresión de erbB2 se considera habitualmente como un factor de pronóstico de una prognosis pobre, especialmente en pacientes con enfermedad primaria que implica nódulos linfáticos auxiliares (Slamon *et al.*, [1987] y [1989], *supra*; Ravdin y Chamness, *Gene* 159: 19-27 [1995]; y Hynes y Stem, *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 165-184 [1994]) y se ha relacionado con la sensibilidad y/o resistencia a la terapia con hormonas y pautas quimioterapéuticas, incluyendo CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo) y antraciclinas (Baselga *et al.*, *Oncology* 11 (3 Suppl 1): 43-48 [1997]). Sin embargo, a pesar de la asociación de la sobreexpresión de erbB2 con una prognosis pobre, las probabilidades de pacientes con respuesta positiva a HER2 que respondían clínicamente al tratamiento con taxanos eran superiores que tres veces aquellos pacientes con respuesta negativa a HER2 (*Ibid*). Un anticuerpo monoclonal recombinante anti-ErbB2 humanizado (anti-HER2) (una versión humanizada del anticuerpo anti-ErbB2 4D5, al que se hace referencia como rhuMAb HER2 o Herceptin⁷) ha sido clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan ErbB2 que habían recibido terapia anticancerígeno previa a la extensión. (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744 [1996]).

7. Ensayos de cribado para fármacos candidatos

Los ensayos de cribado para fármacos candidatos se diseñan para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos codificados por los genes identificados en la presente invención, o un fragmento biológicamente activo de los mismos, o en cualquier caso interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de quimiocetas, siendo particularmente adecuados para identificar fármacos candidatos de molécula pequeña. Entre las moléculas pequeñas contempladas se incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, incluyendo péptidos, preferiblemente péptidos solubles, fusiones (poli)péptido-inmunoglobulina y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones químéricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Los ensayos se pueden realizar en una serie de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos tienen en común que exigen el contacto de los fármacos candidatos con un polipéptido codificado por un ácido nucleico identificado en la presente invención en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos compuestos interactúen.

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

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

interacciones de proteínas específicas así como para precisar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Con el fin de hallar compuestos que interfieran con la interacción de un gen identificado en la presente invención 5 y otros componentes intra o extracelulares, se prepara habitualmente una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, 10 para utilizar como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal como se ha descrito anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

15 8. Composiciones y Procedimientos para el Tratamiento de Enfermedades Relacionados con el Sistema Inmune

Las composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune incluyen, sin limitación, anticuerpos, moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas, péptidos, fosfopeptídos, moléculas antisentido y ribozimas, moléculas de triple hélice, etc. que inhiben o estimulan la función inmune, por ejemplo, proliferación/activación 20 de células T, liberación de linfoquinas, o infiltración de células inmunes.

Por ejemplo, las moléculas de ADN y ARN antisentido actúan para bloquear directamente la traducción de ARNm hibridándose a ARNm marcado y evitando la traducción de proteínas. Cuando se utiliza ADN antisentido, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente 25 las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

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

Las moléculas de ácido nucleico en la formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser de cadena única y compuestas de desoxinucleótidos. La composición base de estos oligonucleótidos se diseñan de 35 manera que inducen la formación de la triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren de tramos considerables de purinas o pirimidinas en una de las cadenas de la doble cadena. Para más detalles, ver, por ejemplo, publicación de PCT No. WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas se pueden identificar mediante cualquier combinación de los ensayos de cribado descritos anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica conocida por los expertos en la materia.

9. Anticuerpos

Entre los fármacos candidatos más prometedores según la presente invención están anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que pueden inhibir (antagonistas) o estimular (agonistas) la proliferación de células T, infiltración de leucocitos, etc. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policloniales, monoclonales, humanizados, bienpecíficos y heteroconjugados.

a. Anticuerpos policloniales

Los procedimientos de preparación de anticuerpos policloniales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policloniales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir los polipéptidos PRO301, PRO362 o PRO245 de la presente invención o una proteína de fusión de los mismos. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida para que sea inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, pero no se limitan a hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin una gran experimentación.

b. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos que reconocen y se unen a polipéptidos de la presente invención o que actúan como antagonistas para los mismos pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped

apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá habitualmente los polipéptidos PRO301, PRO362 o PRO245 de la presente invención, un fragmento antigénico o una proteína de fusión de los mismos. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HPRT.

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

A continuación, el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se pueden ensayar para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de la presente invención o que tienen actividad similar que el polipéptido de la presente invención. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

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

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

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

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

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

c. *Anticuerpos humanos y humanizados*

Los anticuerpos de la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, 5 cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituye por residuos de una CDR de 10 una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que 15 no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá por lo menos una parte de una 20 región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

20 Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos se indican frecuentemente como residuos "importados", que se adquieren de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" 25 son anticuerpos químicos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y 30 posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991); patente USA No. 5.750.373]. De forma similar, 35 los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parecen estrechamente 40 a los observados en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reajuste de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes U.S.A. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *BioTechnology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368, 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51, (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

d. *Anticuerpos biespecíficos*

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

55 Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Millstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo 60 una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

65 Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, CH2, y regiones CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las

ES 2 288 649 T3

fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

5 e. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente U.S.A. No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360: WO 92/200373; EP 03089]. Se considera que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptopbutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente U.S.A. No. 4.676.980.

10 15 f. Diseño de la función efectora

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

30 g. Inmunoconjungados

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

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

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

55 60 En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un “receptor” (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcado de tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado no enlazado de la circulación utilizando un agente clarificador y, a continuación, la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúcleo).

h. Inmunoliposomas

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

ES 2 288 649 T3

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

10. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas activas de la presente invención, polipéptidos y anticuerpos, así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente, se pueden administrar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en forma de composiciones farmacéuticas.

Las formulaciones terapéuticas de la molécula activa, preferiblemente un anticuerpo PRO 245 de la presente invención, se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla de la molécula activa que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencíl amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o immunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los compuestos identificados mediante los ensayos de cribado de la presente invención se pueden formular de forma análoga, utilizando técnicas estándar bien conocidas en el sector.

Las lipofecciones o liposomas también se pueden utilizar para liberar el polipéptido, anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptido que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7889-7893 [1993]).

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

Las moléculas activas también pueden estar contenidas en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980).

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

Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilácticos (Patente U.S.A. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un período largo de tiempo, se desnaturalizan o agregan como resultado de la exposición a una humedad de 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear varias estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanis-

mo de agregación se descubre que es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tiодisulfuros, se puede conseguir la estabilización mediante la modificación de residuos sulfhidrilos, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización de aditivos adecuados y el desarrollo de composiciones específicas de matriz de polímeros.

5

11. Procedimientos de tratamiento

Se considera que los polipéptidos, anticuerpos, y otros compuestos activos de la presente invención se pueden utilizar para tratar varias enfermedades y condiciones inflamatorias, tales como enfermedades mediadas por células T, incluyendo aquellas caracterizadas por la infiltración de células leucocitos en un tejido, estimulación de la proliferación de células T, inhibición de la proliferación de células T, aumento o descenso de la permeabilidad vascular o la inhibición de la misma.

Los compuestos descritos en la presente invención y en WO99/27098 (por ejemplo, PRO301, PRO362, PRO245) codifican nuevos miembros de una familia de proteínas caracterizadas por la homología con el antígeno A33. La naturaleza proinflamatoria de los compuestos de la presente invención es indican en los ensayos *in vitro* siguientes.

Las proteínas codificadas por los compuestos DNA40628, DNA45416, y DNA35638 descritos en la presente invención y en WO99/27088 [(SEC ID No: 1, SEC ID No: 2 y SEC ID No: 9), respectivamente], comparten homología con la identidad con la molécula de adhesión de unión (JAM), Martin-Padura *et al.*, *J. Cell. Biol.* 1998 142(1): 117-127.

La JAM está implicada en el reclutamiento de monocitos en respuesta a MCP-1, MCP-3 y LPS *in vivo*. Los anticuerpos para JAM bloquean la transmigración de monocitos *in vivo*. La JAM se localiza en el epitelio murino y endotelio como una molécula de adhesión de unión para la transmigración de monocitos. Otros leucocitos también pueden utilizar JAM, pero no existe ninguna información que apoye esta idea. La JAM está elevada en el colon de ratones con colitis y probablemente juega un papel de reclutamiento de monocitos o leucocitos en la lesión colónica.

Entre las enfermedades o trastornos a tratar con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos de la presente invención de ejemplo se incluyen, pero no se limitan a enfermedad inflamatoria del intestino (es decir, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis limfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersiticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barre y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliarias tales como las hepatitis infecciosas (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis crónica activa autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y conlangitis esclerosante, enfermedades inflamatorias y fibróticas del pulmón, tales como fibrosis quística, enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune incluyendo las enfermedades de piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a la comida y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes incluidas el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped.

En el lupus eritematoso sistémico, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuerpos auto-reactivos para propias proteínas/tejidos y la posterior generación de la inflamación mediada por el sistema inmune. Los anticuerpos median directa e indirectamente la lesión en el tejido. Aunque no se ha observado que los linfocitos T estén directamente implicados en el daño tisular, los linfocitos T son necesarios para el desarrollo de anticuerpos auto-reactivos. La génesis de la enfermedad es de este modo dependiente de los linfocitos. Los órganos y sistemas múltiples están afectados clínicamente incluyendo el riñón, el pulmón, el sistema musculoesquelético, el sistema mucocutáneo, ojo, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula espinal y sangre.

55

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmune sistémica crónica que implica principalmente a la membrana sinovial de múltiples articulaciones con la lesión resultante en el cartílago articular. La patogénesis es dependiente de los linfocitos T y está asociada con la producción de factores reumatoideos, auto-anticuerpos dirigidos contra las propias IgG, con la formación resultante de complejos inmunes que alcanzan niveles elevados en fluidos de la articulación y sangre. Estos complejos en la articulación pueden inducir el infiltrado marcado de linfocitos y monocitos en el sinovio y los posteriores cambios sinoviales marcados: el espacio/fluido de las articulaciones se infiltira mediante células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, frecuentemente en patrón simétrico. Sin embargo, también aparece en dos formas importantes. Una forma es el desarrollo de lesiones extra-articulares con la enfermedad articular progresiva presente y las lesiones típicas de la fibrosis pulmonar, vaculitis y úlceras cutáneas. La segunda forma de la enfermedad extra-articular es el denominado síndrome de Felty que aparece de forma tardía en la evolución de la enfermedad de RA, algunas veces después de que la enfermedad articular haya quedado inactiva, e implica la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede estar acompañado por vaculitis en múltiples órganos con formaciones de infartos,

ES 2 288 649 T3

úlceras en la piel y gangrena. Los pacientes también desarrollan frecuentemente nódulos reumatoideos en el tejido subcutáneo que recubre las articulaciones afectadas; la etapa tardía de los nódulos tienen centros necróticos rodeados por un infiltrado de células inflamatorias mezcladas. Otras manifestaciones que pueden aparecer en RA incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca y nódulos reumatoideos.

La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que empieza frecuentemente con como mínimo 16 años. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la RA; algunos pacientes que presentan un resultado positivo en el factor reumatoide se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se subclasiifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser aguda y es habitualmente destructivo y conduce a la anquilosis de la articulación y el crecimiento retardado. Otras manifestaciones pueden incluir uveitis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto genético HLA-B27. Entre los trastornos se incluyen: esponilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada con la enfermedad del intestino inflamatoria, espondilitis asociada con psoriasis, espondiloartropatía de inicio juvenil y espondiloartropatía no diferenciada. Las características diferenciables incluyen la sacroleitis con o sin espondilitis; artritis inflamatoria asimétrica; asociación con HLA-B27 (un alelo definido serológicamente del locus HLA-B de MHC de clase I); inflamación ocular, y ausencia de autoanticuerpos asociados con otra enfermedad reumatoide. La célula más implicada como clave de la inducción de la enfermedad es el linfocito T CD8+, una célula que dirige un antígeno presentado por células T CD8+ de moléculas MHC de clase I puede reaccionar contra el alelo HLA-B27 de MHC de clase 1 como si fuera un péptido exógeno expresado por moléculas MHC de clase 1. Se ha realizado la hipótesis de que un epítopo de HLA-B27 puede mimetizar un epítopo antigénico bacteriano o microbiano y de este modo inducen una respuesta de células T CD8+.

La esclerosis sistémica (escleroderma) tiene una etiología desconocida. Una característica de la enfermedad es el endurecimiento de la piel; probablemente inducido por un proceso inflamatorio activo. El escleroderma puede ser localizado o sistémico; las lesiones vasculares son habituales y la lesión de las células endoteliales en la microvasculatura en un suceso inicial e importante en el desarrollo de esclerosis sistémica; la lesión vascular puede estar mediada por el sistema inmune. Se supone una base inmunológica por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y la presencia de anticuerpos antinucleares en muchos pacientes. La ICAM-1 frecuentemente favorece la expresión en la superficie celular de los fibroblastos en lesiones de piel que sugieren que la interacción de las células T con estas células puede tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. Entre otros órganos implicados se incluyen: el tracto gastrointestinal: la atrofia del músculo liso y la fibrosis que da lugar a una peristalsis/motilidad anormal; riñón: la proliferación concéntrica de íntima subendotelial que afecta las arterias arqueadas pequeñas e interlobulares con un flujo sanguíneo cortical renal resultante reducido, da lugar a proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis en banda de contracción, cicatrización/fibrosis.

Las miopatías inflamatorias idiopáticas incluyendo la dermatomiositis, polimiositis y otros son trastornos de la inflamación muscular crónica de etiología desconocida que dan lugar a una debilidad del músculo. La lesión/inflamación muscular es frecuentemente simétrica y progresiva. Los autoanticuerpos se asocian con la mayoría de las formas. Estos autoanticuerpos específicos de la miositis están dirigidos contra e inhiben la función de los componentes, proteínas y ARNm implicados en la síntesis de proteínas.

El síndrome de Sjögren es debido a una inflamación mediada por el sistema inmune y la posterior destrucción funcional de las glándulas lacrimales y las glándulas salivares. La enfermedad puede estar asociada con o acompañada por enfermedades del tejido conectivo inflamatorio. La enfermedad está asociada con la producción de autoanticuerpos contra los antígenos Ro y La, los cuales son complejos ARN-proteína pequeños. Las lesiones dan lugar queratoconjuntivitis seca, xerostomía, con otras manifestaciones o asociaciones que incluyen cirrosis biliar, neuropatía periférica o sensorial y púrpura palpable.

La vasculitis sistémica son enfermedades en las que la lesión primaria es la inflamación y en algunos casos existe un daño posterior en los vasos sanguíneos que da lugar a una isquemia/necrosis/degeneración en tejidos a los que llegan los vasos sanguíneos afectados y la posible disfunción final del órgano. La vasculitis también puede aparecer como una lesión secundaria o secuela de otras enfermedades mediadas por el sistema inmune-inmunitario, tales como artritis reumatoide, esclerosis sistémica, etc., particularmente en enfermedades también asociadas con la formación de complejos inmunes. Entre las enfermedades del grupo de vasculitis sistémica primaria se incluyen: vasculitis necrotizante sistémica, poliarteritis nodosa, angiitis alérgica y granulomatosis, poliangitis; granulomatosis de Wegener; granulomatosis linfomatoides; y arteritis de células gigantes. Entre las vasculitis diversas se incluyen: síndrome del nódulo linfático mucocutáneo (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis del SNC aislada, enfermedad de Behet, tromboangiitis obliterante (enfermedad de Buerger) y venulitis necrotizante cutánea. El mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis enumeradas se cree que son principalmente debidas a la deposición de complejos de inmunoglobulinas en la pared del vaso sanguíneo y la posterior inducción de una respuesta inflamatoria vía ADCC, complejo de activación o ambos.

La sarcoidosis es una enfermedad de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epiteloides en casi cualquier tejido del cuerpo; la implicación del pulmón es lo más habitual. La patogénesis implica

ES 2 288 649 T3

la persistencia de macrófagos activados y células linfoides en sitios de la enfermedad con las posteriores secuelas crónicas resultantes de la liberación de productos local y sistémicamente activos liberados por estos tipos de células.

La anemia hemolítica autoinmune que incluye la anemia hemolítica autoinmune, la pancitopenia inmune, y la hemoglobinuria paroxismal nocturna es un resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados en la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos otras células sanguíneas incluyendo plaquetas también) y es un reflejo de la eliminación de estas células recubiertas de anticuerpo a través de la lisis mediada por complemento y/o mecanismos mediados por receptor ADCC/Fc.

En la trombocitopenia autoinmune que incluye púrpura trombocitopénica y trombocitopenia mediada por el sistema inmune en otros escenarios clínicos, la destrucción/eliminación de plaquetas aparece como resultado de la unión de anticuerpos o complementos a plaquetas y la posterior eliminación mediante lisis de complemento, mecanismos mediados por receptor ADCC/Fc.

La tiroiditis que incluye la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto, la tiroiditis linfocítica juvenil, y la tiroiditis atrófica son el resultado de una respuesta autoinmune contra los antígenos de la tiroide con la producción de anticuerpos que reaccionan con proteínas presentes en y frecuentemente específicas para la glándula tiroidal. Los modelos experimentales existentes incluyen modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepa de pollos obesos); modelos inducibles: inmunización de animales con tiroglobulina, antígeno microsómico de tiroide (tiroide peroxidasa).

La diabetes mellitus tipo I o diabetes dependiente de insulina es la destrucción autoinmune de células β de las isletas pancreáticas: esta destrucción está mediada por auto-anticuerpos y células T autorreactivas. Los anticuerpos para insulina o el receptor de insulina también puede producir el fenotipo de la no respuesta a insulina.

Las enfermedades renales mediadas por el sistema inmune, incluyendo glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de la lesión mediada por anticuerpos o linfocitos T en el tejido renal directamente como resultado de la producción de anticuerpos autorreactivos o células T contra antígenos renales, o bien, indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o complejos inmunes en el riñón que son reactivos contra otros antígenos no renales. De este modo, otras enfermedades mediadas por el sistema inmune que dan lugar a la formación de complejos inmunes también pueden inducir enfermedades renales mediadas por el sistema inmune como una secuela indirecta. Ambos mecanismos inmunes directo e indirecto dan lugar a una respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de lesiones en los tejidos renales con una alteración funcional orgánica resultante y en algunos casos la progresión para la insuficiencia renal. Ambos mecanismos inmunes humorales y celulares pueden estar implicados en la patogénesis de las lesiones.

Las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo Esclerosis Múltiple; polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barre; y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, se cree que tienen una base autoinmune y dan lugar a una desmielinización nerviosa como resultado del daño causado a los oligodendrocitos o a la mielina directamente. En la MS existen evidencias para sugerir que la inducción y progresión de la enfermedad son dependientes de los linfocitos T. La Esclerosis Múltiple es una enfermedad desmielinizante que es dependiente de los linfocitos T y tiene una evolución de recaída-remisión o una evolución progresiva crónica. La etiología es desconocida; sin embargo, las infecciones virales, la predisposición genética, el medio, y la autoinmunidad contribuyen. Las lesiones contienen infiltrados de predominantemente células microgliales mediadas por linfocitos T y macrófagos de infiltración; linfocitos T CD4+ son el tipo de células predominantes en las lesiones. El mecanismo de la muerte celular por oligodendrocitos y la posterior desmielinización no son conocidos pero es probable que estén dirigidos por linfocitos T.

La enfermedad de pulmón inflamatoria y fibrótica, incluyendo la neumonía eosinofílico, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, puede implicar una respuesta inmuno-inflamatoria desregulada. La inhibición de esa respuesta tendría efecto terapéutico.

La enfermedad de la piel autoinmune o mediada por el sistema inmune incluyendo enfermedades de la piel bulbosa, eritema multiforme y dermatitis por contacto están mediadas por auto-anticuerpos, la génesis de los cuales es dependiente de los linfocitos T.

La psoriasis es un enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células que procesan antígenos y algunos neutrófilos.

Las enfermedades alérgicas, incluyendo asma; rinitis alérgica, dermatitis atópica; hipersensibilidad a la comida; y la urticaria son dependientes de los linfocitos T. Estas enfermedades están mediadas predominantemente por la inflamación inducida por linfocitos T, la inflamación mediada por IgE o una combinación de ambas.

Las enfermedades asociadas a trasplantes, incluyendo el rechazo de injerto y la enfermedad de injerto contra huésped (GHVD) son dependientes de los linfocitos T; la inhibición de la función de los linfocitos T es mejorable.

Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmuno y/o inflamatoria tiene ventajas son las enfermedades infecciosas incluyendo, pero sin limitarse a, la infección viral (incluyendo, pero sin limitarse a, AIDS,

ES 2 288 649 T3

hepatitis A, B, C, D, E), infección bacteriana, infecciones micóticas, e infecciones por protozoos y parásitos (moléculas (o derivados/agonistas) que estimulan la MLR se pueden utilizar terapéuticamente para aumentar la respuesta inmune en agentes infecciosos), enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas) que estimulan la MLR se pueden utilizar terapéuticamente para aumentar la respuesta inmune para enfermedades de inmunodeficiencia heredada, adquirida, inducida infecciosa (como en la infección por VIH) o latrogénica (es decir, proveniente de la quimioterapia) y la neoplasia.

Se ha demostrado que algunos pacientes de cáncer humanos desarrollan una respuesta de anticuerpo y/o linfocitos T a antígenos en células neoplásicas. También se ha observado en modelos de animales de neoplasia que el aumento de la respuesta inmune en la MLR tiene utilidad *in vivo* en el aumento de la respuesta inmune contra la neoplasia. Las moléculas que aumentan la respuesta proliferativa de los linfocitos T en la MLR (o agonistas de moléculas pequeñas o anticuerpos que afectaban al mismo receptor de un modo agonístico) se pueden utilizar terapéuticamente para tratar el cáncer. Las moléculas que inhiben la respuesta de los linfocitos en la MLR también funcionan *in vivo* durante la neoplasia para suprimir la respuesta inmune a un neoplasma; dichas moléculas se pueden expresar mediante las propias células neoplásicas o su expresión se puede inducir por el neoplasma en otras células. El antagonismo de dichas moléculas inhibidoras (o con anticuerpo, antagonistas de moléculas pequeñas u otros medios) aumenta el rechazo al tumor mediado por el sistema inmune.

Adicionalmente, la inhibición de moléculas con propiedades inflamatorias pueden tener una ventaja terapéutica en la lesión por reperfusión; apoplejía; infarto de miocardio; aterosclerosis; lesión pulmonar aguda; choque hemorrágico; quemaduras; choque sepsis/séptico; necrosis tubular aguda; endometriosis; enfermedad de las articulaciones degenerativa y pancreatitis.

Los compuestos PRO245 de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos, se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación (intranasal, intrapulmonar). Se prefiere la administración intravenosa o por inhalación de los polipéptidos y anticuerpos.

En la terapia con inmunoadyuvants, se pueden combinar otras pautas terapéuticas, tales como la administración de un agente anticancerígeno, con la administración de las proteínas, anticuerpos o compuestos de la presente invención. Por ejemplo, el paciente a tratar con los inmunoadyuvantes de la presente invención también pueden recibir un agente anticancerígeno (agente quimioterapéutico) o terapia con radiación. La preparación y los programas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o según se determina empíricamente por el profesional. La preparación y los programas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Cancer Therapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del inmunoadyuvante o se puede administrar simultáneamente con el mismo. Adicionalmente, un compuesto anti-oestrógeno, tal como tamoxifeno, o una anti-progesterona, tal como onapristona (ver, EP 616812) se pueden administrar en dosis conocidas para dichas moléculas.

Se puede desear también administrar anticuerpos contra otros antígenos asociados a una enfermedad inmune o asociados a un tumor, tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o además, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes descritos en la presente invención. Algunas veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización, los polipéptidos de la presente invención se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar en primer lugar, seguido de un polipéptido de la presente invención. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración en primer lugar. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas que se utilizan actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el polipéptido de la presente invención.

Para el tratamiento o la reducción de la gravedad de la enfermedad relacionada con el sistema inmune, la dosis apropiada de un compuesto de la presente invención dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente se administra con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al compuesto, y la discreción del profesional que atiende al paciente. El compuesto se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Preferiblemente, es deseable determinar la curva dosis-respuesta y la composición farmacéutica de la presente invención primero *in vitro* y a continuación en modelos de animales útiles antes de ensayar en humanos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de polipéptido o anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar entre aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o a más tiempo, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

12. Artículos de fabricación

En otra realización del a presente 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 5 un recipiente y un marcador. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad y puede tener 10 un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es habitualmente un polipéptido o un anticuerpo de la presente invención. El marcador en el recipiente o asociado con el mismo indica que 15 la composición se utiliza para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Pueden incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, 20 agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

13. Diagnóstico y pronóstico de enfermedades relacionadas con el sistema inmune

Las proteínas de la superficie celular, tales como proteínas que se sobreexpresan en ciertas enfermedades relacionadas 20 con el sistema inmune, son excelentes dianas para los fármacos candidatos o el tratamiento de la enfermedad. Las mismas proteínas junto con proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en los estados de la enfermedad relacionada con el sistema inmune son útiles adicionalmente en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra las proteínas producto de los genes amplificados en la esclerosis múltiple, 25 artritis reumatoide u otra enfermedad relacionada con el sistema inmune se pueden utilizar como diagnóstico o pronóstico.

Por ejemplo, los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, se pueden utilizar para detectar cualitativamente 30 o cuantitativamente la expresión de proteínas codificadas por los genes amplificados o sobreexpresados ("productos génicos marcadores"). El anticuerpo está preferiblemente equipado con un marcador detectable, por ejemplo fluorescente, y la unión se puede monitorizar mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en el sector. Estas técnicas son particularmente adecuadas, si el gen sobreexpresado codifica una 35 proteína de la superficie celular. Dichos ensayos de unión se realizan esencialmente tal y como se ha descrito anteriormente.

La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos génicos marcadores se puede realizar, por ejemplo, 40 mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Con este objetivo, se extrae una muestra histológica del paciente, y se aplica un anticuerpo marcado a la misma, preferiblemente mediante el recubrimiento del anticuerpo sobre la muestra biológica. Este procedimiento también permite la determinación de la distribución del producto genético marcador en el tejido examinado. Será evidente para los expertos en la materia que existen una gran variedad de procedimientos histológicos fácilmente disponibles para la detección *in situ*.

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

45 Ejemplos

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos de que se indique lo contrario. El origen de las células identificadas en 50 los siguientes ejemplos, y a lo largo del documento, por los números de acceso de la ATCC pertenecen a la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

Ejemplo 1

Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO245 humano

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

65 Una secuencia de consenso de ADN se ensambló en relación a otras secuencias de eST, en las que la secuencia de consenso se designa en la presente invención como DNA30954 (SEC ID No: 27). En base a la secuencia de consenso DNA30954, se sintetizaron oligonucleótidos para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contuviera

ES 2 288 649 T3

la secuencia de interés y para utilizar como sondas para aislar un clon de la secuencia de codificación de longitud completa para PRO245.

5 Se sintetizó una pareja de cebadores del PCR (directos e inversos):

cebador de PCR directo:

5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3'

(SEC. ID. No: 28)

10 cebador de PCR inverso:

5'-ACCTGCGATATCCAACAGAACATTG-3'

(SEC. ID. No: 29)

15 Los cebadores directos e inversos de PCR varían generalmente de 20 a 30 nucleótidos y se diseñan frecuentemente para producir un producto de PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias sonda tienen habitualmente 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia de consenso es superior a aproximadamente 1-1,5 kbp. Con el fin de cribar varias bibliotecas para un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante amplificación por PCR, tal como se describe en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, con la pareja de cebadores de PCR.

20 Adicionalmente, se construyeron sondas sintéticas de hibridación de oligonucleótidos a partir de las secuencias de consenso DNA30954 que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

25 sonda de hibridación:

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC-3' (SEC. ID. No: 30)

30 Con el fin de cribar diversas bibliotecas para una fuente de un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante una amplificación por PCR con la pareja de cebadores de PCR identificados anteriormente. A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar los clones que codificaban el gen de PRO245 utilizando el oligonucleótido de sonda y uno de los cebadores de PCR.

35 El ARN para la construcción de las bibliotecas de ADNc se aisló de tejido de hígado fetal humano. Las bibliotecas 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 cebó con oligo cT que contenía un sitio NotI, unido por extremo romo a adaptadores con hemoquinasa Sall, se dividieron con NotI, se separaron por tamaño adecuadamente mediante electroforesis de gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKb o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio Sfil; ver Holmes *et al.*, *Science* 253: 1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y NotI.

40 La secuenciación del ADN de los clones aislados tal y como se ha descrito anteriormente produjo la secuencia de ADN de longitud completa para un PRO245 de secuencia nativa (designada en la presente invención como UNQ219 (DNA35638) (SEC ID No: 8)] y la secuencia de proteína derivada (SEC ID No: 9).

45 La secuencia de nucleótidos completa de UNQ219(DNA35638) se muestra en la Figura 2 (SEC. ID. No: 8). El clon UNQ219(DNA35638) (SEC ID No: 8) contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación de traducción claro en las posiciones de nucleótidos 89-91 [Kozak *et al.*, *supra*] y un extremo final en el codón de finalización en las posiciones de nucleótidos 1025-1027 (figura 2, SEC ID No: 8) El precursor estimado del polipéptido tiene 312 aminoácidos de longitud (figura 3) (SEC ID No: 9). El clon UNQ219(DNA35638) se ha depositado con la ATCC el 17 de septiembre de 1997 y se asignó el depósito de ATCC no. 209265.

Ejemplo 2

55 (Antecedente)

Inhibición de la proliferación estimulada por VEGF del crecimiento de células endoteliales

60 Se pusieron en placas células endoteliales capilares corticales adrenales bovinas (ACE) (de un cultivo primario, máximo 12-14 surcos) en placas de microtitulado de 96 pocillos (Amersham Life Science) a una densidad de 500 células/pocillo por 100 µL en DMEM bajo en glucosa, suero de ternero al 10%, 2 mM de glutamina, 1x de pen/estrept y fungizona, complementado con 3 ng/mL de VEGF. Los controles se pusieron en placas del mismo modo pero algunos no incluían VEGF. Se añadió una muestra de prueba de los polipéptidos PRO301 y PRO245 en un volumen de 100 l para obtener un volumen final de 200 mcL. Se incubaron las células durante 6-7 días a 37°C. Se aspiró el medio y se lavaron las células 1 x con PBS. Se añadió una mezcla de reacción de fosfatasa ácida (100 µL, 0,1 M de acetato de sodio, pH 5,5, 0,1% de Triton-100, 10 mM de fosfato de p-nitrofenilo). Tras una incubación de 2 horas a 37°C, se detuvo la reacción mediante la adición de 10 mcL de NaOH 1 N. Se midió la DO en el lector de placas de

ES 2 288 649 T3

microtitulado a 405 nm. Los controles eran sin células, con sólo células, células + FGF (5 ng/mL), células + VEGF (3 ng/mL), células + VEGF (3 ng/ml) + TGF- β (1 ng/ml), y células + VEGF (3 ng/mL) + LIF (5 ng/mL). (Se sabe que TGF- β a una concentración de 1 ng/ml bloquea un 70-90% de la proliferación de células estimulada por VEGF.)

5 Se evaluaron los resultados mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de la proliferación de células estimuladas por VEGF (3 ng/mL), determinada mediante la medición de la actividad de la fosfatasa ácida a DO₄₀₅ nm. (1) en relación con las células sin estimulación, y (2) en relación a la inhibición por TGF- β de referencia de la actividad estimulada por VEGF. Los resultados, mostrados en la tabla 1, son indicativos de la utilidad del polipéptido PRO245 en la inhibición del crecimiento celular, especialmente en la terapia del cáncer y específicamente en la inhibición de la angiogénesis tumoral.

TABLA 1

	Compuesto de prueba	Concentración	% Proliferación en relación al control
15	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,01%	0,76
20	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,1%	0,35
25	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	1,0%	0,11
30	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,48 nM	1,03
35	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	4,8 nM	0,95
40	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	48,0 nM	0,49

Ejemplo 3

45 Actividad estimuladora en el ensayo de la Reacción Linfocitaria Mixta (MLR)

Este ejemplo muestra que los polipéptidos de la presente invención son activos como estimulador de la proliferación de linfocitos T estimulados. Los compuestos que estimulan la proliferación de linfocitos son terapéuticamente útiles cuando el aumento de la respuesta inflamatoria es ventajoso. Los compuestos que inhiben la proliferación de linfocitos son terapéuticamente útiles cuando la supresión de la respuesta inflamatoria es ventajosa. Un agente terapéutico puede tomar la forma de antagonistas del polipéptido de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murino-humano, humanizados o humanos contra el polipéptido.

55 El protocolo básico para este ensayo se describe en *Current Protocol in Immunology*, Unidad 3.12, J.E. Coligan A.M. Kruisbeek, DH Marglies, EM Shevach y W Strober, Eds. National Institute of Health. Publicada por John Wiley & Sons.

Más específicamente, en una variante del ensayo, se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos mamíferos, por ejemplo, un voluntario humano, mediante leuocoféresis (un donante suministrará las PBMCs estimulantes, el otro donante suministrará las PBMCs de respuesta). Si se desea, las células se congelan en suero bovino fetal y DMSO tras el aislamiento. Las células congeladas pueden descongelarse durante toda una noche en medios de ensayo (37°C, 5% de CO₂) y a continuación se pueden lavar y resuspender hasta 3 x 10⁶ células/ml de medios de ensayo (RPMI; un 10% de suero bovino fetal, un 1% de penicilina-estreptomicina, un 1% de glutamina, un 1% de HEPES, un 1% de aminoácidos no esenciales, un 1% de piruvato).

65 El estimulador de las PBMCs se prepara mediante la irradiación de las células (aproximadamente 3000 Rads). El ensayo se prepara mediante la colocación en placas en pocillos por triplicado de una mezcla de: 100 μ l de muestra de prueba diluida al 1% de 0,1%; 50 μ l de células de estimulador irradiadas y 50 μ l de células PBMC de respuesta. Como

ES 2 288 649 T3

control se utilizan 100 μ l de medios de cultivo celular o 100 ml de CD4-IgG. Los pocillos se incuban a continuación a 37°C, un 5% de CO₂ durante 4 días. En el día 5, cada pocillo se pulsa con timidina tritiada (1,0 mC/pocillo; Amersham). Después de varias horas las células se lavan 3 veces y a continuación se evalúa la captación de marcador.

5 En otra variante de este ensayo, se aíslan las PBMC de los bazos de ratones Balb/c y ratones C57B6. Las células se laminan de bazos obtenidos recientemente en medios de ensayo (RPMI; un 10% de suero bovino fetal, un 1% de penicilina-estreptomicina, un 1% de glutamina, un 1% de HEPES, un 1% de aminoácidos no esenciales, un 1% de piruvato) y se aíslan las PBMCs mediante el revestimiento de estas células sobre Linfocito M (Organon Teknika), centrifugando a 2000 rpm durante 20 minutos, recogiendo y lavando la capa de células mononucleares en medios de
10 ensayo y resuspendiendo las células a 1 x 10⁷ células/ml de medios de ensayo. A continuación, el ensayo se lleva a cabo tal y como se ha descrito anteriormente. Los resultados de este ensayo para el compuesto de la presente invención se muestran a continuación en la Tabla 2. Los incrementos positivos sobre el control se consideran positivos, siendo preferidos incrementos mayores o iguales al 180%. Sin embargo, cualquier valor superior al control indica un efecto estimulante para la proteína de prueba.
15

TABLA 2

	Compuesto	Concentración	Porcentaje de aumento sobre el Control
20	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,1%	189,7
25	Proteína de DNA35639 (SEC ID No: 9)	0,1%	193,7
30	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	1,0%	212,5
35	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	1,0%	300,5

Ejemplo 4

Infiltrados de células inflamatorias en la piel de cobayas

40 El siguiente ejemplo muestra que los polipéptidos de la presente invención son proinflamatorios en que estimulan infiltrados de células inflamatorias (es decir neutrofílicos, eosinofílicos, monolíticos o linfocíticos) en piel de cobaya. El ensayo descrito en la presente invención monitoriza la capacidad de cada proteína de inducir un infiltrado de células inflamatorias en la piel de una cobaya. Los compuestos que estimulan la infiltración estimuladora son terapéuticamente útiles cuando el aumento de la respuesta inflamatoria es ventajoso. Los compuestos que inhiben la proliferación de linfocitos son terapéuticamente útiles cuando la supresión de la respuesta inflamatoria es ventajosa. Un agente terapéutico puede tomar la forma de antagonistas de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murino-humano, humanizados o humanos contra el polipéptido.
45

50 Se anestesian intramuscularmente con quetamina (75-80 mg/kg de peso corporal) y Xilacina (5 mg/kg de peso corporal) cobayas sin pelo (Charles River Labs) que pesan 350 gramos o más. Las muestras de proteína se inyectan intradérmicamente en las espaldas de cada animal a un volumen de 100 μ l por punto de inyección. Existen aproximadamente 16-24 puntos de inyección por animal. Se inyecta intracardialmente un ml de colorante azul de Evans (1% en solución salina fisiológica tamponada). Los animales se sacrifican después de 6 horas. Se realiza la biopsia en cada sitio de inyección en la piel y se fijan en formalina. Las pieles se preparan para una evaluación histopatológica. De cada sitia se evalúa la infiltración de células inflamatorias en la piel. Los sitios con células inflamatorias visibles se marcaron como positivas. Las muestras que inducen un infiltrado de células inflamatorias se marcan como sustancias proinflamatorias.
55

TABLA 3

	Compuesto	Actividad proinflamatoria
65	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	+
	Control negativo	-

ES 2 288 649 T3

Ejemplo 5

Sobreexpresión de productos génicos

- 5 Este ejemplo muestra que los genes que codifican varias proteínas indicadas en la figura 7 se sobreexpresan en el colon colítico de ratones CRF2-4/- “knock out”. Los agentes terapéuticos pueden tomar la forma de antagonistas de los productos génicos indicados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murino-humano, humanizados o humanos contra los mismos.
- 10 Los ratones CRF2-4/- (Spencer *et al.*, *J. Exp. Med.* 187, 571-578 (1998)) son animales que tienen una subunidad del gen que codifica el receptor IL-10 eliminado. Los ratones son insensibles a las funciones de reducción de la expresión de IL-10 para la activación de macrófagos, y no pueden reducir la expresión de la respuesta de liposacáridos desencadenantes de la secreción de TNF- α por macrófagos. Desarrollan una colitis crónica que puede conducir a un adenocarcinoma colónico.
- 15 Las sondas para las proteínas indicadas en la figura 7 se crearon a partir de plantillas de ARNm para los productos génicos indicados y se utilizaron en el ensayo de 5'-nucleasa (por ejemplo, TaqMan™) y en PCR cuantitativa a tiempo real (por ejemplo, ABI Prism 7700 Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division. Foster City. CA). Los resultados se expresan en unidades delta CT. Una unidad corresponde a un ciclo de PCR o
- 20 aproximadamente una amplificación de dos veces en relación a lo normal, dos unidades corresponden a cuatro veces, 3 unidades a 8 veces, etc. La cuantificación se obtuvo utilizando cebadores y un ARNm etiquetado con fluorescente TaqMan™ derivado de los productos génicos de ensayo relacionados con el sistema inflamatorio indicados en la figura 7. Se prefieren las regiones de los productos génicos indicados que más probablemente contienen secuencias de ácidos nucleicos únicas y que menos probablemente han ayustado (“spliced out”) intrones, para la derivación del cebador,
- 25 por ejemplo, la región 3'-no traducida.

La reacción del ensayo de 5'-nucleasa es una técnica fluorescente basada en PCR que utiliza la actividad 5'-exo-nucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para monitorizar la amplificación a tiempo real. Se utilizan dos cebadores oligonucleótidos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extendible mediante la enzima Taq ADN polimerasa y está marcada con un colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente de sofocación. Cualquier emisión inducida por láser del colorante fluorescente se destruye por el colorante de destrucción cuando los dos colorantes están situados de manera próxima ya que están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la sonda se divide mediante la enzima Taq ADN polimerasa de una manera dependiente de la plantilla. Los fragmentos resultantes de la sonda se disocian en solución y la señal de la liberación del colorante informador está libre del efecto de destrucción del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de colorante informador para cada nueva molécula sintetizada y la detección del colorante informador no destruido proporcionó la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

40 El procedimiento de la 5'-nucleasa se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativa a tiempo real, tal como el ABI Prism 7700™ Sequence Detection. El sistema consiste en un termociclador, láser, cámara del dispositivo acoplado por carga (CCD) y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos y se detecta en el CCD. El sistema incluye un software para hacer funcionar los dispositivos y para analizar los datos.

50 Los datos del ensayo de 5'-nucleasa se expresan inicialmente como ct, o el ciclo umbral. Esto se define como el ciclo en el que la señal informadora se acumula por encima del nivel base de fluorescencia. Los valores Ct se utilizan como la medida cuantitativa del número relativo de copias de inicio de una secuencia diana concreta en una muestra de ácidos nucleicos.

55 Los resultados de la amplificación de ARNm de muestra en la figura 7. La expresión en animales naturales se comparó con animales CRF2.4 KO con beta-actina como patrón de referencia. Se midieron cuatro animales en cada grupo. A los cuatro animales KO se les diagnosticó colitis y, además, tres de ellos tenían adenocarcinoma de colon.

60 La figura 7 muestra que el ARNm de JAM aumenta 3,3 veces en el colon de ratones CRF2-4/- con colitis. Estos ratones son “knock outs” de receptor IL-10 que desarrollan una colitis espontánea mediada por linfocitos, monocitos y neutrófilos. IL-10 suprime la respuesta inflamatoria mediante la modulación de la expresión de ciertas citoquinas inflamatorias.

Como resultado, es probable que la PRO245 hubiera elevado también la expresión en la enfermedad inflamatoria humana, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino y otras enfermedades inflamatorias de las tripas.

ES 2 288 649 T3

Ejemplo 6

(Antecedente)

5 *Inducción de apoptosis de células endoteliales*

La capacidad de los polipéptidos de la presente invención para inducir la apoptosis en células endoteliales se ensayó en células endoteliales de vena umbilical venosa humana (HUVEC, Cell Systems). El primer día, se pusieron en placas para microtítulos de 96 pocillos (Amersham Life Science, microplaca centelleante cytdstar-T. RPNQ 160, estéril, cultivo de tejidos tratado, envueltos individualmente), en suero al 10% (medio CSG, Cell Systems), en una densidad de 2×10^4 células por pocillo en un volumen total de 100 μl . El segundo día, se añadió el polipéptido PRO245 codificado por DNA35638 por triplicado en diluciones del 1%, 0,33% y 0,11%. En el tercer día se determinó la capacidad del polipéptido PRO245 para inducir la apoptosis utilizando un kit disponible comercialmente, Apoptosis Detection Kit (R&D Systems. Minnesota) en el que la anexina V, un miembro de las proteínas de unión a calcio y fosfolípidos, se utiliza para la detección de la apoptosis, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se añadieron a las células la anexina V marcada con fluoresceína y el yoduro de propidio. Se realizó el análisis con citómetros equipados con un solo láser que emite una luz de excitación a 488 nm. En esta prueba las células vivas no se teñirán con ningún fluorocromo, las células necróticas se teñirán con ambos fluorocromos, y las células que experimentan la apoptosis se teñirán sólo con el reactivo de la anexina V-FITC. La señal generada por la anexina V-FITC se detectó en el detector de señal de FITC. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 4.

TABLA 4

25 Compuesto de prueba	Concentración	% sobre la fluorescencia base
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,11%	77,6
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,33%	143,7
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	1,0%	146,0
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	6,82 nM	67,2
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	20,46 nM	102,6
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	62,0 nM	118,8

50 La capacidad de los compuestos de las proteínas de la presente invención para inducir la apoptosis de las células epiteliales, especialmente en combinación con la interrupción en la formación de la unión celular tal y como se indica en el Ejemplo 2, es indicativo de que los compuestos juegan un papel en la adhesión y la transmigración celulares. De forma similar a la JAM murino, los compuestos son probables moléculas de unión celular en el epitelio y el endotelio, lo cual explica su extensa distribución en el tejido. La interrupción de la inducción de la apoptosis de las células endoteliales refuerza un papel en el crecimiento y la apoptosis de las células.

Ejemplo 7

(Antecedentes)

Ensayo antitumoral in vitro

65 La actividad antiproliferativa de los polipéptidos PRO245 de la presente invención se determinó en el ensayo de investigación para el descubrimiento de fármacos anticancerígenos *in vitro* orientado hacia enfermedades del National Cancer Institute (NCI), utilizando un ensayo de unión con colorante sulforrodamina B (SRB) esencialmente como se describe por Skehan *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82 1107-1112 (1990). Las 60 líneas de células tumorales utilizadas en este estudio ("el panel NCI"), así como las condiciones para su mantenimiento y cultivo *in vitro* se han descrito por

ES 2 288 649 T3

Monks *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**: 757-766 (1991). El objetivo de este cribado es evaluar inicialmente la actividad citotóxica y/o citoestática de los compuestos de prueba contra diferentes tipos de tumores (Monks *et al.*, *supra*; Boyd, *Cancer: Prine, Pract. Oncol. Update*, **3**(10): 1-12 [1989]).

5 Se recogieron células de aproximadamente 60 líneas de células tumorales humanas con tripsina/EDTA (Gibco), 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) en placas de microtítulos separadas de 96 pocillos. La densidad de células para la incubación de 60 días era inferior que para la incubación de 20 días para evitar el sobrecrecimiento. Los inoculados se dejaron durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C para su estabilización. Se añadieron diluciones de dos veces la concentración de prueba deseada a tiempo cero en alícuotas de 100 μ l a los pocillos de placas de microtítulos (dilución 1:2). Los compuestos de prueba se evaluaron a cinco diluciones semilogarítmicas (1000 a 100.000 veces). Las incubaciones tuvieron lugar durante dos días y seis días en una atmósfera de CO₂ al 5% y 100% de humedad.

10 15 Despues de la incubación, se extrajo el medio y las células se fijaron en 0,1 ml de ácido tricloroacético al 10% a 40°C. Las placas se enjuagaron cinco veces con agua desionizada, se secaron, se tiñeron durante 30 minutos con 0,1 ml de colorante sulforrodamina B al 0,4% (Sigma) disuelto en ácido acético al 1%, se enjuagaron cuatro veces con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no unido, se secaron y el tinte se extrajo durante 5 minutos con 0,1 ml de base Tris [tris(hidroximetil)aminometano] 10 mM, pH 10,5. La absorbancia (DO) de sulforrodamina B a 492 nm se midió utilizando un lector de la placa de microtítulos de 96 pocillos conectado a un ordenador.

20 Una muestra de prueba se considera positiva si muestra por lo menos un 50% de efecto inhibidor del crecimiento en una o más concentraciones. Los resultados se muestran en las siguientes Tablas, en la que las abreviaturas son las siguientes:

25 NSCL = carcinoma de pulmón de células no pequeñas

SNC = sistema nervioso central

TABLA 5

30	Compuesto de prueba	Concentración	Longitud o ensayo	Línea celular tumoral	
				Type	Designación
35	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,35 nM	2	NSCL Ovario	HOP92 OVCAR-4
40	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,35 nM	2	Leucemia	SR
45	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,35 nM	6	Colon	HCC-2998
50	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	3,5 nM	6	Leucemia Colon	SR SW-620
55	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	6,2 nM	6	Colon	HCT-116
60	Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	6,2 nM	6	Leucemia	RPMI-8226
65					

ES 2 288 649 T3

Ejemplo 8

Utilización de PRO como sonda de hibridación

5 El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica una PRO245 como sonda de hibridación.

10 El ADN que comprende la secuencia codificante de PRO245 de secuencia nativa (tal y como se muestra en la figura 2, SEC ID No: 8) se utiliza como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de PRO245) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

15 La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de astringencia elevada. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada de PRO245 a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

20 A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad secuencial deseada con el ADN que codifica una PRO245 de secuencia nativa de longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en la literatura.

Ejemplo 9

Expresión de PRO245 en E.coli

25 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de PRO245 mediante expresión recombinante en *E. coli*.

30 La secuencia de ADN que codifica PRO245 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar *et.al.*, *Gene*, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se desfosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor trp, un una secuencia poli-His líder (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y sitio de división para la enterokinasa), la región codificante de PRO245, el finalizador transcripcional lambda, y un gen argU.

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

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

50 Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína PRO245 solubilizada se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

El PRO301 se expresó en *E. coli* en forma de etiqueta de poli-His, tal como se ha descrito en WO99/27098.

Ejemplo 10

Expresión de PRO245 en células de mamíferos

60 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma glicosilada de una PRO245 mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

65 El vector pRK5 (véase EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de PRO245 está ligado en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO245 utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook *et. al.*, *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-PRO245.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan para unirse en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con

ES 2 288 649 T3

suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-PRO245 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmappaya et. al., *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 nM de EDTA, 0,227 M de CaCl₂. A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 µl de 50 mM de HEPES (ph 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO₄, 5 y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio nuevo y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

10 Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml ³⁵S-metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de giro y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido PRO245. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar 15 una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

En una técnica alternativa, se puede introducir ADN de PRO245 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Somparyrac et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 75: 1575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un frasco giratorio y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-PRO245. En primer lugar, las células se concentran en el frasco giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado en el residuo de centrifugación durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el frasco giratorio que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Despues de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células 25 y los debris. La muestra que contiene el PRO245 expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálsis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, PRO245 puede expresarse en células CHO. El pRK5-PRO245 puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los 30 cultivos celulares pueden incubarse, y el medio puede reemplazarse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como la ³⁵S-metionina. Despues de determinar la presencia de un polipéptido PRO245, el medio de cultivo puede remplazarse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio acondicionado. A continuación, el medio que contiene el polipéptido PRO245 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

35 El PRO245 etiquetado con epítopo puede expresarse también en células CHO huésped. El PRO245 puede subclonarse fuera del vector pRK5. La inserción del subclon puede experimentar PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta de epítopo concreta, tal como una etiqueta de poli-His en un vector de expresión de Baculovirus. La inserción de PRO245 etiquetado con poli-His puede subclonarse a continuación en un vector conductor SV40 que 40 contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal y como se ha descrito anteriormente) con el vector conductor SV40. El marcaje puede realizarse, tal y como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO245 etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelante-Ni²⁺.

45 La PRO245 puede expresarse en células CHO mediante procedimientos de expresión transitorios y estables.

La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresaron como una construcción IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionaron a una secuencia de región constante de IgG1 que contenía la bisagra, CH2 y los dominios de CH2 y/o como una forma etiquetada de poli-His.

Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonaron en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar descritas en Ausubel et. al., *Current Protocols of Molecular Biology*, Unidad 3.16, John Wiley & Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para que tengan sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el traslado adecuado de los de ADNc. El vector utilizado en la expresión en las células CHO es tal y como se describe en Lucas et. al., *Nucl. Acid Res.* 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

60 Se introdujeron doce microgramos del ADN plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección Superfect® (Qiagen), Dospel® o Fugene® (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se desarrollaron tal y como se describe en Lucas et. al., *supra*. Aproximadamente se congelen 3 x 10⁻⁷ células en una ampolla para un crecimiento y producción posteriores tal y como se describe a 65 continuación.

Las ampollas que contenían el ADN plásmido se descongelaron mediante un baño de agua y se mezclaron mediante centrifugación. El contenido se pipeteó en un tubo de centrífuga que contenía 10 ml de medio y se centrifugó a 1000

ES 2 288 649 T3

rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 μm con un 5% de suero bovino fetal dialfiltrado a 0,2 μm). A continuación, las células se fraccionaron en un centrifugador de 100 ml que contenía 90 ml del medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfirieron a un centrifugador de 250 ml lleno con 150 ml de medio de cultivo selectivo y se incubaron a 37°C. Después de otros 2-3 días, se sembraron centrifugadores de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con 3×10^5 células/ml. El medio celular se cambió por medio nuevo mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio de CHO adecuado, en realidad se utilizó un medio de producción descrito en la patente U.S.A. No. 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. Un centrifugador de 3 L de producción se siembra a $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determinaron el pH y el número de células. En el día 1, se tomaron muestras en el centrifugador y se inició el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se tomaron muestras en el centrifugador, la temperatura se varió hasta 33°C, y se tomaron 30 ml de glucosa a 500 g/l y 0,6 ml de antiespuma al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajustó según la necesidad manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cayera por debajo del 70%, el cultivo celular se recogió mediante centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,22 μm . El filtrado se guardó a 4°C o se cargó inmediatamente en columnas para la purificación.

Para las construcciones etiquetadas de poli-His, las proteínas se purificaron utilizando una columna de Ni²⁺-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombeó en una columna de 6 ml de Ni²⁺-NTA equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contenía 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4°C. Tras cargarse, la columna se lavó con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluyó con el tampón de equilibrio que contenía 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento que contenía 10 mM Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guardó a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesinas (que contienen Fc) se purificaron a partir del medio acondicionado tal y como se indica a continuación. El medio acondicionado se bombeó a una columna de Proteína A (Pharmacia) de 5 ml que había sido equilibrada en un tampón de 20 mM de fosfato sódico, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lavó ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluída se neutralizó inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contenían 275 μL de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento, tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad se calculó mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales por degradación Edman. La PRO245 también se produjo mediante la expresión transitoria en células COS.

Ejemplo 11

Expresión de PRO245 en levadura

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO245 en levadura.

En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de PRO245 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO245, un péptido señal seleccionado y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO245. Para la secreción, el ADN que codifica PRO245 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, la secuencia señal/líder secretora del factor alfa de la levadura, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de PRO245.

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

El PRO245 recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene PRO245 puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna concretas.

Ejemplo 12

Expresión de PRO245 en células de insectos infectadas de Baculovirus

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO245 en células de insectos infectadas de Baculovirus.

La PRO245 se fusiona en dirección 5' a una etiqueta epítopo contenida en un vector de expresión de baculovirus. Dichas etiquetas epítopo incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles

ES 2 288 649 T3

comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la PRO245 o la parte deseada de la PRO245 (tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGoldTM (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como se describe en O'Reilley *et. al.*, *Baculovirus expresion vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

A continuación, la PRO245 etiquetado con poli-His expresada puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert *et. al.*, *Nature*, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonican dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se aclaran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A₂₈₀ con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato: 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye las proteínas unidas no específicamente. Después de alcanzar la línea base a A₂₈₀ de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni²⁺-NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen PRO245 etiquetada con His₁₀ eluído se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

Alternativamente, la purificación de la PRO245 etiquetada con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

Las PRO245 se expresaron en células de insectos Sf9 infectadas de baculovirus. Aunque la expresión se realizó en realidad en una escala de 0,5-2 L, se puede aumentar fácilmente la escala para preparaciones más grandes (por ejemplo, 8 L). Las proteínas se expresaron como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que la región extracelular de las proteínas se fusionó a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, dominios CH2 y CH3 y/o formas etiquetadas con poli-His.

Tras la amplificación por PCR, las secuencias codificantes respectivas se subclonaron en un vector de expresión de baculovirus (pb.PH.IgG para fusiones de IgG y pb.PH.His.c para proteínas etiquetadas con poli-His) y el vector y el ADN de baculovirus Baculogold[®] (Pharmingen) se cotransfectaron en células *Spodoptera frugiperdo* ("Sf9") 105 (ATCC CRL 1711), utilizando Lipofectina (Gibco BRL). pb.PH.IgG y pb.PH.His son modificaciones del vector de expresión de baculovirus disponible comercialmente pVL1393 (Phanningen), con regiones polienlazadoras modificadas que incluyen las secuencias etiqueta His o Fc. Las células se desarrollaron en medio TNM-FH de Hink suplementado con FBS al 10% (Hyclone). Las células se incubaron durante 5 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y posteriormente se utilizó para la primera amplificación viral mediante la infección de células Sf9 en medio TNM-FH de Hink suplementado con FBS al 10% en una multiplicidad de infección aproximada (MOI) de 10. Las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y la expresión de las construcciones en el vector de expresión de baculovirus se determinó mediante la unión por lotes de 1 ml de sobrenadante con 25 ml de gránulos de Ni-NTA (Qiagen) para proteínas etiquetadas con histidina o gránulos de Proteína-A Sefarosa CL-4B (Pharmacia) para proteínas etiquetadas con IgG seguido de análisis SDS-PAGE en comparación con una concentración conocida de patrón de proteína mediante tinción con azul de Coomassie.

El sobrenadante de la primer amplificación viral se utilizó para infectar una cultivo celular con agitación (500 ml) de células Sf9 desarrolladas en medio ESF-921 (Expression Systems LLC) con una MOI aproximada de 0,1. Las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y se filtró. Se repitieron la unión por lotes del cultivo celular con agitación y el análisis SDS-PAGE, según sea necesario, hasta que se confirmó la expresión del cultivo celular con agitación.

El medio acondicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 L) se recogió mediante centrifugación para extraer las células y se filtró mediante filtros de 0,22 micras. Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las construcciones de proteínas se purificaron utilizando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombeó en una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada en 20 mM de Hepes, pH 7,4, tampón que contenía 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluyó con tampón de equilibrio que contenía 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se

ES 2 288 649 T3

desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento que contenía 10 mM de Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se almacenó a -80°C.

Las construcciones de proteínas con inmunoadhesina (que contenían Fc) se purificaron del medio acondicionado tal y como se indica a continuación. El medio acondicionado se bombeó en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en 20 mM de tampón fosfato sódico, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lavó extensamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente mediante la recolección de fracciones de 1 ml en tubos que contenían 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento tal y como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad de las proteínas se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PEG) SDS y la secuenciación de aminoácidos N-terminales mediante la degradación de Edman.

La PRO245 también se expresó en células High-5 infectadas de baculovirus utilizando un procedimiento análogo. Las células High-5 se desarrollaron hasta una confluencia del 50% a 27°C, sin CO₂, sin penicilina ni estreptomicina. Para cada placa de 150 mm, se mezclaron 30 µg de vector basado en PIE que contenía PRO245 con 1 ml de medio Ex-Cell (Medio: Ex-Cell 401, 1/100 L-Glu JRH Biosciences, # 14401-78P, nota: el medio es sensible a la luz), y en un tubo separado, 100 µl de sectina Cell (GibcoBRL # 10362-010) se mezclaron con 1 ml de medio Ec-Cell. Los vectores pIE1-1 y pIE1-2 se diseñan para la expresión constitutiva de proteínas recombinantes del promotor y el del baculovirus en las células de insectos transformadas de forma estable (Cartier J. L., et al., *J. Virol.* **68**, 7728-7737) (1994). Los plásmidos sólo difieren en la orientación de los múltiples sitios de clonación y contienen todas las secuencias de promotor que se sabe que son importantes para la expresión génica mediada por iel en células de insectos no infectadas, así como el elemento potenciador hr5, pIE1-1 y pIE1-2 incluyen el sitio de iniciación de la traducción iel y se pueden utilizar para producir proteínas de fusión.

Las dos soluciones se combinaron y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron 8 ml de medio Ex-Cell a los 2 ml de la mezcla ADN/CellFectina y se puso en capas sobre las células High-5 lavadas previamente con medio Ex-Cell. La placa se incubó en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla ADN/CellFectina se aspiró y las células se lavaron una vez con Ex-Cell para eliminar el exceso de Cellfectina. Se añadió medio nuevo Ex-Cell (30 ml) y las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y se determinó la expresión de PRO245 mediante unión por lotes de forma similar a la descrita para las células Sf9.

Ejemplo 13

Preparación de anticuerpos que se unen a PRO245

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a PRO245.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen PRO245 purificado, proteínas de fusión que contienen PRO245, y células que expresan PRO245 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse por el técnico en la materia sin una gran experimentación.

Los ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de PRO245 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se estimulan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante varias semanas, los ratones también se pueden estimular con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos de PRO245.

Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales "positivos" para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de PRO245. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA para la reactividad contra PRO245. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO245 está dentro de la técnica.

Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones singeneicos Balb/c para producir ascitos que contienen los anticuerpos monoclonales anti-PRO245. Alternativamente, las células de hibridoma pueden desarrollarse en matraces o botellas en rodillo de cultivos de tejidos. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los ascitos se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por

ES 2 288 649 T3

cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

Depósito de material

5

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MS, USA (ATCC):

10	Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
	DNA35638-1141	209265	16 de septiembre de 1997

15 Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o 20 tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

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

30

35 La memoria escrita anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención y otras construcciones que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones. El depósito del material de la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, las diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y caen dentro 40 del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

45

50

55

60

65

ES 2 288 649 T3

REIVINDICACIONES

5 1. Antagonista del polipéptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 3 (SEC ID NO: 9), para su uso en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el antagonista es:

10 un anticuerpo para dicho polipéptido, que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente la actividad de dicho polipéptido en la estimulación de la proliferación de los linfocitos T estimulados y/o la actividad de dicho polipéptido en la estimulación de infiltrados de células inflamatorias en la piel de cobaya; o

15 una molécula antisentido, ribosómica o triple hélice dirigida contra la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la Figura 2 (SEC ID NO: 8).

20 2. Antagonista según la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo.

25 3. Antagonista según la reivindicación 2, el cual es un anticuerpo monoclonal.

30 4. Antagonista según la reivindicación 3, el cual tiene residuos de una región de complementariedad determinante (CDR) no humana y contiene residuos de la región armazón (FR) humana.

35 5. Utilización de un polipéptido en la fabricación de un medicamento para aumentar la respuesta inflamatoria, en la que el polipéptido:

40 (i) comprende los aminoácidos de 1 a 312 de la Figura 3 (SEC ID NO:9), o una forma truncada o secretada natural, una forma variante natural o una variante alélica del mismo natural; o

45 (ii) tiene como mínimo un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la Figura 3 (SEC ID NO: 9), con o sin su metionina de iniciación, en el que dicha identidad de secuencia se determina sobre la longitud completa de dicha secuencia.

50 6. Utilización según la reivindicación 5, en el que el nivel de identidad es de como mínimo el 85%.

55 7. Utilización según la reivindicación 5, en el que el nivel de identidad es de como mínimo el 90%.

60 8. Utilización según la reivindicación 5, en el que el nivel de identidad es de como mínimo el 95%.

65 9. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el medicamento está destinado al tratamiento de enfermedades infecciosas o inmunodeficitarias.

40

45

50

55

60

65

FIGURA 1A

SEQ ID NO: 6	A33	1	W V G K W W P V L W T I C A Y A R Y T D A I S V E T P Q O V L R A S Q G K S V T L P C T Y H T S T S
SEQ ID NO: 1	40628	1	I G T K A O V E R K L C F I L A I L L C S S L A L G S V T V H S S E P E V A I P E
SEQ ID NO: 2	45416	1	W G I L L G C L L L G H L T V D T Y G R P I L E V P E S V T G P W K G D Y N L P C T Y O P L
SEQ ID NO: 9	35638	1	H A R R S R H R L L L L R Y L Y V A L G Y H K A Y G F S A P K D Q Q V Y T A Y E
SEQ ID NO: 10	JAM	1	W G T E G K A G R K L F I F T S M I L G S S l V Q G K G S V Y T A O S O V Q V P E
A33	51	S R E G L I Q W O K L L L T H T E R V V I W P F S N K H Y I H G E L Y K N R V S I S H N H A E O S D A	
40628	43	H H P V K L S C A Y S G F S S P R V E W K F O Q G O T T R A L Y C Y N H K I T A S Y E D R V T F L P T	
45416	47	O G Y T Q V V L Y K W L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q A K Y Q G R L H Y S H K V P G O V	
35638	43	Y Q E A I L A C K T P K K T V S S R A L E W K K L G R S V S F Y Y Q Q T I L Q G O F K H R A E M I D F	
JAM	42	W E S I K L T C T Y S G F S S P R V E W K F V Q G S T T A L V C Y H S O I T A P Y A D R V T F S S S	
A33	101	S I T I D Q L T H A D O N G T Y E C S V S L . W S O L E G N T K S R V A L L V L V P P S K	
40628	93	G I T F K S V T R E D T G T Y T C N V S E E G G H S Y G E V K Y K L I V L V P P S K	
45416	97	S L Q L S T L E D D O R S H Y T C E V T W O T P O G N O V Y R D K I T E L V O K L S S K P T V T	
35638	93	W I R I K H V T A S D A G K Y T R C E V S A P S E O G A H L E E D T Y T L E V L Y A P A V	
JAM	92	G I T F S S V T R K D O N G E Y T C N V S E E G G H A H Y G E V S I H L T V L V P P S K	
A33	144	P E C G I E G E T I I G N H I Q I T C S K E G S P T P O Y S M K R Y N I L M Q E O	
40628	135	P T V N I P S S A T I G H R A V L T C S E O D G S P P S E Y T W F K D G I Y W P T H . P K S T R A F	
45416	147	T G S G Y G F T V P O G M R I S L O C Q A R . G S P P I S Y I W Y X Q O T N N Q E P	
35638	137	P S C E V P P S S A L S G T V V E L R C O D K E G N P A P E Y T W F K D I R L L E N . P A L G S O S	
JAM	134	P T I S V P P S S V T I G N R A V L T C S E H D G S P P S E Y S W F K D G I S W L T A D A K K T R A F	

FIG.- 1A

ES 2 288 649 T3

FIGURA 1B

SEQ ID NO: 6	A33	186	...	PLAQQASGQPVSLKHNISOTSGYYICITYSSHEEG...	IQFCNITY
SEQ ID NO: 1	40628	184	SNSSYVLNPTTGELVFDPLSASOTGEYSCEARNYG...	IPMTSHAY	
SEQ ID NO: 2	45416	188	IKVATLSTLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQYEQHS... KDIYKFVVKD	YRRCPGKR	
SEQ ID NO: 9	35638	186	TNSSYTWNTKTGTLOFTNTVSXLDIGEYSCEARN... SYG...	IAWRSEAA	
SEQ ID NO: 10	JAM	184	WNSSFIDPKSGOLIFDOPVTAFDSGEYYCQAO... NGY...		
A33	227	AVRSRPSWNVAYVGIAVGVVALLIGIIYCCC... CRGKDDNTEDOKEDA..			
40628	228	RWEAVERNYGYIVAAVLYTLLLGILYFGWFFAY... SRGHEDRTKKGTS...			
45416	233	SSKLTKTEAPTTWTYPLKATSTYKOSWDWITDGYL... GETSATGP... GKSL			
35638	230	WQYDOLHISGILKAYVYVYALVISYCGIGVCYA... QORKGYFSKETSFQKS..			
JAM	228	WDAVELNYGGIVAAVLYTLLGLLIFGVWFFAY... SRGYFETIKKGTRAP..			
A33	275	RPNREAYEEPPPEOLREL... SREEREEDDYRQEERGSTGRESPDHLDQ			
40628	275	...SKKYIYSQPSARSEG... EFKOTSSFLV...			
45416	283	PVFAILLISLCCMVFTHAYIWLCKTS... OEHVYEARR...			
35638	277	WSSSKATTW. SENYQOWLTPV... IPALWKAAGGSRGQEF...			
JAM	276	...GKKYIYSQPSARSEG... EFKOTSSFLV...			

FIG. 1B

ES 2 288 649 T3

FIGURA 2

SEC ID No: 8

CCCAGAACGTTCAAGGGCCCCCGGCCTCCTGCGCTCCTGCCGCCGGACCCCTGACCTCCT
CAGAGCAGCCGGCTGCCGCCCGGAAGATGGCGAGCAGGAGCCACCGCCTCCTCCT
GCTGCTGCTGCGCTACCTGGGGTCGCCCTGGGCTATCATAAAGGCCTATGGGTTTCTGC
CCAAAAGACCAACAAGTAGTCACAGCAGTAGAGTACCAAGAGGCTATTTAGCCTGCAA
AACCCCAAAGAAGACTGTTCTCCAGATTAGAGTGGAAAGAAACTGGGTGGAGGTCTC
CTTGCTACTATCACAGACTCTCAAGGTGATTTAAAAATCGAGCTGAGATGATA
TTCAATATCCGGATCAAAAATGTACAAGAAGTGTGATGCCGGAAATATCGTGTGAAGT
TAGTGGCCCATCTGAGCAAGGCCAAAACCTGGAAGAGGATACAGTCACCTCTGGAAGTATT
AGTGGCTCCAGCAGTTCCATCATGTGAAGTACCCCTCTGCTCTGAGTGGAACTGTGGT
AGAGCTACGATGTCAAGACAAAGAAGGAATCCAGCTCCTGAATACACATGGTTAAGGA
TGGCATCCGTTGCTAGAAAATCCCAGACTTGGCTCCAAAGCACCAACAGCTCATAACAC
AATGAATACAAAATGGAACTCTGCAATTAACTGTGTTCCAAACTGGACACTGGAGA
ATATTCTGTGAAGCCCGCAATTCTGTTGGATATCGCAGGTGCTCTGGAAACGAATGCA
AGTAGATGATCTCAACATAAGTGGCATCATAGCAGCGTAGTAGTTGTGGCCTTAGTGA
TTCCGTTGTGGCCTTGGTGTATGCTATGCTCAGAGGAAGGCTACTTTCAAAAGAAC
CTCCTTCCAGAAGAGTAATTCTCATCTAAAGCCACGACAATGAGTGAATGTGCAGTG
GCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTGGAAAGGCCGGCGGGGATCACGAGGTAGGA
GTTCTAGACCAGTCTGCCAATATGGTAAACCCATCTCTACTAAAATACAAAAATTAG
CTGGGCATGGTGGCATGTGCCAGTCCAGCTGCTGGAGACAGGAGAATCACTTGA
ACCCGGGAGGCAGGGTGCAGTGAGATCACGCCACTGCAGTCCAGCCTGGTAA
CAGAGCAAGATTCCATCTCAAAAATAAAATAAAATAAAATAACTGGTTTAC
TGTAGAATTCTTACAATAATAGCTTGATATT

FIGURA 3

SEC ID No: 9

MARRSRHRLLLLLLRYLVVALGYHKAYGFSAPKDOQQVVTAVEYQEAILACKTPKKT
LEWKKLGRSVSFVYYQOTLQGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSE
EQGQN LEEDTVTLEVLVAPAVPSCEVPSSALSGTVELRCQDKEGNPAPEYTWF
FKDGIRLLENPR LGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVKLDTGEYSCEARN
SVGYRRCPGKRMQVDDLNISGI IAAVVVVALVISVCGLGV
CYAQRKGYSKETSFKSNSSSKATTMSENVQWLTPV
I PALW KAAAGGSRGQEF

SEQ ID NO: 6 A33_hum 1 . . M V G K W W P Y [WT] C A V R Y T V D A I S V E T P O O Y L R A S O G K S V T L P C
 SEQ ID NO: 9 35638 1 H A R R S H A L L L L L R Y L V A L G Y H K A Y G F S A P K D Q A V Y T A V E Y Q E A I L A C

A33_hum 44 T Y H T S T S S A R E G L I O W D K L L L T H E R V Y I W P F S N X N Y I M G E L Y K N R V S I S N
 35638 51 . . K T P X X T Y S S R L E W K K L G R S Y S F V Y Y Q Q T . L Q G O . F K N R

A33_hum 94 N A E Q S D A S I T I D O L T H A O N G I Y E C S V S L W S O L E G N . T K S R V A L V L V P P S
 35638 87 . A E N I O F N I A I K N Y T R S D A G K Y R C E V S A P S E Q G O N L E E D T V I L E Y L V A P A

A33_hum 143 K P E C G I E G E T I I G N N I Q U T C O S K E G S P T P O A Y S W K R A Y N I L H O E A P L A O P A S
 35638 136 V P S C E V P S S A L S G T V V E L R C O D K E G N P A P E Y T W F K O G I R L L E N P R L G S O S

A33_hum 193 G Q P V S L K N I S T O T S G Y Y I C T S S N E E G T O F C N I T V A V R S P S W N V A L Y V
 35638 186 T N S S Y T M N T K T G T L Q F H T . V S K L D T G E Y S C E A R N S Y G Y R A C P G K R M O V D D

A33_hum 240 G I A V G V V A L I I G I I Y C C . . . C C R G K D D N T E K E D A R P N R E A Y E E P P E
 35638 235 L N I S G I I A V V V V A L V I S V C G I G V C Y A Q R K G Y F S K E I T S F Q K S H S S S K A T T

A33_hum 287 Q L R E L S A . E R E E F D O Y R Q E E O A S T G A E S P D H L D Q
 35638 285 W S E N V Q W L T P V I P A L W K A A A G G S R G Q E F

FIGURA 4

FIG. - 4

SEQ ID NO: 10	jam	1 M G T E G K A G R K I L F T S W I L G S L V O C K G S V V Y I A Q S D V O V . . . P E N E S I K I L
SEQ ID NO: 29	35638	1 . . W A R R S A H A L L I L L R A Y L V A L G Y H K A Y G F S A P K D Q Q V V T A V E Y O E A I I L
jam	48 T C .	I Y S G F S S P R Y E W K F V Q G S T I A L Y C Y H S O I T A P Y A D R V T F S S S G I T F S
35638	49 A C X I P K K T V S S A L E W K K I .	G A S V S F V Y Y Q A T L O G O F K N R A E N I D F H I R I K
jam	97 S V T R K D O N G E Y I T C H Y S . . E E G C O N Y C E V S I H L T Y L V P P S K P T I S V P S S V T I	
35638	98 N V T A S D O A G K Y R A C E Y S A P S E O G Q N L E E D T Y T L Y A P A V Y P S C E V P S S A L S	
jam	145 G N R A Y L I T C S E H D G S P P S E Y S W F K D C I S M L T A D A K K T R A F M N S S F T I D P K S	
35638	148 G T V V E L R A C Q D K E G H P A P E Y T W F K D G I A L L . E N P A L G S O S T N S S Y T M N T K T	
jam	195 G O L I I F D P V T A F D S G E Y Y C O A O N G Y G T A M R S E A A H W D A V E L N V G G I V A V L	
35638	197 G T L Q F N T V S K L D T G E Y S C E A R M S V G . Y R R C P G K R W O V D D L N I S G I I A V V	
jam	245 Y T L I L L G L L I F G V W F A Y S R G Y F E T I K K G T A P G K K V I Y S O P S T R S E G E F K Q	
35638	246 Y V A L V I S V C G L G V C Y A R K G Y F . . . S K E T S F O K S N S S S K A T T W S E N V O W L	
jam	295 T S S F L Y	
35638	293 T P V I P A L W K A A A G G S R G Q E F	

FIGURA 5

FIG.- 5

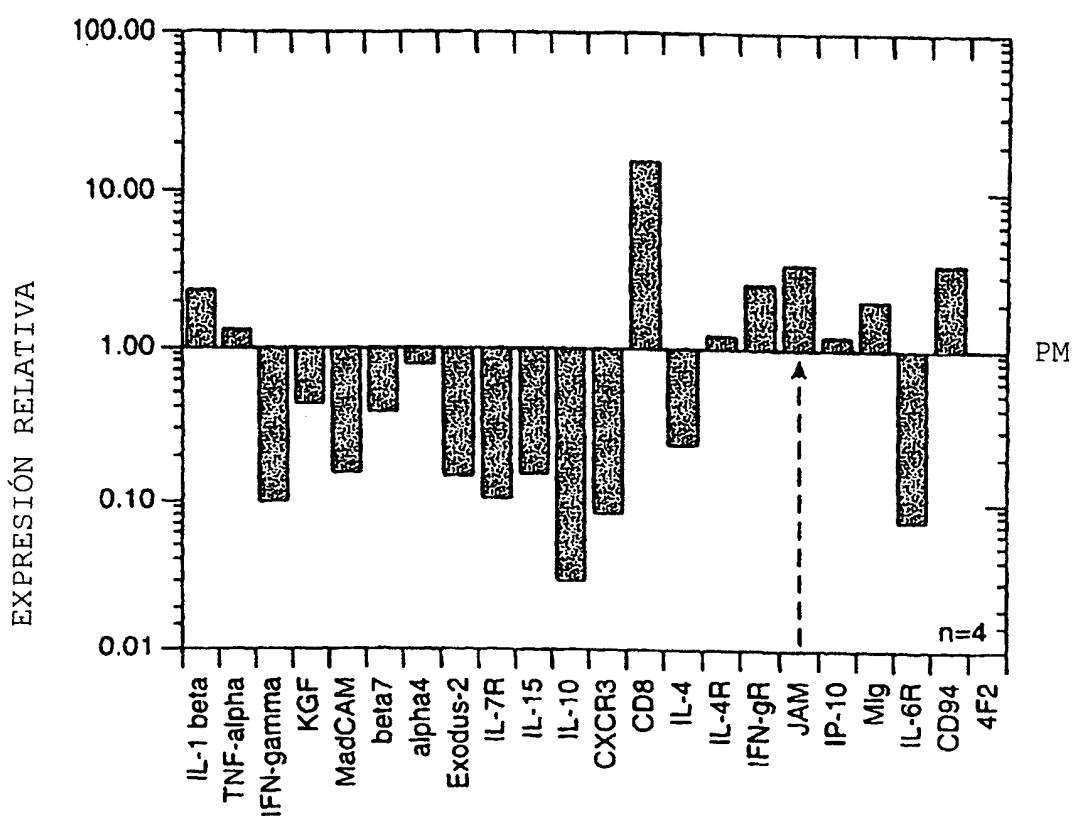
SEQ ID NO: 6	A33_hum	1WVGKXNWWPVLYT. LCAVRYTVDAIS YETPQOVLRA\$OCK\$VTLPCT
SEQ ID NO: 10	jam	1	WGTEGKAGRKLFFTSWILGSLVOGXGSYTAOSOVOVOPENESIKLTCT
A33_hum		45	YHTSTSSREGLIQWDKLILTHTERAYYIWPF\$NKNYIHGEELYKNRVSISNN
jam		51	YSGFSSPA...YEM.KFVQGSTTALYC.YNSQ..ITAP.YADORYTFSS.
A33_hum		95	AEOSDASITIDOLTHAONGTYECSSLWSOLEGNTKSRAVALLVLVPPSKP
jam		91SGITFSSVTRXDGEGYTCHNSEEgg.QNYGEVSIHLTVLVPSSKP
A33_hum		145	ECCIGEGETIGNNIOTCSKEGSPTPOYSWWKRYNINNOEQPLAQOPASGO
jam		135	TISVPPSSVTTIGNRAVLTCSEHDGSPSEYSSWFKOGUSNLTADAKKTRAFM
A33_hum		195	PVSLLKNI\$TDTSGYYICTSSNEEGIOPCN...ITVAVRSPPSN...YAL
jam		185	NSSFTIDPKSGOLIFDOPVTA\$ODGEYYCQANGYGTIAWSEAHMDOAYEL
A33_hum		238	YY.GIAVGVVAALIIG.IYC...CCCAGKDONTEDKEDARPNAEAYEE
jam		235	HYGGIVAVYLVTLGLLFLFGYWFAYSRGYFE.ITTKKGTA\$P\$GKXVIVYSQ
A33_hum		284	PPPEOLREL\$REEEEDYRQEEOFSTGRESPOHLDQ
jam		284	PS\$TASEGEFKOTSSFLY

FIGURA 6

FIG.- 6

ES 2 288 649 T3

FIGURA 7



ES 2 288 649 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.
5 Ashkenazi, Avi J.
Fong, Sherman
Goddard, Audrey
Gurney, Austin L.
Napier, Mary A.
Tumas, Daniel
10 Word, William I.

<120> COMPUESTOS, COMPOSICIONES Y PROCEDIMIENTOS PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES CARACTERIZADAS POR ANTÍGENOS DE TIPO A33.

15 <130> P1216R1PCT

20 <141> 1998-11-20

25 <150> US 60/066.364
<151> 1997-11-21

30 <150> PCT/US98/19437
<151> 1998-03-20

35 <150> US 60/078.936
<151> 1998-09-17

40 <160> 30

45 <210> 1
<211> 299
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 1

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

ES 2 288 649 T3

	Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val			
	140	145	150	
5	Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr			
	155	160	165	
10	Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr			
	170	175	180	
	Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly			
	185	190	195	
15	Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr			
	200	205	210	
20	Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn			
	215	220	225	
	Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val			
	230	235	240	
25	Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe			
	245	250	255	
	Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys			
	260	265	270	
30	Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala			
	275	280	285	
	Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val			
	290	295	299	
35	<210> 2			
	<211> 321			
	<212> PRT			
40	<213> <i>Homo sapiens</i>			
	<400> 2			
45	Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val			
	1	5	10	15
	Asp Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr			
	20	25	30	
50	Gly Pro Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro			
	35	40	45	
	Leu Gln Gly Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg			
	50	55	60	
	Gly Ser Asp Pro Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp			
	65	70	75	
60	Mis Ile Gln Gln Ala Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His			
	80	85	90	
	Lys Val Pro Gly Asp Val Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met			
65	95	100	105	

ES 2 288 649 T3

	Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro		
	110	115	120
5	Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val		
	125	130	135
10	Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro Thr Val Thr Thr Gly Ser Gly		
	140	145	150
	Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met Arg Ile Ser Leu Gln Cys		
	155	160	165
15	Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr Ile Trp Tyr Lys Gln		
	170	175	180
	Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr Leu Ser Thr		
	185	190	195
20	Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser Tyr Phe		
	200	205	210
25	Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser Asp Ile		
	215	220	225
	Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys		
	230	235	240
30	Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser		
	245	250	255
	Thr Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr		
	260	265	270
35	Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe		
	275	280	285
40	Ala Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr		
	290	295	300
	Met Ala Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His		
	305	310	315
45	Val Tyr Glu Ala Ala Arg		
	320 321		

50	<210> 3
	<211> 390
	<212> ADN
	<213> Artificial
55	<220>
	<221> Secuencia Artificial
	<222> 1-390
60	<223> Secuencia Artificial

ES 2 288 649 T3

<400> 3

5 **cttcttgcca actggtatca cttcaagtc cgtgacacgg gaagacactg** 50
ggacatacac **ttgtatggtc tctgaggaag gcggcaacag ctatgggag** 100
10 **gtcaaggta agctcatcgt gcttgcct ccatccaagc ctacagttaa** 150

15 **catccccctcc tctgccacca ttgggaaccg ggcagtgcgt acatgctcag** 200
aacaagatgg **ttccccaccc tctgaataca cctggttcaa agatgggata** 250
20 **gtgatgccta cgaatccccaa aagcacccgt gccttcagca actcttccta** 300
tgtcctgaat **cccacaacag gagagctggc cttgatccc ctgtcagcct** 350
25 **ctgatactgg agaatacagc tgtgaggcac ggaatgggta** 390

<210> 4

30 <211> 726

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<221> Secuencia Artificial

<222> 1-726

40 <223> Secuencia Artificial

45

50

55

60

65

ES 2 288 649 T3

<400> 4

5 tccctcgtcccc ctcgcgtgttag tcgcggagct gtgttctgtt tcccaggagt 50
ccttcggcggt ctgttgtgtcgtt caggtgcgcc tgatcgcgtat ggggacaaag 100
gcgcuaagctc gagagggaaac tgggtgtgcctt cttcatatttgcgtatccctgt 150
tgtgttccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 200
agtcagaatttccgtggataatccgtgttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 250
15 gcttttttttc tccccgtgttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 300
agactcgttttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 350
gacccttttttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 400
ctggggacataacttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 450
gaggtcaagg tcaagctcat cgtgttgtgttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 500
25 taacatcccc tccctctgttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 550
cagaacaaga tggttccccs cctctgttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 600
atagtgtatgc ctacgaatcc caaaagcacc cgtgccttca gcaactcttc 650
30 ctatgttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 700
cctctgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 750
cctctgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 800
cctctgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 850
cctctgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 900
cctctgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 950
cctctgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatcccttgcgtatccctgt 1000

35

<210> 5

<211> 1503

40 <212> ADN
<213> Artifi

<220>

45 <221> Secuencia Artificial
<222> 1-1503
<223> Secuencia Artificial

50

55

60

ES 2 288 649 T3

<400> 5

gcaggcaaag taccagggcc gcctgcatgt gagccacaag gttccaggag 50
5 atgtatccct ccaattgagc accctggaga tggatgacccg gagccactac 100
acgtgtgaag tcacctggca gactcctgat ggcaaccaag tcgtgagaga 150
10 taagattact gagctccqtg tccagaaaact ctctgtctcc aagcccacag 200
tgacaactgg cagcggttat ggcttcacgg tgccccaggg aatgaggatt 250
15 agccttcaat gccagggttc ggggttctcc tcccatagt tatatttgtt 300
ataagcaaca gactaataac cagggAACCC atcaaagttag caaccctaag 350
20 taccttactc ttcaaggctg cggtgatagc cgactcaggc tcctatttct 400
gcactgccaa gggccaggtt ggctctgagc agcacagcga cattgtgaag 450
tttgtggtca aagactcetc aaagctactc aagaccaaga ctgaggcacc 500
25 tacaaccatg acataccct tgaaagcaac atctacagtg aagcagtctt 550
gggactggac cactgacatg gatggctacc ttggagagac cagtgtggg 600
ccagggaaaga gcctgcctgt ctttgccatc atcctcatca tctccttgtg 650
30 ctgtatggtg gttttacca tggcctatat catgctctgt cggaagacat 700
cccaacaaga gcatgtctac gaagcagcca gggcacatgc cagagaggcc 750
35 aacgactctg gagaaaccat gagggtggcc atcttcgcaa gtggctgctc 800
cagtgtgag ccaacttccc agaatctggg gcaacaacta ctctgatgag 850
ccctgcatac gacaggagta ccagatcattt gcccagatca atggcaacta 900
40 cggccgcctg ctggacacag ttccctctgga ttatgagttt ctggccactg 950
agggcaaaag tgtctgttaa aaatgccccca ttaggcccagg atctgctgac 1000
ataattgcct agtcagtccct tgccttctgc atggcccttc tccctgctac 1050
45 ctctttccct ggatagccccaa aagtgtccgc ctaccaacac tggagccgct 1100
gggagtcact ggctttgccc tggaaatttgc cagatgcattt tcaagtaagc 1150
50 cagctgctgg atttggctct gggcccttct agtatctctg ccgggggctt 1200
ctggtaactcc tctctaaata ccagagggaa gatgcccata gcactaggac 1250
ttggtcatca tgcctacaga cactattcaa ctttggcattt ttgccaccag 1300
55 aagacccgag gggaggtca gctctgccag ctcagaggac cagctatatac 1350
caggatcatt tctctttttt cagggccaga cagttttaa ttgaaattgt 1400
60 tatttcacag gccagggttc agttctgctc ctccactata agtctaattgt 1450
tctgactctc tcttggtget caataaatat ctaatcataa cagcaaaaaa 1500
65 aaa 1503

<210> 6

ES 2 288 649 T3

<211> 319
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
5
<400> 6

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

ES 2 288 649 T3

260 265 270

5 Lys Glu Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Pro Pro
275 280 285

10 Glu Gln Leu Arg Glu Leu Ser Arg Glu Arg Glu Glu Glu Asp Asp
290 295 300

Tyr Arg Gln Glu Glu Gln Arg Ser Thr Gly Arg Glu Ser Pro Asp
305 310 315

15 His Leu Asp Gln
319

20 <210> 7

<211> 2181

<212> ADN

25 <213> *Homo sapiens*

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 288 649 T3

<400> 7

5 cccacgcgtc cgcccacgcg tccgcccacg ggtccgcccc cgcgtccggg 50
ccaccagaag tttgagcctc tttggtagca ggaggctgga agaaaggaca 100
10 gaagtagctc tggctgtat gggatctta ctgggcctgc tactcctggg 150
gcacctaaca gtggacactt atggccgtcc catcctggaa gtgccagaga 200
15 gtgtaacagg accttggaaa gggatgtga atcttcctg cacctatgac 250
cccctgcaag gctacaccca agtcttggtg aagtggctgg tacaacgtgg 300
20 ctcagacccct gtcaccatct ttctacgtga ctcttctgga gaccatatcc 350
agcaggcaaa gtaccagggc cgccctgcatg tgagccacaa ggttccagga 400
25 gatgtatccc tccaattttag caccctggag atggatgacc ggagccacta 450
cacgtgtgaa gtcacctggc agactcctga tggcaaccaa gtcgtgagag 500
ataagattac tgagctccgt gtccagaaac tctctgtctc caagcccaca 550
30 gtgacaactg gcagcggtta tggcttcacq gtgccccagg gaatgaggat 600
tagecttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatagt tatatttgg 650
35 ataagcaaca gactaataac caggaaccca tcaaagtgc aaccctaagt 700
accttactct tcaagcctgc ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg 750
40 caactgccaag ggccagggtg gctctgagca qcacagcgcac attgtgaagt 800
ttgtggtcaa agactcctca aagctactca agaccaagac tgagggcacct 850
45 acaaccatga cataccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtccctg 900
ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgctggc 950
50 cagggaaagag cctgcctgtc tttgccatca tcctcatcat ctccttgtgc 1000
tgtatggtgg ttttaccat ggcctataatc atgctctgtc ggaagacatc 1050
55

60

65

ES 2 288 649 T3

ccaacaagag catgtctacg aagcagccag gtaagaaagt ctctcctctt 1100
 5 ccattttga cccccgtccct gccctcaatt ttgattactg gcaggaaatg 1150
 tggaggaagg ggggtgtggc acagacccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200
 10 agggtcagga catagctgcc ttccctctct caggcacctt ctgaggttgt 1250
 tttggccctc tgaacacaaa ggataattta gatccatctg cttcttgctt 1300
 15 ccagaatccc tgggtggtag gatcctgata attaattggc aagaatttag 1350
 gcagaagggt gggaaaccag gaccacagcc ccaagtccct tcttatgggt 1400
 20 ggtgggctct tgggccatag ggcacatgcc agagaggcca acgactctgg 1450
 agaaaccatg agggtggcca tcttcgcaag tggctgctcc agtgatgagc 1500
 25 caacttccca gaatctggc aacaactact ctgatgagcc ctgcataagga 1550
 caggagtacc agatcatcgc ccagatcaat ggcaactacg cccgcctgct 1600
 30 ggacacagtt cctctggatt atgagttct ggccactgag ggcaaaagtg 1650
 tctgttaaaa atgccccatt aggccaggat ctgctgacat aattgcctag 1700
 35 tcagtccttg ccttcgtcat ggccttcttc cctgctacct ctcttcctgg 1750
 atagccaaa gtgtccgcct accaacactg gagccgctgg gagtcactgg 1800
 40 ctttgcctg gaatttgcca gatgcatttc aagtaagcca gctgctggat 1850
 ttggctctgg gcccttctag tatctctgcc gggggcttct ggtactcctc 1900
 tctaaatacc agagggaga tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg 1950
 45 cctacagaca ctattcaact ttggcatctt gccaccagaa gacccgaggg 2000
 aggctcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag gatcatttct 2050
 50 ctttcttcag ggccagacag ctttaattt aaattgttat ttcacaggcc 2100
 agggttcagt tctgctcctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc 2150
 55 tggtgctcaa taaatatcta atcataacag c 2181

60 <210> 8
 <211> 1295
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 65

ES 2 288 649 T3

<400> 8

5 cccagaagtt caagggcccc cggcctcctg cgctcctgcc gcccggaccc 50
 tcgacccctcct cagagcagcc ggctgcccgc ccgggaagat ggcgaggagg 100
 10 agccgccacc gcctcctcct gctgctgctg cgctacctgg tggtcgcct 150
 ggctatcat aaggcctatg gttttctgc cccaaaagac caacaagtag 200

 15 tcacagcagt agagtaccaa gaggctattt tagcctgcaa aaccccaaag 250
 aagactgttt cctccagatt agagtggaaag aaactgggtc ggagtgtctc 300
 20 ctttgtctac tatcaacaga ctcttcaagg tgataaaaa aatcgagctg 350
 agatgataga tttcaatatac cgatcaaaa atgtgacaag aagtgatgcg 400
 25 ggaaatatac gttgtgaagt tagtgcccca tctgagcaag gccaaaacct 450
 ggaagaggat acagtcactc tgaaagtatt agtggctcca gcagttccat 500
 30 catgtgaagt accctcttct gctctgagtg gaactgtggt agagctacga 550
 tgtcaagaca aagaagggaa tccagctcct gaatacacat gtttaagga 600
 35 tggcatccgt ttgctagaaa atcccagact tggctccaa agcaccaaca 650
 gctcatacac aatgaataca aaaactggaa ctctgcaatt taatactgtt 700
 40 tccaaactgg acactggaga atattcctgt gaagccccca attctgttgg 750
 atatcgagg tgtcctggaa aacgaatgca agtagatgat ctcaacataa 800
 45 gtggcatcat agcagccgta gtagttgtgg ctttagtgat ttccgtttgt 850
 ggccttggtg tatgctatgc tcagagggaa ggctactttt caaaagaaac 900
 50 ctccttccag aagagtaatt ctcatctaa agccacgaca atgagtgaaa 950
 atgtcagtg gtcacgcct gtaatcccag cactttggaa ggccgcggcg 1000
 ggcggatcac gaggtcagga gttctagacc agtctggcca atatggtcaa 1050
 55 accccatctc tactaaaata caaaaattag ctggcatgg tggcatgtgc 1100
 ctgcagttcc agctgcttgg gagacaggag aatcaattga acccgggagg 1150
 60 cggaggttgc agttagctga gatcacgcct ctgcagtcctt gctgggtaa 1200
 cagagcaaga ttccatctca aaaaataaaa taaaataata aataaataact 1250
 65 ggtttttacc ttagaattt ttacaataaa tatagcttga tattc 1295

ES 2 288 649 T3

<210> 9

<211> 312

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

10

Met Ala Arg Arg Ser Arg His Arg Leu Leu Leu Leu Leu Arg
1 5 10 15

15

Tyr Leu Val Val Ala Leu Gly Tyr His Lys Ala Tyr Gly Phe Ser
20 25 30

20

Ala Pro Lys Asp Gln Gln Val Val Thr Ala Val Glu Tyr Gln Glu
35 40 45

25

Ala Ile Leu Ala Cys Lys Thr Pro Lys Lys Thr Val Ser Ser Arg
50 55 60

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 288 649 T3

	Leu Glu Trp Lys Lys Leu Gly Arg Ser Val Ser Phe Val Tyr Tyr		
	65	70	75
5	Gln Gln Thr Leu Gln Gly Asp Phe Lys Asn Arg Ala Glu Met Ile		
	80	85	90
10	Asp Phe Asn Ile Arg Ile Lys Asn Val Thr Arg Ser Asp Ala Gly		
	95	100	105
15	Lys Tyr Arg Cys Glu Val Ser Ala Pro Ser Glu Gln Gly Gln Asn		
	110	115	120
20	Leu Glu Glu Asp Thr Val Thr Leu Glu Val Leu Val Ala Pro Ala		
	125	130	135
25	Val Pro Ser Cys Glu Val Pro Ser Ser Ala Leu Ser Gly Thr Val		
	140	145	150
30	Val Glu Leu Arg Cys Gln Asp Lys Glu Gly Asn Pro Ala Pro Glu		
	155	160	165
35	Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Arg Leu Leu Glu Asn Pro Arg		
	170	175	180
40	Leu Gly Ser Gln Ser Thr Asn Ser Ser Tyr Thr Met Asn Thr Lys		
	185	190	195
45	Thr Gly Thr Leu Gln Phe Asn Thr Val Ser Lys Leu Asp Thr Gly		
	200	205	210
50	Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Ser Val Gly Tyr Arg Arg Cys		
	215	220	225
55	Pro Gly Lys Arg Met Gln Val Asp Asp Leu Asn Ile Ser Gly Ile		
	230	235	240
60	Ile Ala Ala Val Val Val Ala Leu Val Ile Ser Val Cys Gly		
	245	250	255
	Leu Gly Val Cys Tyr Ala Gln Arg Lys Gly Tyr Phe Ser Lys Glu		
	260	265	270
	Thr Ser Phe Gln Lys Ser Asn Ser Ser Ser Lys Ala Thr Thr Met		
	275	280	285
	Ser Glu Asn Val Gln Trp Leu Thr Pro Val Ile Pro Ala Leu Trp		
	290	295	300
	Lys Ala Ala Ala Gly Gly Ser Arg Gly Gln Glu Phe		
	305	310	312

<210> 10

<211> 300

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

ES 2 288 649 T3

<400> 10

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

ES 2 288 649 T3

<210> 11
<211> 2181
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

10 ccccacgcgtc cgcccacgcg tccgcccacg ggtccgcccc cagcgtccggg 50
 ccaccagaag tttgagcctc tttggtagca ggaggctgga agaaaggaca 100
 gaagtagctc tggctgtgat gggatctta ctgggcctgc tactcctggg 150
15 gcacctaaca gtggacactt atggccgtcc catcctggaa gtgccagaga 200
 gtgtaacagg accttggaaa gggatgtga atcttccctg cacctatgac 250
20 ccctgcaag gctacaccca agtcttggtg aagtggctgg tacaacgtgg 300
 ctcagaccct gtcaccatct ttctacgtga ctcttctgg accatatcc 350
25 agcaggcaaa gtaccagggc cgcctgcatt tgagccacaa ggttccagga 400
 gatgtatccc tccaatttag caccctggag atggatgacc ggagccacta 450
 cacgtgtgaa gtcacctggc agactcctga tggcaaccaa gtcgtgagag 500
30 ataagattac tgagctccgt gtccagaaaac tctctgtctc caagcccaca 550
 gtgacaactg gcagcggtta tggcttcacg gtgcggcagg gaatgaggat 600
35 tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatcagt tatatttgt 650
 ataagcaaca gactaataac caggaaccca tcaaagttagc aaccctaagt 700
40 accttactct tcaaggcctgc ggtgatagcc gactcaggct cctatttctg 750
 caetgccaag ggccagggtt gctctgagca gcacagcgac attgtgaagt 800
 ttgtggtcaa agactcctca aagctactca agaccaagac tgaggcacct 850
45 acaaccatga cataccccc gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900
 ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgcgtggc 950
 cagggaaagag cctgcctgtc tttgccatca tcctcatcat ctccttgc 1000
50 tgtatggtgg ttttaccat ggccttatatc atgtctgtc ggaagacatc 1050
 ccaaacaagag catgtctacg aagcagccag gtaagaaaagt ctctccttt 1100
55 ccatffffga cccccgtccct gccctcaatt ttgattactg gcaggaaatg 1150
 tggaggaagg ggggtgtggc acagacccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200
 agggtcagga catagctgcc ttcctctct caggcacctt ctgaggttgt 1250
60 tttggccctc tgaacacaaa ggataattta gatccatctg cttctgttt 1300
 ccagaatccc tgggtggtag gatcctgata attaattggc aagaatttag 1350
 gcagaagggt gggaaaccag gaccacagcc ccaagtcctt tcttatgggt 1400
65 ggtggtgtct tgggccatag ggcacatgcc agagaggcca acgactctgg 1450
 agaaaccatg agggtggcca tcttcgcaag tggctgtcc aqtgtqacq 1500

ES 2 288 649 T3

caacttccca gaatctggc aacaactact ctgatgagcc ctgcata tagga 1550
5 caggagtacc agatcatcgc ccagatcaat ggcaactacg cccgcctgct 1600
ggacacagtt cctctggatt atgagttct ggccactgag ggcaaaagtg 1650
10 tctgttaaaa atgccccatt aggccaggat ctgctgacat aattgcctag 1700
tcagtccttg cttctgcat ggccttccttc cctgctacct ctttcctgg 1750
15 atagcccaa gtgtccgcct accaacactg gagccgctgg gagtca ctgg 1800
ctttgcctg gaatttgcctt gatgcatttc aagtaagcca gctgctggat 1850
20 ttggctctgg gcccttcttag tatctctgcc gggggcttct ggtactcctc 1900
tctaaatacc agagggaaaga tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg 1950
25 cctacagaca ctattcaact ttggcatctt gccaccagaa gacccgaggg 2000
aggctcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag gatcatttct 2050
30 ctttcttag ggccagacag ctttaattt aatttgttat ttcacaggcc 2100
agggttcagt tctgctcctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc 2150
tggtgctcaa taaatatcta atcataacag c 2181
35

<210> 12
<211> 24
40 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
45 <221> Secuencia Artificial
<222> 1-24
<223> Secuencia Artificial
50 <400> 12

tcgcgagact gtgttctgtt tccc
55 <210> 13
<211> 50
<212> ADN
60 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Secuencia Artificial
65 <222> 1-50
<223> Secuencia Artificial

24

ES 2 288 649 T3

<400> 13

tgatcgcat ggggacaaag gcgcaagctc gagaggaaac tgggtgcct 50
5 <210> 14
<211> 20
<212> ADN
10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Secuencia Artificial
15 <222> 1-20
<223> Secuencia Artificial

<400> 14 20
20 acacctggtt caaagatgg
<210> 15
25 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<221> Secuencia Artificial
<222> 1-24
35 <223> Secuencia Artificial

<400> 15

40 taggaagagt tgctgaaggc acgg 24
<210> 16
<211> 20
45 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
50 <221> Secuencia Artificial
<222> 1-20
<223> Secuencia Artificial

55 <400> 16

ttgccttact caggtgctac 20
60 <210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
65 <220>
<221> Secuencia Artificial

ES 2 288 649 T3

<222> 1-20
<223> Secuencia Artificial

5 <400> 17

20

actcagcagt ggttagaaag

10 <210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<221> Secuencia Artificial
<222> 1-24

20 <223> Secuencia Artificial

<400> 18

25 tatccctcca attgagcacc ctgg

24

<210> 19
<211> 21

30 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
35 <221> Secuencia Artificial
<222> 1-21
<223> Secuencia Artificial

40 <400> 19

21

gtcggaagac atcccaacaa g

45 <210> 20
<211> 24
<212> ADN

50 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Secuencia Artificial

55 <222> 1-24
<223> Secuencia Artificial

<400> 20

60 cttcacaatg tcgctgtgct gctc

24

<210> 21
65 <211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

ES 2 288 649 T3

<220>
<221> Secuencia Artificial
<222> 1-24
5 <223> Secuencia Artificial

<400> 21

10 agccaaatcc agcagctggc ttac 24

<210> 22
<211> 50
15 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <221> Secuencia Artificial
<222> 1-50
<223> Secuencia Artificial

25 <400> 22

tggatgaccg gagccactac acgtgtgaag tcacctggca gactcctgat 50

30 <210> 23
<211> 260
<212> PRT
35 <213> *Homo sapiens*

40

45

50

55

60

65

ES 2 288 649 T3

<400> 23

Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His Ser Ser Glu Pro Glu Val
 1 5 10 15

Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr Ser
 20 25 30

10

Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Asp Gln Gly Asp
 35 40 45

15

Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr Ala Ser Tyr
 50 55 60

20

Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser
 65 70 75

Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu
 80 85 90

25

Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val
 95 100 105

30

Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala
 110 115 120

Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly
 125 130 135

35

Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met
 140 145 150

40

Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr
 155 160 165

Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser
 170 175 180

45

Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr
 185 190 195

50

Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu
 200 205 210

Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile
 215 220 225

55

Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg
 230 235 240

60

Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val
 245 250 255

Ile Tyr Ser Gln Pro
 260

65

<210> 24

<211> 270

ES 2 288 649 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 24

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

ES 2 288 649 T3

<210> 25

<211> 263

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

10

Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His Ser Ser Glu
1 5 10 15

15

Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys
20 25 30

20

Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Asp

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 288 649 T3

	35	40	45
5	Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr 50	55	60
10	Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr 65	70	75
15	Phe Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met 80	85	90
20	Val Ser Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys 95	100	105
25	Leu Ile Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro 110	115	120
30	Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu 125	130	135
35	Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly 140	145	150
40	Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn 155	160	165
45	Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp 170	175	180
50	Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg 185	190	195
55	Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu 200	205	210
60	Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala Ala Val Leu Val 215	220	225
65	Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala 230	235	240
70	Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr Ser Ser 245	250	255
75	Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro 260	263	

<210> 26

<211> 273

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 288 649 T3

<400> 26

5	Leu Cys Ala Val Arg Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr 1 5 10 15
10	Pro Gln Asp Val Leu Arg Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu 20 25 30
15	Pro Cys Thr Tyr His Thr Ser Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile 35 40 45
20	Gln Trp Asp Lys Leu Leu Leu Thr His Thr Glu Arg Val Val Ile 50 55 60
25	Trp Pro Phe Ser Asn Lys Asn Tyr Ile His Gly Glu Leu Tyr Lys 65 70 75
30	Asn Arg Val Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu Gln Ser Asp Ala Ser 80 85 90
35	Ile Thr Ile Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn Gly Thr Tyr Glu 95 100 105
40	Cys Ser Val Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn Thr Lys Ser 110 115 120
45	Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Glu Cys 125 130 135
50	Gly Ile Glu Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu Thr 140 145 150
55	Cys Gln Ser Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys 155 160 165
60	Arg Tyr Asn Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala 170 175 180
65	Ser Gly Gln Pro Val Ser Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Thr Ser 185 190 195
70	Gly Tyr Tyr Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe 200 205 210
75	Cys Asn Ile Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala 215 220 225
80	Leu Tyr Val Gly Ile Ala Val Gly Val Val Ala Ala Leu Ile Ile 230 235 240
85	Ile Gly Ile Ile Ile Tyr Cys Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp 245 250 255
90	Asn Thr Glu Asp Lys Glu Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr 260 265 270
	Glu Glu Pro 273

<210> 27

<211> 413

ES 2 288 649 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<221> Secuencia Artificial
<222> 1-413
<223> Secuencia Artificial

10 <400> 27

ctcgagccgc tcgagccgtg cggggaaata tcgttgtgaa gtttagtgccc 50

15

catctgagca aggccaaaac ctggaagagg atacagtcac tctggaagta 100

20 **ttagtggctc cagcagttcc atcatgtgaa gtaccctctt ctgctctgag 150**

tggaactgtg gtagagctac gatgtcaaga caaagaaggg aatccagctc 200

25 **ctgaatacac atggtttaag gatggcatcc gtttgctaga aaatcccaga 250**

cttggctccc aaagcaccaa cagctcatac acaatgaata caaaaactgg 300

30 **aactctgcaa tttaatactg tttccaaact ggacactgga gaatattcct 350**

gtgaagccccg caattctgtt ggatatcgca ggtgtcctgg ggaaacgaat 400

35 **gcaagttagat gat 413**

<210> 28
40 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

45 <220>
<221> Secuencia Artificial
<222> 1-22
<223> Secuencia Artificial

50 <400> 28

atcggtgtga agtttagtgcc cc

55 <210> 29
<211> 23
22
<212> ADN
60 <213> Secuencia Artificial

<220>
<221> Secuencia Artificial
<222> 1-23
<223> Secuencia Artificial

65

ES 2 288 649 T3

<400> 29

acctgcgata tccaaacagaa ttg

23

5 <210> 30

<211> 48

<212> ADN

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<221> Secuencia Artificial

15 <222> 1-48

<223> Secuencia Artificial

<400> 30

20

ggaagaggat acagtcaactc tggaagtatt agtggctcca gcagttcc

48

25

30

35

40

45

50

55

60

65