



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 276 393**

(51) Int. Cl.:

**C12N 15/19** (2006.01)

**C12N 15/75** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 5/16** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **95921220 .0**

(86) Fecha de presentación : **06.04.1995**

(87) Número de publicación de la solicitud: **0755446**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **29.01.1997**

(54) Título: **Cardiotrofina y sus usos.**

(30) Prioridad: **25.04.1994 US 233609**  
**05.08.1994 US 286304**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.06.2007**

(72) Inventor/es: **Baker, Joffre;**  
**Chien, Kenneth;**  
**King, Kathleen;**  
**Pennica, Diane y**  
**Wood, William**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.06.2007**

(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

Cardiotrofina y sus usos.

### 5 Campo de la invención

La presente invención está relacionada con un factor de hipertrofia cardíaca (conocido también como cardiotrofina), para modular la función cardíaca en el tratamiento de fallo cardíaco y para modular la función neural en el tratamiento de trastornos neurológicos.

### 10 Antecedentes de la invención

El fallo cardíaco afecta aproximadamente a tres 3 millones de americanos, generándose aproximadamente 400.000 cada año. Constituye habitualmente una de las causas destacadas de diagnóstico de admisión en los EE.UU. Recientes 15 avances en la gestión de las enfermedades cardíacas agudas, incluyendo el infarto de miocardio agudo, dan como resultado una expansión de la población de pacientes que desarrollarán finalmente fallo cardíaco crónico.

La actual terapia para el fallo cardíaco va inicialmente dirigida a utilizar inhibidores de enzima convertidor de angiotensina (ACE) y diuréticos. Además de prolongar la supervivencia en la regulación del fallo cardíaco, los inhibidores 20 ACE parecen reducir el avance hacia el estadio final del fallo cardíaco y un elevado número de pacientes relacionados con inhibidores ACE presentan fallo cardíaco funcional de clase III. Además, los inhibidores ACE parecen consistentemente incapaces de aliviar los síntomas en más del 60% de los paciente de fallo cardíaco y reducen la mortalidad del fallo cardíaco tan solo entre aproximadamente el 15 y el 20%. El transplante de corazón queda limitado por la disponibilidad de donantes de corazones. Además, con excepción de la digoxina, la administración crónica de agentes 25 inotrópicos positivos no se ha traducido en un fármaco útil exento de efectos adversos nocivos. Estas deficiencias en la actual terapia sugieren la necesidad de planteamientos terapéuticos adicionales.

Una amplia recopilación de datos sugiere que la hipertrofia patológica del músculo cardíaco en la regulación del fallo cardíaco puede resultar perjudicial, caracterizada por la dilatación de la cámara ventricular, un incremento en 30 la tensión/estrés, un incremento en la longitud frente a la amplitud de las células del músculo cardíaco, acompañado de un descenso en el comportamiento y en la función cardíaca. Los estudios han demostrado que la activación de la hipertrofia fisiológica o compensadora puede resultar beneficiosa en la regulación del fallo cardíaco. De hecho, se ha dado a entender que los efectos de los inhibidores ACE no tan solo descargan al corazón, son que también inhiben la respuesta hipertrófica patológica, la cual se ha presumido estar unida al sistema renina-angiotensina localizado dentro 35 del miocardio.

A nivel de biología molecular, el corazón funciona como un sincitio de miocitos y de células soporte que lo rodean, denominadas no miocitos. Si bien los no miocitos son inicialmente células fibroblasto/mesenquimales, entre 40 las mismas se incluyen también células endoteliales y de musculatura lisa. Ciertamente, si bien los miocitos componen la mayor parte de la masa del miocardio del adulto, los mismos representan tan solo aproximadamente el 30% del número total de células presentes en el corazón. Debido a su estrecha relación con los miocitos cardíacos *in vivo*, los no miocitos son capaces de influenciar el crecimiento y/o el desarrollo de los miocitos. Esta interacción puede ser directamente mediada a través de contacto célula-célula o, indirectamente, a través de la producción de un factor paracrino. La citada asociación *in vivo* resulta importante, dado que tanto el número de no miocitos como la matriz 45 extracelular con la cual interactúan se incrementan durante la hipertrofia de miocardio y como resultado de respuesta a lesión e infarto. Estos cambios se asocian con la función de miocardio anormal.

Los miocitos cardíacos resultan incapaces de dividirse poco después de del nacimiento. A través de la hipertrofia de las células individuales se genera un crecimiento adicional. Se han desarrollado modelos de cultivo celular de 50 hipertrofia de miocito, con la finalidad de comprender mejor los mecanismos para la hipertrofia de los miocitos cardíacos. Simpson *et al.*, *Circ. Res.*, 51: 787-801 (1982); Chien *et al.*, *FASEB J.*, 5: 3037-3046 (1991). La mayor parte de los estudios de miocitos cardíacos en cultivo han sido diseñados para minimizar la contaminación por parte de no miocitos. Ver, por ejemplo, Simpson and Savion, *Cir. Cres.*, 50: 101-116 (1982); Libby, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 16: 803-811 (1984); Iwaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 13809-13817 (1990).

55 Shubaita *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 265: 20555-20562 (1990) documentaron la utilidad de un modelo de cultivo para identificar factores de crecimiento derivados de péptidos, tales como endotelina-1, los cuales pueden activar una respuesta hipertrófica. Long *et al.*, *Cell Regulation*, 2: 1081-1095 (1991) investigaron el efecto de los no miocitos cardíacos sobre el crecimiento de miocitos cardíacos en cultivo. El crecimiento hipertrófico de miocitos fue estimulado en cultivos de elevada densidad con números de no miocitos incrementados y en co-cultivos con números incrementados de no miocitos. Este efecto de los no miocitos sobre el tamaño de los miocitos podía ser reproducido mediante un medio exento de suero, acondicionado para cultivos de no miocitos. La principal actividad favorecedora del crecimiento de miocitos en los cultivos era la unión a heparina. Las propiedades de este factor de crecimiento fueron comparadas con diversos factores de crecimiento conocidos por estar presentes en el miocardio, incluyendo el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor alfa de crecimiento tumoral (TNF- $\alpha$ ), y el factor de crecimiento transformante beta 1(TGF- $\beta$ 1). Se averiguó que el factor de crecimiento de Long *et al.*, resultó ser mayor que estos otros factores de crecimiento y presentaba un perfil de elución heparina-Sepharose diferente al de la totalidad de estos factores de crecimiento, con la excepción del PDGF. Además, el mismo no resulta-

# ES 2 276 393 T3

ba neutralizado por un anticuerpo específico para PDGF. Los autores propusieron que el mismo define una importante relación paracrina para el crecimiento y desarrollo de las células del músculo cardíaco.

No tan solo existe una necesidad de disponer de una mejora en la terapia del fallo cardíaco, tal como el fallo cardíaco congestivo, sino que existe también la necesidad de ofrecer tratamientos eficaces para trastornos neurológicos. Los factores neurotróficos, tales como los factores de crecimiento de insulina, el factor de crecimiento nervioso, el factor neurotrófico derivado del cerebro, la neurotrofina-3, la neurotrofina-4 y la neurotrofina-5, y el factor neurotrófico ciliar han sido propuestos como medios potenciales para reforzar la supervivencia de neuronas, por ejemplo, como tratamiento para enfermedades neurodegenerativas, tales como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer, el ictus, la epilepsia, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la neuropatía periférica. Resultaría deseable proporcionar una terapia adicional para este propósito.

Por consiguiente, constituye un objetivo de la presente invención el de proporcionar una terapia mejorada para la prevención y/o el tratamiento del fallo cardíaco, tal como el fallo cardíaco congestivo, particularmente la promoción de formas fisiológicas de hipertrofia o de inhibición de formas patológicas de hipertrofia y para la prevención y/o el tratamiento de trastornos neurológicos tales como la neuropatía periférica.

Constituye otro objetivo el de identificar un nuevo grupo de polipéptidos de factor hipertrófico cardíaco y de sus antagonistas, para su utilización en las citadas terapias.

Constituye todavía otro objetivo el de proporcionar ácido nucleico que codifique para los citados polipéptidos y la utilización del citado ácido nucleico en la producción de polipéptidos en cultivos celulares recombinantes.

Constituye todavía otro objetivo el de proporcionar derivados y formas modificadas de los citados polipéptidos, incluyendo variantes de secuencia de aminoácidos y sus derivados covalentes.

Constituye un objetivo adicional la preparación de inmunogenes para obtener anticuerpos frente a los citados polipéptidos, al igual que para obtener anticuerpos capaces de unirse a los mismos.

Constituye todavía otro objetivo el de proporcionar un nuevo ensayo de hipertrofia que puede ser utilizado, por ejemplo, en clonado por expresión y en la purificación de los citados polipéptidos, en la evaluación de los clones aislados a partir del clonado por expresión y en una identificación de antagonistas de los citados polipéptidos.

Estos y otros objetivos de la invención resultarán evidentes para los expertos en la materia habituales, tras la consideración de este documento en su totalidad.

## Resumen de la invención

Se ha desarrollado un ensayo de hipertrofia de corazón de rata recién nacida *in vitro*, que permite el clonado por expresión y la purificación proteínica del factor de hipertrofia cardíaca (CHF) descrito en el presente documento. La capacidad del ensayo de 1.000 muestras únicas por semana acoplada con el requisito de tamaño de muestra pequeño de 100  $\mu$ L o inferior ha permitido la clonación por expresión y la purificación proteínica que hubiera resultado imposible de obtener utilizando los procedimientos publicados actualmente. Por lo tanto, en una realización, la invención proporciona un procedimiento para someter a ensayo una muestra de prueba para actividad hipertrófica, que comprende:

- a) colocar en placas de 96 pocillos una suspensión de miocitos, a una densidad de aproximadamente  $7,5 \times 10^4$  células por mL, en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM)/F-12, medio que comprende insulina, transferrina y aprotinina;
- 50       (b) cultivar las células;
- (c) añadir la muestra de prueba (tal como una acerca de la cual se sospecha contiene un CHF) a las células cultivadas;
- 55       (d) cultivar las células con las muestras de prueba; y
- (e) determinar si las muestras de prueba presentan actividad hipertrófica.

Además del ensayo, la invención proporciona un polipéptido factor de hipertrofia cardíaca (CHF) aislado, excluyendo el de rata, que comparte al menos el 75% de identidad de secuencia con la secuencia traducida mostrada en la Figura 1 y que muestra una actividad biológica de actividad hipertrófica, inotrópica, anti-arrítmica o neurotrófica de un polipéptido CHF de origen natural.

Adicionalmente, el polipéptido CHF puede ser seleccionado a partir de un grupo que comprende el polipéptido que es aislado a partir de un mamífero, el polipéptido que se obtiene mediante medios recombinantes y el polipéptido que se obtiene a través de medios sintéticos. Además, el polipéptido CHF puede ser seleccionado de entre el grupo que comprende el polipéptido que es humano y el polipéptido que es no inmunógeno en humanos.

# ES 2 276 393 T3

En un aspecto adicional, el polipéptido es el CHF humano maduro que tiene la secuencia CHF traducida mostrada en la Figura 5.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo aislado que resulta capaz de unirse al CHF y un procedimiento para detectar CHF *in vitro* o *in vivo*, que comprende la puesta en contacto del anticuerpo con una muestra o células acerca de la cual se tenga la sospecha de contener CHF y detectar si ha tenido lugar la unión, tal como ocurre con ELISA. El anticuerpo puede comprender anticuerpos monoclonales, quiméricos, humanizados, bi-específicos o un fragmento de los mismos que puede unirse a un antígeno.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para purificar CHF que comprende hacer pasar una mezcla de CHF sobre una columna a la cual se unen los anticuerpos y recuperar la fracción que contiene CHF.

En otros aspectos, la invención comprende una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para CHF, un vector que comprende la molécula de ácido nucleico, preferiblemente un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico unida de forma operativa a secuencias control reconocidas por una célula huésped transformada por el vector, una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico, incluyendo células huésped de mamífero y bacterianas y un procedimiento para la utilización de una molécula de ácido nucleico que codifica para CHF para efectuar la producción de CHF, que comprende el cultivo de una célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico. Preferiblemente, la célula huésped es transfectada para expresar el ácido nucleico CHF y el CHF es recuperado a partir del cultivo de célula huésped y, si es secretado, recuperado a partir el medio de cultivo.

En aspectos adicionales, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la secuencia de ácido nucleico de marco de lectura abierto mostrada en la Figura 1 ó en la Figura 5.

En todavía otro aspecto, se proporciona un procedimiento de determinación de la presencia de un ácido nucleico CHF en una muestra de prueba, que comprende la puesta en contacto de la molécula de ácido nucleico CHF con la muestra de prueba y determinar si ha tenido lugar hibridación o que comprende hibridar la molécula de ácido nucleico CHF a un ácido nucleico de muestra de prueba y determinar la presencia de ácido nucleico CHF.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para amplificar una muestra de prueba de ácido nucleico, que comprende cebar una reacción en cadena de polimerasa de ácido nucleico en la muestra de prueba con la molécula de ácido nucleico CHF.

La invención proporciona también la utilización de un polipéptido CHF en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico, fallo cardíaco o un trastorno arrítmico o inotrópico.

## Breve descripción de los gráficos

Las Figuras 1A y 1B muestran la secuencia de nucleótidos (hebras sentido y antisentido) (SEQ ID NOS: 1 y 2) y la secuencia de aminoácido deducida (SEQ ID NO: 3) de un clon DNA CHF de ratón. Los nucleótidos complementarios subrayados en la posición 27 muestran el inicio de otro clon CHF de ratón, utilizado para obtener el clon de longitud completa.

La Figura 2 alinea la secuencia de aminoácido traducida del clon CHF de ratón (chf. 781) (SEQ ID NO:3) con la secuencia de aminoácido del factor neurotrófico ciliar humano (humcntf) (SEQ ID NO: 4), para mostrar la extensión de identidad de secuencia.

La Figura 3 muestra una gráfica de liberación de péptido natriurético atrial (ANP) para fenilefrina (curva habitual) y transfecciones en células 293 en un ensayo de hipertrofia cardíaca en recién nacido.

La Figura 4 muestra una gráfica de supervivencia de neuronas ganglionares ciliares vivas (medidas mediante contejo celular) en función de o bien del factor neurotrófico ciliar (CNTF) habitual (en ng/mL) o del medio acondicionado 293 transfectado (en fracción de volumen de ensayo), utilizando un habitual CNTF (círculos), medio procedente de un control de transfección de DNA CHF de células 293 (triángulos), y medio procedente de una transfección de DNA control de células 293 (cuadrados).

Las Figuras 5A y 5B muestran la secuencia de nucleótidos (hebras sentido y antisentido) (SEQ ID NOS: 6 y 7) y secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 8) de un clon DNA CHF humano.

La Figura 6 alinea la secuencia de aminoácidos traducida del clon CHF humano (humct 1) (SEQ ID NO: 8) con la secuencia de aminoácido traducida del clon CHF humano (chf.781) (SEQ ID NO: 3), para mostrar la extensión de la identidad de secuencia.

**Descripción detallada de las realizaciones preferidas****I. Definiciones**

5 En general, las siguientes palabras o frases tienen la definición indicada cuando son utilizadas en la descripción, ejemplos y reivindicaciones:

10 “CHF” (o “factor de hipertrofia cardíaca” o “cardiotrofina” o “cardiotrofina-1”) se define en el presente documento como cualquier secuencia de polipéptido que posee al menos una propiedad biológica (tal y como se define más adelante) de un polipéptido de origen natural que comprende la secuencia de polipéptido de la Figura 1 o su equivalente humano mostrado en la Figura 5. No incluye el homólogo de rata de CHF, a saber, el CHF procedente de la especie rata. Esta definición abarca no tan solo el polipéptido aislado a partir de la fuente de CHF de origen natural, tal como los cuerpos embrioides murinos descritos en el presente documento, sino también el polipéptido preparado mediante procedimientos sintéticos recombinantes. El mismo incluye también formas variantes, incluyendo derivados funcionales, alelos, isoformas y sus análogos.

15 Un “fragmento CHF” es una parte de una secuencia de CHF de longitud completa, madura, de origen natural, que tiene uno o más restos aminoácido o unidades carbohidrato suprimidas. El (los) resto(s) aminoácido suprimido(s) puede corresponder a cualquier parte del polipéptido, incluyendo ya sea el extremo N-terminal o C-terminal o internamente. El fragmento compartirá al menos una propiedad biológica con el CHF. Los fragmentos CHF tendrán habitualmente una secuencia consecutiva de al menos 10, 15, 20, 25, 30 ó 40 restos de aminoácido idénticas a las secuencias del CHF aislado a partir de un mamífero, incluyendo el CHF aislado a partir de cuerpos embrioides murinos o CHF humano.

20 25 “Variantes CHF” o “variantes de secuencia CHF”, tal y como se definen en el presente documento, significan CHFs biológicamente activos tal y como se definen más adelante, que tienen menos del 100% de identidad de secuencia con el CHF aislado a partir de cultivos celulares recombinantes o a partir de cuerpos embrioides murinos que tienen la secuencia deducida descrita en la Figura 1 o con el equivalente humano descrito en la Figura 5. Ordinariamente, una variante CHF biológicamente activo tendrá una secuencia de aminoácido que tiene al menos aproximadamente el 70% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el CHF aislado a partir de cuerpos embrioides murinos o con el CHF humano maduro (ver Figuras 1 y 5), preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente el 85%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente el 95%.

30 35 Un “CHF químérico” es un polipéptido que comprende CHF de cadena completa o uno o más fragmentos del mismo fusionados o unidos a una segunda proteína o a uno o más fragmentos de la misma. La quimera compartirá al menos una propiedad biológica con el CHF. La segunda proteína será habitualmente una citoquina, un factor de crecimiento o una hormona, tal como la hormona del crecimiento, IGF-I, o un factor neurotrófico tal como CNTF, un factor de crecimiento nervioso (NGF), un factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofin-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), neurotrofina-5 (NT-5), etc.

40 45 Los términos “CHF aislado”, “CHF altamente purificado” y “CHF sustancialmente homogéneo” se utilizan de forma intercambiable y significan un CHF que ha sido purificado a partir de una fuente de CHF o que ha sido preparado por medio de procedimientos recombinantes o sintéticos y que está lo suficientemente exento de otros péptidos o proteínas (1) como para obtener al menos 15 y preferiblemente 20 restos de aminoácido de la secuencia N-terminal o de una secuencia interna de aminoácido, mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria o el mejor secuenciador de aminoácidos disponible en el mercado o modificado por medio de los procedimientos publicados a partir de la fecha de depósito de esta solicitud o (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE, bajo condiciones no reductoras o condiciones reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, teñido con plata. Homogeneidad en el presente documento significa menos de aproximadamente el 5% de contaminación con proteínas de otra fuente.

50 55 “Propiedad biológica”, cuando se utiliza en conjunción con o bien “CHF” o “CHF aislado”, significa que tiene actividad miocardiotorífica, inotrópica, anti-arrítmica, o neurotrófica o que tiene una función anfígena o efectora *in vivo* o una actividad provocada directa o indirectamente por un CHF (ya sea en su conformación de estado natural o desnaturalizado) o uno de sus fragmentos. Entre las funciones efectoras se incluyen la unión a receptor y cualquier actividad de unión a soporte, agonismo o antagonismo de CHF, en especial la transducción de una señal proliferadota, incluyendo la replicación, la función reguladora de DNA, la modulación de la actividad biológica de otros factores e crecimiento, activación de receptores, desactivación, sobre o baja regulación, crecimiento celular o diferenciación celular, y similares. No obstante, entre las funciones efectoras no se incluye la posesión de un punto epítope o antígeno que es capaz de reaccionar de forma cruzada con anticuerpos generados frente a CHF de origen natural.

60 Una “función antigénica” significa posesión de un punto antígeno o epítope que es capaz de reaccionar de forma cruzada con anticuerpos generados frente a CHF de origen natural, cuya secuencia se muestra en la Figura 1, u otro CHF de mamífero de origen natural, incluyendo el homólogo humano cuya secuencia se muestra en la Figura 5. La principal función antigénica de un polipéptido CHF es la de que el mismo se une, con una afinidad de al menos aproximadamente  $10^6$  L/mol, a un anticuerpo generado frente a CHF aislado a partir de cuerpos embrioides

de ratón o de uno de sus homólogos humanos. Ordinariamente, el polipéptido se une con una afinidad de al menos aproximadamente  $10^7$  L/mol. Muy preferiblemente, el polipéptido CHF antigenicamente activo es un polipéptido que se une a un anticuerpo generado frente a CHF que tiene una de las funciones efectoras descritas anteriormente. Los anticuerpos utilizados para definir la expresión “actividad biológica” son anticuerpos policlonales de conejo generados mediante formulación del CHF aislado a partir de cultivo celular recombinante o de cuerpos embrioides en adyuvante completo de Freund, inyectando la formulación de forma subcutánea y fomentando la respuesta inmune a través de inyección intraperitoneal de la formulación hasta que la concentración del anticuerpo anti CHF se estabiliza.

El término “biológicamente activo”, cuando se utiliza en conjunción con o bien “CHF” o “CHF aislado” significa un polipéptido CHF que muestra actividad hipertrófica, inotrópica, anti-arrítmica o neurotrófica o que comparte una función efectora de CHF aislado a partir de cuerpos embrioides murinos o producido mediante el cultivo celular recombinante descrito en el presente documento y que puede (aunque no necesariamente), además, poseer una función antigénica. Una función efectora principal del CHF o del polipéptido CHF en el presente documento es la de influenciar el crecimiento cardíaco o la actividad hipertrófica, medida, por ejemplo, por medio de la liberación de péptido natriurético atrial (ANP) o mediante ensayo de hipertrofia de miocito descrito en el presente documento utilizando un medio de placas y de densidad de placas específico y, preferiblemente, utilizando tinte de violeta cristal para la lectura. La función deseada de un CHF (o de un antagonista de CHF) es la de incrementar las formas fisiológicas (beneficiosas) de hipertrofia y disminuir la hipertrofia patológica. Además, se espera que en el presente documento el CHF muestre una función anti-arrítmica, mediante la promoción de un fenotipo electrofisiológico más normal. Otra función efectora principal de CHF o de polipéptido CHF en presente documento es la de estimular la proliferación de neuronas ganglionares filiales de pollito en un ensayo para determinar la actividad de CNTF.

El CHF antigenicamente activo se define como un polipéptido que posee una función antigénica de CHF o que puede (aunque no necesariamente) poseer además una función efectora.

En realizaciones preferidas, el CHF antigenicamente activo es un polipéptido que se une, con una afinidad de al menos aproximadamente  $10^6$  L/mol, a un anticuerpo que es capaz de unirse a CHF. Ordinariamente, el polipéptido se une con una afinidad de al menos aproximadamente  $10^7$  L/mol. El anticuerpo aislado que es capaz de unirse al CHF es un anticuerpo que es identificado y separado a partir de un componente del entorno natural en el cual el mismo puede estar presente. Muy preferiblemente, el CHF antigenicamente activo es un polipéptido que se une a un anticuerpo capaz de unirse a CHF en su conformación de origen natural. El CHF en su conformación de origen natural es CHF tal y como se encuentra en la naturaleza, que no ha sido desnaturalizado por medio de agentes caotrópicos, calor, u otros tratamientos los cuales pueden modificar sustancialmente la estructura tridimensional del CHF, según determinación efectuada, por ejemplo, por medio de migración sobre geles de filtración no reductores, no desnaturalizantes. El anticuerpo utilizado en esta determinación es anticuerpo políclonal de conejo, generado mediante la formulación de CHF de origen natural procedente de especies no conejo en adyuvante completo de Freund, inyectando de forma subcutánea la formulación y ampliando la respuesta inmune por medio de inyección intraperitoneal de la formulación, hasta que la concentración de anticuerpo anti-CHF se estabiliza.

El término “porcentaje de identidad de secuencia de aminoácido”, en relación con la secuencia CHF, se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los restos en la secuencia de CHF aislada a partir de cuerpos embrioides murinos que presentan la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la Figura 1 o la secuencia de aminoácidos de CHF humano descrita en la Figura 5, después de alinear las secuencias y de introducir espacios, si resulta necesario, para alcanzar el máximo porcentaje de identidad de secuencia, sin considerar ninguna sustitución conservadora como formando parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las inserciones, supresiones o extensiones internas, N-terminal o C-terminal, en la secuencia de CHF será considerada como que afecta a la identidad o a la homología de la secuencia. Así pues, entre los ejemplos de polipéptidos CHF biológicamente activos, acerca de los cuales se considera que poseen secuencias idénticas, se incluyen pre-CHF, pro-CHF y CHF maduro.

El “microsecuenciado de CHF” puede ser logrado por medio de cualquier procedimiento habitual, siempre y cuando el procedimiento resulte lo suficientemente sensible. En uno de los citados procedimientos, polipéptido altamente purificado obtenido a partir de geles SDS o a partir del paso final de HPLC, es secuenciado directamente por medio de degradación Edman automatizada (isotiocianato de fenilo), utilizando un modelo de secuenciador Applied Biosystems fase gaseosa 470A, equipado con un analizador de aminoácido feniltiohidantoina (PTH) 120A. Adicionalmente, fragmentos de CHF preparados por medio de digestión química (por ejemplo, CNBr, hidroxilamina, o 2-nitro-5-tiocianobenzoato) o digestión enzimática (por ejemplo, tripsina, clostripain o estafilococo proteasas), seguido de purificación de los fragmentos (por ejemplo, HPLC), puede ser secuenciada de forma similar. Los aminoácidos PTH son analizados utilizando el sistema de datos ChromPerfect™ (Justice Innovations, Palo Alto, CA). La interpretación secuencial es llevada a cabo sobre una computadora VAX 11/785 Digital Equipment Co, tal y como describe Henzel *et al.*, *J. Chromatography*, 404: 41-52 (1987). Opcionalmente, alícuotas de fracciones de HPLC pueden ser sometidas a electroforesis sobre SDS-PAGE entre 5-20%, eletrotransferidas a una membrana PVDF (ProBlott, AIB, Foster City, CA) y teñidas con Azul de Coomassie brillante. Matsurdiara, *J. Biol. Chem.*, 262: 10035-10038 (1987). Una proteína específica identificada por medio del teñido es eliminada de la mancha y se lleva a cabo el secuenciado N-terminal con el secuenciador en fase gaseosa descrito anteriormente. Para secuencias de proteínas internas, las fracciones HPLC son secadas en condiciones de vacío (SpeedVac), re-suspendidas en tampones adecuados y digeridas con bromuro cianógeno, el enzima Lys-C específico de Lys (Wako Chemicals, Richmond, VA) o Asp-N (Boehringer Manheim, Indianápolis, IN). Después de la digestión, los péptidos resultantes son secuenciados en forma de mezcla o después

# ES 2 276 393 T3

de resolución mediante HPLC sobre una columna C4 revelada con un gradiente de propanol en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, con anterioridad al secuenciado en fase gaseosa.

5        “Ácido nucleico CHF aislado” es RNA o DNA que contiene más de 16 y preferiblemente 20 o más bases de nucleotido secuenciales que codifican para CHF biológicamente activo o para uno de sus fragmentos, es complementario al RNA o DNA o hibrida con el RNA o DNA y permanece unido de forma estable en condiciones entre moderadas y severas. Este RNA o DNA esta exento de al menos un ácido nucleico fuente contaminante con el cual está normalmente asociado en la fuente de origen natural y, preferiblemente, sustancialmente exento de cualquier otro RNA o DNA de mamífero. La frase “exento de al menos un ácido nucleico fuente contaminante con el cual está normalmente asociado” incluye el caso en el que el ácido nucleico está presente en la fuente o célula natural pero se encuentra en una ubicación cromosómica distinta o se encuentra, por el contrario, flanqueado por secuencias de ácido nucleico no encontradas habitualmente en la célula fuente. Un ejemplo de ácido nucleico CHF aislado es RNA o DNA que codifica para un CHF biológicamente activo compartiendo al menos el 75%, o más preferiblemente al menos el 80%, todavía más preferiblemente al menos el 85%, incluso más preferiblemente el 90% y, muy preferiblemente, el 95% de identidad de secuencia con el CHF murino o con el CHF humano.

10      Por “secuencias control”, cuando se refieren a expresión, se entiende secuencias de DNA necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias control que resultan adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un favorecedor, opcionalmente una secuencia operadora, un punto de unión a ribosoma y, posiblemente, otras secuencias todavía escasamente comprendidas. Se tiene conocimiento de que las células eucariotas utilizan favorecedores, señales de poliadenilación y reforzadores.

15      Por “operativamente unido”, cuando se hace referencia a ácidos nucleicos, significa que los ácidos nucleicos son colocados en relación funcional con otras secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA para una presecuencia o un líder secretor está operativamente unido a DNA para un polipéptido si el mismo es expresado como proproteína que participa en la secreción del polipéptido; un favorecedor o reforzador está unido operativamente a una secuencia de codificación si el mismo afecta a la transcripción de la secuencia; o un punto de unión a ribosoma esta operativamente unido a una secuencia de codificación si el mismo está posicionado con vistas a facilitar la traducción. Por regla general, “operativamente unido” significa que las secuencias de DNA que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. No obstante, los reforzadores no tienen porqué ser contiguos. La unión se logra mediante ligado en los puntos de restricción adecuados. Si los citados puntos no existen, los elementos adaptadores io de unión oligonucleótidos sintéticos, según práctica convencional.

20      El término “exógeno”, cuando se refiere a un elemento, hace referencia a una secuencias de ácido nucleico que resulta extraña a la célula u homóloga a la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la cual el elemento no es encontrado habitualmente.

25      Los términos “célula”, “línea celular” y “cultivo celular” se utilizan d forma intercambiable en el presente documento y entre las citadas designaciones se incluyen la totalidad de progenie de una célula o línea celular. Así pues, por ejemplo, términos tales como “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula sujeto principal y los cultivos derivados del mismo, con independencia del número de transferencias. Se da también por entendido que la totalidad de la progenie puede no resultar precisamente idéntica en contenido de DNA, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que desempeña la misma función o actividad biológica según cribado para la célula originalmente transformada. Cuando se pretenden distintas designaciones, ello quedará claro a partir del contexto.

30      Los “plásmidos” son moléculas de DNA circulares, replicantes de forma autónoma que poseen orígenes independientes de replicación y que son designados, en el presente documento, por medio de la letra minúscula “p” precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida en el presente documento se encuentran o bien disponibles en el comercio, sin ningún tipo de restricción, o pueden ser construidos a partir de plásmidos disponibles, según los procedimientos publicados. Además, en el estado de la técnica se tiene conocimiento de otros plásmidos equivalentes y los mismos resultarán evidentes para el experto en la materia ordinario.

35      “Digestión por enzima de restricción”, cuando se hace referencia a DNA, significa la rotura catalítica de enlaces fosfodiester internos de DNA, por parte de un enzima que actúa únicamente en ciertas localizaciones o puntos en la secuencia de DNA. Los citados enzimas son denominados “endonucleasas de restricción”. Cada una de las endonucleasas de restricción reconoce una secuencia de DNA específica, denominada “punto de restricción”, el cual muestra una simetría doble. Los diversos enzimas de restricción utilizados en el presente caso se encuentran disponibles comercialmente y se utilizan sus requisitos de reacción, cofactores y otros, son establecidos por los suministradores.

40      Los enzimas de restricción son habitualmente diseñados por medio de abreviaturas compuestas de una letra mayúscula seguida de otras letras que representan al microorganismo a partir del cual se obtuvieron originalmente cada uno de los enzimas de restricción, y después de un número que designa al enzima en particular. En general, se utiliza aproximadamente 1 µg de plásmido o de fragmento de DNA con aproximadamente 1-2 unidades de enzima, en aproximadamente 20 µL de solución tampón. Los tampones adecuados y las cantidades de sustrato para los enzimas de restricción en particular son especificados por el fabricante. Habitualmente se utiliza una incubación durante un período aproximado de 1 hora a 37°C, pero puede variar en función de las instrucciones del fabricante. Después de la incubación, se elimina la proteína o el polipéptido mediante extracción con fenol y cloroformo y el ácido nucleico

## ES 2 276 393 T3

digerido es recuperado a partir de la fracción acuosa mediante precipitación con etanol. La digestión con un enzima de restricción puede ir seguida de hidrólisis con fosfatasa alcalina bacteriana de los fosfatos 5'-terminales, con vistas a evitar que los dos extremos rotos por la restricción de un fragmento de DNA "circulen" o formen un bucle cerrado que pudiera impedir la inserción de otro fragmento de DNA en el punto de restricción. Salvo que se indique lo contrario, la digestión de plásmidos no va seguida de desfosforilación 5'-terminal. Los procedimientos y reactivos para la desfosforilación son convencionales, tal y como se describe en las secciones 1.56-1.61 de Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

"Recuperación" o "aislamiento" de un determinado fragmento de DNA a partir de una digestión de restricción significa separación del digerido sobre gel de poliacrilamida o de agarosa por medio de electroforesis, identificación del fragmento de interés por medio de comparación de su movilidad frente a la de los fragmentos de DNA marcadores de peso molecular conocido, eliminación de la sección de gel que contiene el fragmento deseado y separación del gel a partir de DNA. Este procedimiento es generalmente conocido. Por ejemplo, ver Lawn *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9: 6103-6114 (1981) y Goeddel *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980).

"Análisis de Southern" o "hibridación de Southern" es un procedimiento a través el cual la presencia de secuencias de DNA en un digerido de endonucleasa de restricción o de una composición que contiene DNA es confirmada mediante hibridación con un oligonucleótido marcado o con un fragmento de DNA conocidos. El análisis de Southern conlleva habitualmente la separación electroforética de digeridos de DNA sobre geles de agarosa, la desnaturización del DNA después de separación electroforética y la transferencia del DNA a un soporte de nitrocelulosa, nylon o a otro soporte en membrana adecuado, para análisis con un sonda marcada con enzima, biotinilada o radio-marcada, tal y como se describe en las secciones 9.37-9.52 de Sambrook *et al.*, *supra*.

"Análisis de Northern" o "hibridación de Northern" es un procedimiento utilizado para identificar secuencias de RNA que hibridan hacia una sonda conocida, tal como un oligonucleótido, un fragmento de DNA, cDNA o uno de sus fragmentos, o un fragmento de RNA. La sonda es marcada con un radio-isótopo tal como  $^{32}\text{P}$ , o por medio de biotinilación, o con un enzima. El RNA que tiene que ser analizado es habitualmente separado por medio de electroforesis sobre un gel de agarosa o de poliacrilamida, transferido a una membrana de nitrocelulosa, nylon o a otra membrana que resulte adecuada, y sometido a hibridación con la sonda, utilizando técnicas habitual que resultan bien conocidas en el estado de la técnica, como las descritas en las secciones 7.39-7.52 de Sambrook *et al.*, *supra*.

Se denomina "ligado" al proceso de formación de enlaces fosfodiester entre dos fragmentos de ácido nucleico. Para el ligado de los dos fragmentos, las terminaciones de los mismos deben ser compatibles las unas con las otras. En algunos casos, las terminaciones resultarán directamente compatibles después de digestión con endonucleasa. No obstante, puede resultar necesario convertir primeramente las terminaciones escalonadas habitualmente producidas después de la digestión con endonucleasa en extremos despuntados para hacerlos compatibles para el ligado. Para despuntar las terminaciones, el DNA es tratado con un tampón adecuado durante al menos un período de 15 minutos a 15°C, con aproximadamente 10 unidades de fragmento Klenow de DNA polimerasa I o de T4 DNA polimerasa, en presencia de los cuatro trifosfatos de desoxirribonucleótido. El DNA es entonces purificado por medio de extracción con fenolcloroformo y precipitación con etanol. Los fragmentos de DNA que tienen que ser ligados conjuntamente son colocados en solución en cantidades aproximadamente equimolares. La solución contendrá también ATP, tampón ligasa y una ligasa tal como T4 DNA ligasa aproximadamente 10 unidades por 0,5 µg de DNA. Si el DNA tiene que ser ligado a un vector, el vector es primeramente linearizado por medio de digestión con la(s) endonuclasa(s) de restricción adecuada(s). El fragmento linearizado es después tratado con fosfatasa alcalina bacteriana o con fosfatasa intestinal de ternera para evitar el auto-ligado durante el paso de ligado.

"Preparación" de DNA a partir de células significa aislar el DNA plásmido a partir de un cultivo de células huésped. Los procedimientos utilizados habitualmente para la preparación de DNA son las preparaciones de plásmido a pequeña y gran escala descritas en las secciones 1.25-1.33 de Sambrook *et al.*, *supra*. Después de la preparación del DNA, el mismo puede ser purificado a través de procedimientos bien conocidos en el estado de la técnica, tales como los descritos en la sección 1.40 de Sambrook *et al.*, *supra*.

Los "oligonucleótidos" son polidesoxinucleótidos de hebra única o doble, corta, de longitud corta, los cuales son sintetizados químicamente a través de procedimientos conocidos, tales como los de la química de fosfodiésteres, fosfitos o fosforamiditas, utilizando técnicas en fase sólida, tales como las descritas en EP 266.032, publicada el 4 de Mayo de 1988, o a través de intermedios desoxinucleósido H-fosfonato, tal y como se describe por parte de Froehler *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 14: 5399-5407 (1986). Procedimientos adicionales incluyen la reacción en cadena de la polimerasa, definida más adelante y otros procedimientos autocebadores y de síntesis de oligonucleótidos sobre soportes sólidos. La totalidad de estos procedimientos se describen por parte de Engels *et al.*, *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28: 716-734 (1989). Estos procedimientos son utilizados si la secuencia completa de ácido nucleico del gen es conocida, o si la secuencia de ácido nucleico complementaria a la de la hebra de codificación esta disponible. Alternativamente, si la secuencia de aminoácido objetivo es conocida, uno puede inferir secuencias de ácido nucleico potenciales utilizando restos de codificación preferidos para cada uno de los restos aminoácido. Los oligonucleótidos son después purificados sobre geles de poliacrilamida.

La "reacción en cadena de la polimerasa" o "PCR" hace referencia a un procedimiento o técnica en la cual cantidades pequeñas de ácido nucleico, RNA y/o DNA, son amplificadas, tal y como se describe en la patente USA N°. 4.683.195, concedida el 28 de julio de 1987. Generalmente, la información de secuencia procedente de las termina-

ciones de la región de interés o más allá, necesita estar disponible, de tal forma que los cebadores de oligonucleótido puedan ser diseñados; estos cebadores serán idénticos o similares en secuencia a las hebras contrarias de la plantilla que tiene que ser amplificada. Los nucleótidos 5'-terminales de los dos cebadores pueden coincidir con las terminaciones del material amplificado. La PCR puede ser utilizada para amplificar secuencias de RNA específicas, secuencias

- 5 de DNA específicas procedentes de DNA genómico total, y cDNA transcrita a partir de RNA celular, bacteriófagos o secuencias de plásmido, etc. Ver generalmente Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed. *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989). Tal y como se utiliza en el presente documento, la PCR se considera uno, pero no el único, ejemplo de un procedimiento de reacción de polimerasa de ácido nucleico para amplificar una muestra prueba de ácido nucleico, que comprende la utilización de un ácido nucleico conocido, tal como 10 un cebador, y una polimerasa de ácido nucleico, para amplificar o generar una pieza específica de ácido nucleico.

“Condiciones severas” son aquellas que (1) utilizan baja concentración fónica y elevada temperatura par el lavado, por ejemplo, NaCl 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/NaDODSO<sub>4</sub> (SDS) 0,1% a 50°C, o (2) utilizan, durante la hibridación, un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (vol/vol) con sueroalbúmina 15 bovina 0,1%/Ficoll 0,1%/polivinilpirrolidona 1%/tampón fosfato sódico 50 mM, a pH 6,5, con NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM, a 42°C. Otro ejemplo lo constituye la utilización de formamida 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1%, 5 x solución de Denhardt, DNA de esperma 20  
de salmón sonicatado (50 µg/mL), SDS 0,1%, y sulfato de dextrano al 10%, a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC y SDS 0,1%.

- 20 “Condiciones moderadamente severas” se describen en Sambrook *et al.*, *supra*, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, concentración iónica, y SDS 50%) menos severas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condición moderadamente severa es una condición tal como la incubación durante el transcurso de una noche a 37°C, en una solución que comprende: formamida 20%, 5 x SSC 25 (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano 10%, y 20 mg/mL de DNA de esperma de salmón desnaturizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a entre aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la concentración iónica, etc, en la forma que resulte necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

- 30 Los “anticuerpos” (Abs) e “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen la mismas características estructurales. Si bien los anticuerpos muestran especificidad hacia un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como moléculas de tipo anticuerpo las cuales carecen de especificidad para antígeno. Los polipéptidos de este último tipo son, por ejemplo, producidos a niveles bajos por medio del sistema linfático y a niveles más elevados por melanomas.

- 35 “Anticuerpos y inmunoglobulinas de origen natural” son habitualmente glicoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligera (L) idénticas y de dos cadenas pesadas (H). Cada una de las cadenas ligera está unida a una cadena pesada por medio de un enlace covalente disulfuro, mientras que el numero de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada una 40 de las cadenas ligera y pesadas tiene también puentes disulfuro entre las cadenas espaciados de forma regular. Cada una de las cadenas pesadas tiene en uno de los extremos un dominio variable (V<sub>H</sub>), seguido de un número de dominios constantes. Cada una de las cadenas ligera tiene un dominio variable en uno de los extremos (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en el otro; 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 45 considera que los restos aminoácido forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y de cadena pesada (Clothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 186: 651-663 [1985]; Novotny and Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 4592-4596 [1985]).

- 50 El término “variable” hace referencia al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensivamente en cuanto a la secuencia entre anticuerpos y son utilizadas en la unión y especificidad de cada uno de los anticuerpos particulares para su antígeno particular. No obstante, la variabilidad no está igualmente distribuida a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. La misma está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinadas complementariamente (CDRs) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de cadena pesada como en los de cadena ligera. Las partes altamente conservadas de los dominios variables son denominadas 55 marco (FR). Los dominios variables de cadenas ligera y pesadas de origen natural comprenden cada uno de ellos cuatro regiones FR, adoptando mayoritariamente una configuración de lámina β, conectada a través de tres CDRs, los cuales forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β. Las CDRs en cada una de las cadenas son mantenidos unidas, en estrecha proximidad por medio de regiones FR y, con las CDRs procedentes de la otra cadena, contribuyen a la formación del punto de unión al antígeno de los anticuerpos (ver Rabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, Nacional Institute of Health, Bethesda, MD [1991]). Los dominios constantes no están directamente involucrados en la unión de un anticuerpo con un antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

- 65 La digestión mediante papaina de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno de los cuales tiene un punto de unión a antígeno único y un fragmento residual “Fc”, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina genera un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, el cual presenta dos puntos de combinación con antígeno y resulta todavía capaz de reticularse con el antígeno.

“Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un reconocimiento completo de antígeno y de punto de unión. Esta región comprende un dímero de un dominio variable de cadena ligera y uno de cadena pesada, en asociación estrecha, no covalente. Es en esta configuración en la que estas tres CDRs de cada una de los dominios variables interaccionan para definir un punto de unión a antígeno sobre la superficie del dímero  $V_H$ - $V_L$ . Colectivamente, las seis 5 CDRs confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. No obstante, incluso un dominio variable sencillo (o la mitad de un Fv que comprende tan solo tres CDRs específicas para un antígeno) presenta la capacidad de reconocer y de unirse al antígeno, si bien con una afinidad inferior a la del punto de unión completo.

El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) 10 de la cadena pesada. Los fragmentos FAbs se diferencian de los fragmentos Fab por medio de la adición de unos pocos restos en el grupo carboxi terminal en el dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteinas procedentes de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el cual el (los) resto(s) cisteina de los dominios constantes soportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo  $F(ab')_2$  fueron originariamente producidos como pares de fragmentos Fab', los cuales presentan cisteinas bisagra entre ellos. 15 Resultan también conocidos otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) procedentes de cualquier especie vertebrada pueden ser asignadas a uno o dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias 20 de aminoácido de sus dominios constantes.

En función de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas pueden ser divididas adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-25 3, IgG-4 e IgA-1, e IgA-2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ , respectivamente. Las estructuras subunitarias y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre, de forma específica, anticuerpos monocionales sencillos (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) y composiciones de anticuerpo con especificidad poliepitopica. 30

El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, a saber, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, con la excepción de posibles mutaciones de origen natural, 35 las cuales pueden estar presentes en cantidades pequeñas. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (políclonales), las cuales incluyen habitualmente diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítopos), cada uno de los anticuerpos monoclonales es dirigido frente a un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de que los mismos son sintetizados a través de cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas.

40 Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos híbridos y recombinantes producidos juntando un dominio variable (incluyendo hipervariables) del anticuerpo anti-CHF con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos “humanizados”), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena procedente de una especie con una cadena procedente de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, con independencia del origen 45 o de la clase de inmunoglobulina o la designación de subclase, al igual que fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab,  $F(ab')_2$  y Fv), en tanto en cuanto los mismos exhiban la actividad biológica deseada. [Ver, por ejemplo, Cabilly, et al., patente USA n°. 4.816.567; Mage & Lamoyi, en *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 79-97 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)].

50 Así pues, el modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo, en el sentido de haber sido obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no tiene que ser construido como que requiere producción del anticuerpo por medio de ningún procedimiento en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que tienen que ser utilizados según la presente invención pueden ser obtenidos a través del procedimiento hibridoma descrito primeramente por Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975), o pueden ser preparados por medio de procedimientos de DNA recombinante (Cabilly et al., supra).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen anticuerpos “químicos” (inmunoglobulinas) en 60 las cuales una parte de la cadena pesada y/o de la cadena ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos que derivan de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es (son) idéntica(s) u homologa(s) a las secuencias correspondientes derivadas de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, al igual que fragmentos de los citados anticuerpos, siempre y cuando los mismos muestren la actividad biológica deseada (Casilly et al., supra; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 5851-6855 [1984]).

65 Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químicas específicas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab',  $F(ab')_2$  u otras subsecuencias unidas a antígeno de anticuerpos), las cuales contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en

las cuales restos procedentes de una región determinada complementariamente (CDR) del recipiente son sustituidos por restos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo que tienen la deseada especificidad, afinidad y capacidad. En algunos casos, restos marco Fv de la inmunoglobulina humana son sustituidos por restos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender

5 restos los cuales no son encontrados ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada e en las secuencias marco. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar y optimizar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad, o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de la inmunoglobulina no humana y la totalidad, o sustancialmente la totalidad de las regiones FR, son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales ver: Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Strut. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

10 15 “No inmunogénico en un humano” significa que tras contactar el polipéptido, en un soporte farmacéuticamente aceptable y en una cantidad terapéuticamente eficaz, con el tejido adecuado de un humano, no puede demostrarse ningún estado de sensibilidad o de resistencia al polipéptido tras la segunda administración del polipéptido, una vez transcurrido un período de latencia (por ejemplo de entre 8 a 14 días).

20 25 “Trastorno neurológico” se refiere a un trastorno de neuronas, incluyendo tanto neuronas periféricas como neuronas procedentes del sistema nervioso central. Entre los ejemplos de los citados trastornos se incluyen la totalidad de enfermedades neurodegenerativas, tales como neuropatías periféricas (motoras o sensoriales), esclerosis lateral amiotrófica (ALS), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ictus, enfermedad de Huntington, epilepsia, y enfermedades oftalmológicas, tales como las que involucran a la retina, por ejemplo, retinopatía diabética, distrofia retinica y la degeneración retinica provocada por osteopetrosis maligna infantil, lipofuscosis ceroide o colestasis, o provocada por fotodegeneración, traumatismo, axotomía, degeneración neurotoxi-excitadora o degeneración isquémica neuronal.

30 35 La “neuropatía periférica” hace referencia a un trastorno que afecta al sistema nervioso periférico, muy habitualmente manifestada como una combinación de disfunción neural autónoma o sensomotora, sensorial, o motora. La amplia variedad de morfologías mostradas por medio de neuropatías periféricas puede, cada una de ellas, ser atribuida únicamente a un igualmente amplio número de causas. Por ejemplo, las neuropatías periféricas pueden ser adquiridas genéticamente, pueden obedecer a una enfermedad sistémica, o pueden ser inducidas por un agente tóxico. Entre los ejemplos se incluyen, sin que ello suponga ninguna limitación, la neuropatía sensomotora distal, o las neuropatías autónomas, tales como la motilidad reducida del tracto gastrointestinal o la atonía de la vejiga urinaria. Entre los ejemplos de neuropatías asociadas con enfermedades sistémicas se incluyen el síndrome post-polio; entre los ejemplos de neuropatías hereditarias se incluyen la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth, la enfermedad de Refsum, la Abetalipoproteinemia, la enfermedad de Tangier, la enfermedad de Krabbe, la leucodistrofia metacromática, la enfermedad de Fabry, el síndrome de Dejerine-Sottas; y entre los ejemplos de neuropatías provocadas por un agente tóxico se incluyen las provocadas como resultado por un agente utilizado en quimioterapia, tal como la vincristina.

40 45 El término “fallo cardíaco” hace referencia a una anormalidad de la función cardíaca en la que el corazón no bombea sangre al ritmo necesario para satisfacer los requisitos de los tejidos metabolizantes. Dentro del término fallo cardíaco se incluyen una amplia diversidad de enfermedades, tales como el fallo cardíaco congestivo, el infarto de miocardio y la taqui-arritmia.

50 55 Por “tratamiento” se hace referencia tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Entre los que necesitan tratamiento se incluyen tanto los que ya padecen el trastorno como los que son propensos a padecerlo o aquellos a los cuales tiene que evitárseles el padecimiento del trastorno.

A los efectos de tratamiento, “mamífero” hace referencia a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo animales humanos, animales de granja, y animales de zoo para deportes o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el animal al que se hace referencia en el presente documento es humano.

Tal y como se utiliza en el presente documento, “inhibidor ACE” hace referencia a fármacos que inhiben al enzima convertidor de angiotensina, los cuales evitan la conversión de angiotensina I en angiotensina II. Los inhibidores ACE pueden resultar beneficiosos en el fallo cardíaco congestivo mediante la reducción de la resistencia vascular sistémica y alivio de la congestión circulatoria. Entre los inhibidores ACE se incluyen, sin que ello represente ninguna limitación, los designados con las marcas Accupril® (quinapril), Altace® (ramiprilo), Capoten® (captoprilo), Lotensin® (benazeprilo), Monopril® (fosinopril), Vasotec® (enalapril) y Zestril® (lisinopril). Un ejemplo de inhibidor ACE es el comercializado bajo la marca Capoten®. Genéricamente identificado como captoprilo, este inhibidor ACE es químicamente designado como 1-[(2S)-3-mercpto-2-metilpropionil]-L-prolina.

## II. Modos de llevar a la práctica la invención

### 65 1. Polipéptidos CHF

Los polipéptidos preferidos de esta invención son polipéptido(s) CHF sustancialmente homogéneos que tienen las propiedades biológicas de ser miocito-hipertróficos y de estimular el desarrollo de neuronas ciliares en pollitos

# ES 2 276 393 T3

en un ensayo CNTF. Los CHFs más preferidos son proteína(s) de mamífero(s) aislada(s) que tienen actividad hipertrófica, anti-arrítmica, inotrópica y neurológica. Los polipéptidos más preferidos de esta invención son los CHFs de ratón y humanos, incluyendo fragmentos de los mismos que tienen actividad hipertrófica, anti-arrítmica, inotrópica y neurológica. Opcionalmente, estos CHFs murinos y humanos carecen de glicosilación.

5 Los polipéptidos opcionales preferidos de esta invención son variante(s) biológicamente activa(s) de CHF con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con el CHF murino de la Figura 1, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, todavía más preferiblemente al menos el 85%, incluso más preferiblemente al menos el 90% y, muy preferiblemente, al menos el 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia CHF humana de la Figura 5 (a saber, entre el 70 y el 100%, entre el 10 75 y el 100%, entre el 80 y el 100%, entre el 85 y el 100%, entre el 90 y el 100% de identidad de secuencia, respectivamente). Alternativamente, la(s) variante(s) biológicamente preferida(s) de CHF presenta(n) una secuencia de aminoácido que tiene al menos una identidad de secuencia de al menos el 70%, preferiblemente de al menos el 75%, más preferiblemente de al menos el 80%, todavía más preferiblemente de al menos el 85%, incluso más preferiblemente de al menos el 90% y muy preferiblemente de al menos el 95% con la secuencia CHF humana de la Figura 5 (a saber, entre el 70 y el 100%, entre el 75 y el 100%, entre el 80 y el 100%, entre el 85 y el 100%, entre el 90 y el 100% y entre el 5 y el 100%, respectivamente).

20 El CHF clonado a partir de cuerpos embrioides murinos presenta las siguientes características:

- (1) tiene un peso molecular comprendido entre aproximadamente 21 y 23 kD, medido mediante reducción SDS-PAGE;
- (2) muestra actividad positiva en el ensayo de neurona ciliar en pollito CNTF y en los ensayos de hipertrofia miocítica y de hipertrofia de liberación de ANP.

25 Los polipéptidos CHF más preferidos son aquellos que son codificados por DNA o cDNA genómico y que tienen la secuencia de aminoácido de CHF descrita en la Figura 1 o la secuencia de aminoácidos de CHF humano descrita en la Figura 5.

30 En la relación de polipéptidos CHF biológicamente activos preferidos de origen natural de esta invención se incluyen prepro-CHF, pro-CHF, pre-CHF, CHF maduro y sus variantes de glicosilación.

35 Entre todavía otros polipéptidos preferidos de esta invención se incluyen variantes de secuencias de CHF y CHFs químicos. Habitualmente, las variantes de secuencias de CHF preferidas son variantes de CHF biológicamente activas que tienen una secuencia de aminoácido que tiene al menos un 70% de identidad de secuencia con el CHF murino o humano, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, todavía más preferiblemente al menos el 85%, incluso más preferiblemente al menos el 90% y muy preferiblemente al menos el 95%. Un ejemplo preferido de variante de CHF es una variante CHF de dominio C-terminal, en la cual uno o más de los restos aminoácidos básicos o dibásicos (por ejemplo, R ó K) está sustituido por un resto(s) aminoácido(s) no básico(s) (por ejemplo, hidrófobo, neutro, ácido, aromático, gli, pro y similar).

40 Otro ejemplo de variante de secuencia de CHF preferida es una “quimera dominio” que comprende los restos N-terminales sustituidos por uno o más, pero no todos, de los restos CNTF humanos alineados aproximadamente tal y como se muestra en la Figura 2. En esta realización, la quimera de CHF tendría restos individuales o a base de bloques, procedentes de la secuencia CNTF humana añadida a o sustituida en la secuencia CHF en las posiciones correspondientes a la alineación mostrada en la Figura 2. Por ejemplo, uno o más de estos segmentos de CNTF que no son homólogos podrían estar sustituidos en los segmentos correspondientes de CHF. Se contempla el hecho de que esta “quimera dominio CHF-CNTF” presente actividad biológica hipertrófica/anti-arrítmica/inotrópica/neurotrófica mezclada.

45 Otros polipéptidos preferidos de esta invención incluyen fragmentos de CHF que tienen una secuencia consecutiva de al menos 10, 15, 20, 30 o 40 restos de aminoácido, preferiblemente de entre aproximadamente 10 y 150 restos de aminoácido, que es idéntica a la secuencia del CHF aislada a partir de cuerpos embrioides murinos o a la del 50 CHF humano correspondiente. Entre otros fragmentos CHF preferidos se incluyen los producidos como resultado de hidrólisis química o enzimática o digestión del CHF purificado.

55 Otro aspecto de la invención es un procedimiento para purificar moléculas CHF que comprende la puesta en contacto de una fuente de CHF que contiene moléculas de CHF que tienen que ser purificadas con un polipéptido anticuerpo o receptor inmovilizado, en condiciones bajo las cuales las moléculas de CHF que tienen que ser purificadas son absorbidas de forma selectiva sobre el polipéptido anticuerpo o receptor inmovilizado, lavando el soporte inmovilizado para eliminar el material no absorbido y eluyendo las moléculas que tienen que ser purificadas a partir de polipéptido anticuerpo o receptor inmovilizado al cual son absorbidas con un tampón de elución. La fuente que contiene el CHF puede ser una suspensión celular de cuerpos embrioides.

60 Alternativamente, la fuente que contiene el CHF es un cultivo celular recombinante en el que la concentración de CHF en o bien el medio de cultivo o en lisatos celulares es generalmente más elevada que en el plasma o en otras fuentes naturales. En este caso, el procedimiento de inmunoafinidad descrito anteriormente, si bien todavía resulta

de utilidad, no resulta habitualmente necesario y pueden aplicarse procedimientos de purificación más tradicionales conocidos en el estado de la técnica. Brevemente, el procedimiento de purificación preferido para proporcionar CHF sustancialmente homogéneo comprende: eliminar restos de partículas mediante, por ejemplo, centrifugación o ultrafiltración; opcionalmente concentrando el grupo de proteínas con un filtro de concentración de proteínas disponible en

- 5 el comercio; y purificando seguidamente el CHF de polipéptido y proteínas solubles contaminantes, siendo utilizados como ejemplos de procedimientos de purificación adecuados los que se indican seguidamente: fraccionamiento sobre columnas de inmunofijación o de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre gel de sílice o sobre resina de intercambio iónico, tal como DEAE; incidiendo en cromatografía; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; cromatografía MONO-Q o MONO-S y Toyopearl; filtración con gel utilizando,
- 10 por ejemplo, Sephadex G-75; cromatografía sobre columnas que captan el CHF y columnas Sepharose proteína A para eliminar contaminantes tales como IgG. Un esquema de purificación preferido para tanto el CHF natural como el recombinante utiliza la columna Butyl Toyoperl, seguido de una columna MONO-Q y de una columna C4 en fase inversa, tal y como se describe más adelante.

- 15 En otra realización preferida, esta invención proporciona un anticuerpo aislado capaz de unirse al CHF. Un anticuerpo anti-CHF aislado preferido es monoclonal (Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-497 [1975]; Campbell, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Burdon *et al.*, Eds. Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam [1985]; y Huse *et al.*, *Science*, 246: 1275-1281 [1989]). El anticuerpo anti-CHF aislado preferido es uno que se une a CHF con una afinidad de al menos aproximadamente 10<sup>6</sup> L/mol. Muy preferiblemente, el anticuerpo se une con una afinidad de al menos aproximadamente 10<sup>7</sup> L/mol. Muy preferiblemente, el anticuerpo es utilizado frente a CHF que tiene una de las funciones efectoras descritas anteriormente.

- 20 El anticuerpo aislado capaz de unirse a CHF puede opcionalmente ser fusionado con un segundo polipéptido y el anticuerpo o fusión de los mismos ser utilizado para aislar y purificar CHF obtenido a partir de una fuente tal como se ha descrito anteriormente para el polipéptido CHF inmovilizado. En un aspecto preferido adicional de esta realización, la invención proporciona un procedimiento para detectar el CHF *in vitro* o *in vivo* que comprende la puesta en contacto del anticuerpo con una muestra, especialmente con una muestra de suero, acerca de la cual se tenga la sospecha de que contiene el CHF detectar si se ha producido la unión.

- 25 30 La invención proporciona también una molécula de ácido nucleico aislada que codifica para el CHF o para uno de sus fragmentos, pudiendo ser la citada molécula de ácido nucleico marcada o no marcada con un resto detectable y una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que es complementaria a o hibrida en condiciones severas o moderadamente severas con una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica para un CHF. Un ácido nucleico preferido es RNA o DNA que codifica para un CHF biológicamente activo, compartiendo al menos el 75%, más preferiblemente al menos el 80%, todavía más preferiblemente al menos el 85%, incluso más preferiblemente el 90%, y muy preferiblemente el 95%, de identidad de secuencia con CHF humano o murino.

- 35 40 45 Las moléculas de ácido nucleico aisladas más preferidas son secuencias de DNA que codifican para CHF biológicamente activo, seleccionadas a partir de (a) DNA basado en la región de codificación de un gen de CHF de mamífero (por ejemplo, DNA que comprende la secuencia de nucleótidos proporcionada en la Figura 1 o en la Figura 5, o fragmentos de la misma); (b) DNA capaz de hibridar hacia un DNA de (a) bajo condiciones al menos moderadamente severas; y (c) DNA que ha degenerado hacia un DNA definido en (a) o (b), como resultado de la degeneración del código genético. Se contempla que los CHFs nuevos descritos en el presente documento puedan ser miembros de una familia de ligandos que tiene una identidad de secuencia adecuada para que su DNA pueda hibridar con el DNA de la Figura 1 o la Figura 5 (o con fragmentos de las mismas), en condiciones de severidad entre baja y moderada. Así pues, un aspecto adicional de esta invención incluye DNA que híbrida en condiciones de severidad entre baja y moderada con DNA que codifica para polipéptidos CHF.

- 50 55 Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico es cDNA que codifica para el CHF y comprende adicionalmente un vector de replicación en el que el cDNA se encuentra operativamente unido a secuencias control reconocidas por un huésped transformado con el vector. Este aspecto incluye además células huésped transformadas con el vector y un procedimiento para la utilización del cDNA para efectuar la producción de CHF, que comprende la expresión del cDNA que codifica para el CHF en un cultivo de células huésped transformadas y la recuperación del CHF procedente del cultivo celular huésped. El CHF preparado de este modo es preferiblemente CHF murino o humano sustancialmente homogéneo.

- 60 La invención incluye además un procedimiento preferido para el tratamiento de un mamífero que presenta fallo cardíaco o un trastorno anti-arrítmico, inotrópico o neurológico, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un CHF al mamífero. Opcionalmente, el CHF es administrado en combinación con un inhibidor ACE, tal como captopril, en el caso de fallo cardíaco congestivo, o con otro factor miocardiotorófico, anti-arrítmico o inotrópico, en el caso de otros tipos de fallo cardíaco o de trastorno cardíaco, o con una molécula neurotrófica tal como, por ejemplo, IGF-I, CNTF, NGF, NT-3, BDNF, NT-4, NT-5, etc., en el caso de un trastorno neurológico.

## 2. Preparación de CHF de secuencia natural y variantes

- 65 La mayor parte de la discusión que sigue a continuación pertenece a la producción de CHF por medio de células de cultivo transformadas con un vector que contiene ácido nucleico CHF y recuperar el polipéptido obtenido a partir del cultivo celular. Se contempla adicionalmente la posibilidad de que el CHF de esta invención pueda ser producido

por medio de recombinación homóloga, tal y como se indica en el documento WO 91/06667, publicado el 16 de mayo de 1991. Brevemente, este procedimiento conlleva la transformación de células de mamífero primarias que contienen gen CHF endógeno (por ejemplo, células humanas si el CHF deseado es humano) con una construcción (a saber, un vector) que comprende un gen amplificable (tal como dihidrofolato reductasa [DHFR] u otros discutidos más adelante) 5 y al menos una región flanqueante de una longitud de al menos aproximadamente 150 bp, que es homóloga con una secuencia de DNA en el punto de la región de codificación del gen CHF, para proporcionar amplificación del gen CHF. El gen amplificable tiene que estar ubicado en un punto que no interfiera con la expresión del gen CHF. La transformación se lleva a cabo de tal forma que la construcción quede integrada de forma homóloga en el genoma de las células primarias para definir una región amplificable.

10 Las células primarias que comprenden la construcción son después seleccionadas por medio del gen amplificable o de otro marcador presente en la construcción. La presencia del gen marcador establece la presencia y la integración de la construcción en el genoma del huésped. No resulta necesario efectuar ninguna selección adicional de las células primarias, dado que la selección se efectuará en el segundo huésped. Si se desea, la ocurrencia del acontecimiento de 15 recombinación homóloga puede ser determinada mediante la utilización de PCR y, o bien secuenciando las secuencias de DNA amplificadas resultantes, o determinando la longitud adecuada del fragmento PCR cuando el DNA procedente de los integrantes homólogos correctos está presente y expandiendo tan solo aquellas células que contienen los citados fragmentos. Asimismo, si se desea, las células seleccionadas pueden ser amplificadas en este punto mediante presión con el agente amplificador adecuado (tal como metotrexato, si el gen amplificable es DHFR), por lo que se obtienen 20 múltiples copias del gen objetivo.

Después del paso de selección, partes de DNA del genoma, lo suficientemente grandes como para incluir la región amplificable completa, son aisladas a partir de las células primeras seleccionadas. Las células huésped de expresión de mamífero secundarias son entonces transformadas con porciones de DNA genómico y clonadas, y se seleccionan 25 clones que contienen la región amplificable. La región amplificable es después amplificada por medio de un agente amplificante, si es que no ha sido ya amplificada en las células primarias. Finalmente, las células huésped de expresión secundaria comprenden ahora múltiples copias de la región amplificable contenido CHF son cultivadas con vistas a que expresen el gen y produzcan la proteína.

#### 30 A. Aislamiento de DNA que codifica para CHF

El DNA que codifica para CHF puede ser obtenido a partir de cualquier librería de cDNA preparada a partir de tejido acerca del cual se considera posee el mRNA CHF y que lo expresa a un nivel detectable. El mRNA se prepara de forma adecuada, por ejemplo, a partir de cuerpos embrioides diferenciados de siete días. El gen CHF puede ser 35 también obtenido a partir de una librería genómica o mediante síntesis de oligonucleótido *in vitro*, tal y como se ha definido anteriormente asumiendo que la secuencia completa de aminoácidos o de nucleótidos resulta conocida.

Las librerías son cribadas con sondas diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. Para la expresión de librerías de cDNA, entre las sondas adecuadas se incluyen, por ejemplo, anticuerpos 40 monoclonales o policlonales que reconocen y se unen específicamente al CHF; oligonucleótidos de entre aproximadamente 20 y 80 bases de longitud que codifican para partes conocidas o presuntas de cDNA CHF procedentes de la misma o de diferentes especies; y/o cDNAs complementarios u homólogos o fragmentos de los mismos que codifican para el mismo o similar gen. Entre las sondas adecuadas para cribado de librerías de DNA genómico se incluyen, sin que ello suponga ninguna limitación, oligonucleótidos, cDNAs, o fragmentos de los mismos que codifican para 45 el mismo o similar gen, y/o DNAs genómicos homólogos o fragmentos de los mismos. El cribado del cDNA o de la librería genómica con la sonda seleccionada puede ser llevado a cabo utilizando procedimientos habituales, tal y como se describe en los capítulos 10-12 de Sambrook *et al.*, *supra*.

Un procedimiento alternativo para aislar el gen que codifica para CHF es utilizar la metodología PCR, tal y como se describe en la sección 14 de Sambrook *et al.*, *supra*. Este procedimiento requiere la utilización de sondas de oligonucleótido que hibridará a CHF. Más adelante se describen estrategias para la selección de oligonucleótidos.

Un procedimiento preferido para llevar a la práctica esta invención se basa en la utilización de secuencias de nucleótido seleccionadas cuidadosamente para cribar librerías de cDNA procedentes de diversos tejidos, preferiblemente 55 cuerpos embrioides diferenciados de mamífero y líneas celulares de cerebro, cardíacas y de placenta. Más preferiblemente, librerías de cDNA de cerebro, cardíacas y de placenta de embriode humano son cribadas con las sondas de oligonucleótido

Las secuencias de oligonucleótido seleccionadas como sondas deben ser lo suficientemente largas y lo suficientemente 60 no ambiguas como para que las positivas falsas queden minimizadas. La secuencia(s) real de nucleótidos es habitualmente utilizada en base a secuencias de nucleótido conservadas o altamente homólogas. Los oligonucleótidos pueden ser hechos degenerar en una o más posiciones. La utilización de oligonucleótidos degenerados puede tener una importancia particular cuando una librería es cribada a partir de especies en las cuales la utilización del codón preferencial no resulta conocida.

65 Los oligonucleótidos pueden ser marcados de tal manera que los mismos pueden ser detectados tras la hibridación a DNA en la librería que está siendo cribada. El procedimiento de marcaje preferido se basa en la utilización de ATP marcado con <sup>32</sup>P con polinucleótido quinasa, tal y como resulta bien conocido en el estado de la técnica, para

radio-marcar el oligonucleótido. No obstante, para marcar el oligonucleótido pueden utilizarse otros procedimientos, incluyendo, sin que ello represente ninguna limitación, biotinilación o marcado enzimático.

El ácido nucleico CHF que codifica para un polipéptido de longitud completa resulta de particular interés. En algunas realizaciones preferidas, la secuencia de ácido nucleico incluye la secuencia señal de CHF de origen natural. El ácido nucleico que tiene la totalidad de secuencia de codificación de proteínas se obtiene mediante cribado de librerías genómicas o de cDNA seleccionadas utilizando la secuencia de aminoácido deducida descrita en el presente documento por primera vez, y, si resulta necesario, utilizando procedimientos de extensión con cebador convencionales, tal y como se describe en la sección 7.79 de Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermedios de proceso de mRNA que pueden no haber sido transcritos de forma reversa en cDNA.

#### B. Variantes de secuencia de aminoácido de CHF de origen natural

Se preparan variantes de aminoácido de CHF de origen natural mediante la introducción de cambios de nucleótido adecuados en el DNA CHF de origen natural o mediante síntesis *in vitro* del polipéptido CHF deseado. Entre las citadas variantes se incluyen, por ejemplo, supresiones o inserciones o sustituciones de restos dentro de la cadena de aminoácidos mostrada para CHF murino en la Figura 1 y para CHF humano en la Figura 5. Cualquier combinación entre supresión, inserción, y sustitución se lleva a cabo para llegar a la construcción final, siempre y cuando la construcción final posea las características deseadas. Se excluyen de la cobertura de esta invención las variantes CHF o las secuencias de polipéptidos que son los homólogos de rata de CHF. Los cambios de aminoácido pueden también alterar los procedimientos post-traducción del CHF de origen natural, tales como la modificación en el número o en la posición de los puntos de glicosilación.

Para el diseño de variantes de secuencia de aminoácidos de CHF de origen natural, la localización del punto de mutación y la naturaleza de la mutación dependerá de las características de CHF que tiene que ser modificado. Por ejemplo, los antagonistas o *supra*-agonistas de CHF candidatos serán seleccionados inicialmente a través de puntos de localización que son idénticos o están altamente conservados entre CHF y otros ligandos que le unen a miembros de la familia de receptores hormona de crecimiento (GH)/citoquina, especialmente CNTF y factores inhibidores de leucemia (LIF). Los puntos para mutación pueden ser modificados individualmente o en serie, por ejemplo, mediante (1) sustitución inicial con selecciones de aminoácidos conservadores y después con selecciones más radicales, en función de los resultados alcanzados, (2) supresión del resto objetivo, o (3) inserción de restos de la misma o de una clase adyacente al punto localizado, o combinaciones de las opciones 1-3.

Un procedimiento útil para la identificación de determinados restos o regiones del polipéptido CHF de origen natural que resultan localizaciones preferidas para mutagénesis es denominado "mutagénesis de escaneo de alanina", tal y como se describe por parte de Cunningham y Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, un resto o un grupo de restos objetivo son identificados (por ejemplo, restos cargados como arg, asp, his, lys y glu) y sustituidos por un aminoácido cargado negativamente o neutro (muy preferiblemente alanina o polialanina) para afectuar la interacción de los aminoácidos con el entorno acuoso circundante en la parte interior o exterior de la célula. Aquellos dominios que demuestran sensibilidad funcional frente a las sustituciones son después refinados mediante la introducción de otras o nuevas variantes en o para los puntos de sustitución. Así pues, si bien el punto para la introducción de una variación de secuencia de aminoácido está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no precisa estar determinada. Por ejemplo, para optimizar el comportamiento de una mutación en un punto determinado, el escaneo mediante alanina o la mutagénesis aleatoria se lleva a cabo en un codón o región objetivo y las variantes CHF producidas son cribadas en búsqueda de la combinación óptima de la actividad deseada.

Existen dos variables principales en la construcción de variantes de secuencia de aminoácidos: la localización del punto de mutación y la naturaleza de la mutación. Estas son variantes proceden de la secuencia de la Figura 1 o de la Figura 5 y pueden representar alelos de origen natural (los cuales no requerirán manipulación del DNA CHF de origen natural) o formas mutantes predeterminadas obtenidas mediante la mutación de DNA, ya sea para llegar a un alelo o a una variante no encontrada en la naturaleza. En general, la localización y la naturaleza de la mutación elegida dependerá de las características de CHF que tiene que ser modificado.

Las supresiones de secuencias de aminoácidos oscilan generalmente entre aproximadamente 1 y 30 restos, más preferiblemente entre aproximadamente 1 y 10 restos, y habitualmente son contiguos. Las supresiones contiguas se efectúan habitualmente en números iguales de restos, pero las supresiones únicas o de números impares caen también dentro del campo de este documento. Las supresiones pueden ser introducidas en regiones de baja homología entre CHF y otros ligandos que se unen a la familia de receptores GH/citoquina, las cuales comparten la mayor parte de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de CHF humano, para modificar la actividad de CHF. La supresiones procedentes de CHF en áreas de sustancial homología con uno de los puntos de unión a receptor o con otros ligandos que se unen a la familia de receptores de GH/citoquina modificarán con mayor probabilidad la actividad biológica de CHF de forma más significativa. El número de supresiones consecutivas será seleccionado con vistas a conservar la estructura terciaria de CHF en el dominio afectado, por ejemplo, lámina beta-plegada o hélice alfa.

Entre las inserciones de secuencias de aminoácidos se incluyen fusiones amino- y/o carboxilo-terminales, que oscilan en longitud entre un resto y polipéptidos que contienen un centenar o más de restos, al igual que inserciones de intrasecuencias de restos de aminoácidos únicos o múltiples. Las inserciones de intrasecuencias (a saber, inserciones dentro de la secuencia madura de CHF) pueden oscilar generalmente entre aproximadamente 1 y 10 restos, más

# ES 2 276 393 T3

preferiblemente entre 1 y 5, muy preferiblemente entre 1 y 3. Las inserciones son preferiblemente efectuadas con un numero de restos par, pero ello no resulta necesario. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen CHF maduro con un resto metionilo N-terminal, un artefacto de producción directa de CHF maduro en cultivo celular recombinante y fusión de una secuencia señal N-terminal heteróloga con el N terminal de la molécula de CHF maduro, 5 para facilitar la secreción de CHF maduro procedente de huéspedes recombinantes. Las citadas secuencias señal se obtendrán generalmente a partir de, y por tanto son homólogas de, la especie células huésped pretendida. Entre las secuencias adecuadas se incluyen STII o Ipp para *E. coli*, factor alfa para levadura y señales víricas, tales como herpes gD, para células de mamíferos.

10 Otras variantes de inserción de la molécula de CHF de origen natural incluyen la fusión con el C terminal de CHF de origen natural de polipéptidos inmunogénicos, por ejemplo, polipéptidos bacterianos tales como beta-lactamasa o un enzima codificado por *E. coli* trp locus, o proteína de levadura, y fusiones con C-terminal de proteínas que tienen una larga semi-vida, tales como las regiones constantes de inmunoglobulinas (u otras regiones de inmunoglobulinas), 15 albúmina, o ferritina, tal y como se describe en el documento WO 89/029022, publicado el 6 de abril de 1989.

15 Un tercer grupo de variantes está constituido por variantes de sustitución de aminoácido. Estas variantes presentan al menos un resto aminoácido eliminado en la molécula de CHF de origen natural y un resto distinto insertado en su lugar. Los puntos de mayor interés para mutagénesis de sustitución incluyen puntos identificados como puntos activos de CHF de origen natural y puntos en los cuales los aminoácidos encontrados en los análogos conocidos son 20 sustancialmente distintos en términos de volumen de cadena lateral, carga, p hidrofobicidad, pero en los cuales existe también un alto grado de identidad de secuencia en el punto seleccionado dentro de diversas especies de CHF animal o en los cuales los aminoácidos encontrados en ligandos conocidos que se unen a miembros de la familia de receptores de GH/citoquina y nuevos CHF son sustancialmente distintos en términos de volumen de cadena lateral, carga o hidrofobicidad, pero en los cuales existe también un alto grado de identidad de secuencia en el punto seleccionado 25 dentro de diversos análogos animales de los citados ligandos (por ejemplo, entre todas las moléculas CNTF animal). Este análisis resaltarán restos que pueden estar involucrados en la diferenciación de actividad de la hipertrofia cardíaca, factores anti-arrítmicos y factores neurotróficos y, por consiguiente, variaciones en estos puntos pueden afectar a las citadas actividades.

30 Otros puntos de interés son aquellos en los cuales los restos particulares de CHF obtenidos a partir de diversas especies son idénticos entre las especies animales de CHF y otros ligandos que se unen a las moléculas de la familia de receptores GH/citoquina, sugiriendo este grado de conformación la importancia en alcanzar la actividad biológica común para estos enzimas. Estos puntos, especialmente aquellos que caen dentro de una secuencia de al menos tres 35 diferentes puntos conservados idénticos, son sustituidos de una forma relativamente conservadora. Las citadas sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. I las citadas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces cambios más sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 1, o tal y como se describe adicionalmente más adelante en relación con clases de aminoácidos, son introducidos y los productos sometidos a cribado.

40

TABLA 1

	Resto original	Sustituciones ejemplarizadas	Sustituciones preferidas
45	Ala (A)	Val; leu; ile	Val
	Arg (A)	Lys; gln; asn	Lys
	Asn (N)	Gln; his; lys; arg	Gln
50	Asp (D)	Glu	Glu
	Cys (C)	Ser	Ser
	Gln (Q)	Asn	Asn
	Glu (E)	Asp	Asp
	Gly (G)	Pro	Pro
55	His (H)	Asn; gin; lys; arg	Arg
	Ile (I)	Leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
60	Leu (L)	Norleucina ile; val; met; ala, phe	Ile
	Lys (K)	Arg; gln; asn	Arg
	Met (M)	Leu; phe; ile	Leu
65	Phe (F)	Leu; val; ile; ala	Leu
	Pro (P)	Gly	Gly
	Ser (S)	Thr	Thr

# ES 2 276 393 T3

TABLA 1 (continuación)

	Resto original	Sustituciones ejemplarizadas	Sustituciones preferidas
5	Thr (T)	Ser	Ser
	Trp (W)	Tyr	Tyr
	Tyr (Y)	Trp; phe; thr; ser	Tyr
10	Val (V)	Ile; leu; met; phe; ala; norleucina; leu	phe

15 Seleccionando sustituciones que difieren de forma significativa en sus efectos sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga de hidrofobicidad se la molécula en el punto objetivo, o (c) el volumen de la cadena lateral, se logran modificaciones sustanciales en la función o en la identidad inmunológica del CHF de origen natural. Los restos de origen natural son divididos en grupos en base a las propiedades de cadenas laterales comunes:

- 20 (1) hidrófobas: norleucina, met, ala, val, leu, ile;  
 (2) hidrófilas neutras: cys, ser, thr;  
 25 (3) ácidas: asp, glu;  
 (4) básicas: asn, gln, lys, arg;  
 (5) restos que influencian la orientación de cadena: gly, pro; y  
 30 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro. Los citados restos sustituidos pueden ser también introducidos en puntos de sustitución conservadora o, más preferiblemente, en los restantes puntos (no conservados). la función o en la identidad inmunológica del CHF de origen natural. 35 Los restos de origen natural son divididos en grupos en base a las propiedades de cadenas laterales comunes:

- 40 (1) hidrófobas: norleucina, met, ala, val, leu, ile;  
 (2) hidrófilas neutras: cys, ser, thr;  
 (3) ácidas: asp, glu;  
 45 (4) básicas: asn, gln, lys, arg;  
 (5) restos que influencian la orientación de cadena: gly, pro; y  
 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

50 Las sustituciones no conservadoras conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro. Los citados restos sustituidos pueden ser también introducidos en puntos de sustitución conservadora o, más preferiblemente, en los restantes puntos (no conservados).

55 En una realización de la invención, resulta deseable inactivar uno o más puntos de rotura de proteasa que se encuentran presentes en la molécula. Estos puntos son identificados a través de inspección de la secuencia de aminoácidos codificada, en el caso de tripsina, por ejemplo, para n resto arginilo o lisinilo. Cuando se identifican los puntos de rotura por proteasa, los mismos son convertidos en inactivos para rotura proteolítica, mediante la sustitución del resto objetivo por otro resto, preferiblemente un resto básico tal como glutamina o un resto hidrófobo tal como serina; mediante la supresión del resto; o mediante la inserción de un resto prolíjico inmediatamente después del resto.

60 En otra realización, cualquier resto metionilo distinto del resto metionilo de partida de la secuencia señal, o cualquier resto localizado dentro de aproximadamente tres restos N- ó C-terminales a cada uno de los citados restos metionilo, es sustituido por otro resto (preferiblemente según la Tabla 1) o suprimido. Alternativamente, entre aproximadamente 1 y 3 restos son insertados en posición adyacente a cada uno de los puntos.

65 Cualquier resto cisteina no involucrado en el mantenimiento de la conformación propia del CHF de origen natural puede ser también sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante.

## ES 2 276 393 T3

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para las variantes de secuencia de aminoácido de CHF de origen natural son preparadas por medio de una diversidad de procedimientos conocidos en el estado de la técnica. Entre estos procedimientos se incluyen, sin que ello represente ninguna limitación, el aislamiento a partir de una fuente de origen natural (en el caso de variantes e secuencia de aminoácidos de origen natural) o preparación por medio de mutagénesis mediada por oligonucleótido (o dirigida a un punto), mutagénesis PCR, y mutagénesis de cassette de una variante preparada con anterioridad o de una versión no variante de CHF de origen natural.

La mutagénesis mediada por oligonucleótido es un procedimiento preferido para la preparación de la sustitución, supresión e inserción de variantes de CHF DNA de origen natural. Esta técnica es bien conocida el estado de la técnica, tal y como se describe por parte de Adelman *et al.*, *DNA*, 2: 183 (1983). Brevemente, el CHF DNA es alterado mediante hibridación de un oligonucleótido que codifica para la mutación deseada hacia una plantilla de DNA, en la que la plantilla es la hebra única de un plásmido o bacteriófago que contiene la secuencia de DNA no alterada o de origen natural de CHF. Después de la hibridación, para sintetizar una segunda hebra complementaria completa de la plantilla se utiliza una DNA polimerasa, que incorporará de este modo el cebador oligonucleótido y codificará para a alteración selectiva en el CHF DNA de origen natural.

Generalmente se utilizan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá entre 12 y 15 nucleótidos que son completamente complementarios para la plantilla sobre cada uno de los lados del nucleótido(s) que codifican para la mutación. Esto asegura el que el oligonucleótido hibridará de forma correcta hacia la molécula plantilla de DNA de hebra única. Los oligonucleótidos son sintetizados rápidamente utilizando técnicas conocidas en el estado de la técnica, tal y como se ha descrito por parte de Crea *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

La plantilla de DNA puede ser generada por parte de aquellos vectores que o bien proceden de vectores M13 bacteriófagos (resultan adecuados los vectores M13mp18 y M13m19, disponibles comercialmente) o de aquellos vectores que contienen un origen de fago de replicación de hebra única , tal y como se describe por parte de Viera *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 153: 3 (1987). Así pues, el DNA que tiene que ser objeto de mutación puede ser insertado en uno de estos vectores para generar una plantilla de hebra única. La producción de la plantilla de hebra única se describe en Sections 4.21-4.41 de Smabrook *et al.*, *supra*.

Alternativamente, la plantilla de DNA de hebra única puede ser generada por medio de desnaturación de DNA (u otro) plásmido de doble hebra, utilizando técnicas habituales.

Para alteración de la secuencia de DNA de origen natural (para generar variantes de secuencias e aminoácidos, por ejemplo), el oligonucleótido es hibridoado a una plantilla de hebra única bajo condiciones de hibridación estables. Un enzima de polimerización de DNA, habitualmente el fragmento Klenow de DNA polimerasa I, es entonces añadido para sintetizar la hebra complementaria de la plantilla utilizando el oligonucleótido como cebador para la síntesis. Se forma de este modo una molécula heteroduplex, de tal forma que una hebra de DNA codifica para la secuencia de CHF de origen natural y la otra hebra (la plantilla original) codifica para la secuencia de CHF no modificada, de origen natural. Esta molécula heteroduplex es después transformada en una célula huésped adecuada, habitualmente una procariota tal como *E. coli* JM101. Una vez cultivadas las células, las mismas son colocadas en placas sobre placas de agarosa y sometidas a cribado utilizando el cebador oligonucleótido radio-marcado con <sup>32</sup>P para identificar las colonias bacterianas que contienen el DNA mutado. La región mutada es después extraída y colocada en un vector adecuado para la producción de proteína, generalmente un vector de expresión del tipo habitualmente utilizado para transformación de un huésped adecuado.

El procedimiento descrito en el apartado precedente puede ser modificado de tal forma que se cree una molécula homoduplex en la que ambas hebras del plásmido contengan las mutaciones. Las modificaciones son las siguientes: el oligonucleótido de hebra única es anillado a la plantilla de hebra única, tal y como se ha descrito anteriormente. Una mezcla de tres desoxirribonucleótidos, desoxiriboadenosina (sATP), desoxiriboguanosina (dGPT) y desoxiribotimidina (dTTP), es combinada con una tio-desoxiribocitosina modificada denominada dCTP-(aS) (la cual puede ser obtenida en Amersham Corporation). Esta mezcla es añadida al complejo plantilla-oligonucleótido. Tras la adición de DNA polimerasa a la mezcla, se genera una hebra de DNA idéntica a la plantilla, con la excepción de las bases mutadas. Además, esta nueva hebra de DNA contendrá dCPT-(aS) en vez de dCTP, lo cual sirve para proteger la misma de la digestión de endonucleasa de restricción.

Una vez la hebra de plantilla del heteroduplex de doble hebra es entallado con el enzima de restricción adecuado, la hebra de plantilla puede ser digerida con Exo III nucleasa o con otra nucleasa adecuada más allá de la región que contiene el (los) punto(s) que tiene(s) que ser sometido(s) a mutagénesis. La región es entonces detenida para dejar una molécula que tiene tan solo parcialmente una única hebra. Se forma después un homoduplex de DNA de doble hebra, utilizando DNA polimerasa en presencia de los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfatos, ATP, y DNA ligada. Esta molécula homoduplex puede entonces ser transformada en una célula huésped adecuada , tal como *E. coli* JM101, tal y como se ha descrito anteriormente.

Pueden generarse mutantes que codifiquen para DNA de CHF de origen natural, con más de un aminoácido que tiene que ser sustituido, de una o varias maneras. Si los aminoácido están localizados conjuntamente en la cadena de polipéptido, los mismos pueden ser mutados de forma simultánea utilizando un oligonucleótido que codifica para la totalidad de las sustituciones de aminoácido deseadas. Si, sin embargo, los aminoácido están localizados a alguna

## ES 2 276 393 T3

distancia los unos de los otros (separados por más de aproximadamente diez aminoácidos), resulta más difícil generar un único oligonucleótido que codifique para la totalidad de los cambios deseados. Por el contrario, puede utilizarse uno de dos posibles procedimientos.

- 5 En el primer procedimiento, se genera un oligonucleótido para cada uno de los aminoácidos que tiene que ser sustituido y. Los oligonucleótidos son después anillados simultáneamente a la plantilla de DNA de hebra única y la segunda hebra de DNA, sintetizada a partir de la plantilla, codificará para la totalidad de las sustituciones deseadas de aminoácido.
- 10 El procedimiento alternativo conlleva la aplicación de dos o más rondas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera ronda es tal y como se ha descrito para los mutantes únicos: se utiliza DNA de tipo natural para la plantilla, un oligonucleótido que codifica para la sustitución(es) deseada(s) es anillado a esta plantilla, y se genera entonces la molécula de DNA heteroduplex. La segunda ronda de mutagénesis utiliza como plantilla el DNA mutado obtenido en la primera ronda de mutagénesis. Así pues, esta plantilla ya contiene una o más mutaciones. El 15 oligonucleótido que codifica para la sustitución(es) adicional(es) deseada(s) es entonces anillado a esta plantilla la hebra de DNA resultante codifica ahora para mutaciones que proceden tanto de la primera como de la segunda ronda e mutagénesis. Este DNA resultante puede ser utilizados como plantilla en una tercera ronda de mutagénesis, y así sucesivamente.
- 20 La mutagénesis mediante PCR resulta también adecuada para la preparación de variantes e aminoácidos de CHF de origen natural. Si bien la siguiente discusión hace referencia a DNA, debe darse por entendido que la técnica también resulta aplicable a RNA. La técnica de la PCR hace generalmente referencia al siguiente procedimiento (ver Erlich, *supra*, el capítulo de R. Higuchi, p 61-70): cuando cantidades pequeñas de DNA plantilla son utilizadas como material de partida en PCR, para generar relativamente grandes cantidades de un fragmento e DNA específico que 25 difiera de la secuencia plantilla tan solo en las posiciones en las cuales los cebadores defieren de la plantilla, pueden utilizarse cebadores que difieran ligeramente es secuencia de la correspondiente región en un DNA plantilla. Para la introducción de una mutación en un DNA de plásmido, uno e los cebadores es diseñado para solaparse con la posición de la mutación y para contener la mutación; la secuencia del otro cebador tiene que ser idéntica a una extensión de la hebra contraria del plásmido, pero esta secuencia puede estar localizada a lo largo del DNA del plásmido. Resulta preferido, no obstante, que la secuencia del segundo cebador esté localizada dentro de 200 nucleótidos procedentes de la lista, de tal forma que, en definitiva, la región amplificada completa de DNA unido mediante los cebadores pueda 30 ser secuenciada de forma fácil. La amplificación con PCR que utiliza un par cebador como el descrito anteriormente da lugar a una población de fragmentos de DNA que difiere en la posición de la mutación especificada por el cebador y posiblemente en otras posiciones, dado que el copiado de plantilla resulta proclive a la comisión de errores.
- 35 Si la relación de plantilla a material producto es extremadamente baja, la mayor parte de los fragmentos e DNA producto incorpora(n) la(s) deseada(s) mutación(es). Este material producto es utilizado para sustituir la región correspondiente en el plásmido que sirve como plantilla de PCR, utilizando tecnología DNA habitual. Las mutaciones en 40 diversas posiciones pueden ser introducidas de forma simultánea, ya sea utilizando un segundo cebador mutante o llevando a cabo una segunda PCR con diferentes cebadores mutantes y ligando los dos fragmentos PCR resultantes de forma simultánea con el fragmento de vector en una unión a tres (o más) partes.

En un ejemplo específico e mutagénesis mediante PCR, el DNA de plásmido de plantilla (1  $\mu$ g) es linearizado mediante digestión con una endonucleasa de restricción que presenta un único punto de reconocimiento en el DNA plásmido, fuera de la región que tiene que ser amplificada. De este materia, 100 ng son añadidos a la mezcla PCR que contiene el tampón PCR, el cual contiene los cuatro desoxinucleótidos tiofosfatos y está incluida en los kits GeneAmp® obtenidos en Perkin-Elmer CETUR, Norwalk, CT and Emeryville, CA), y 25 pmoles de cada uno de los cebadores de oligómero, hasta totalizar un volumen final de 50  $\mu$ L. La mezcla de reacción es recubierta con una capa 35  $\mu$ L de aceite mineral. La mezcla de reacción es desnaturalizada durante cinco minutos a 100°C, colocada brevemente sobre 45 hielo, y después se le añade 1  $\mu$ L de *Thermus aquaticus* (Taq) NA polimerasa (5 unidades/ $\mu$ L, adquiridas en Perkin-Elmer CETUR), debajo de la capa e aceite mineral. La mezcla de reacción es después insertada en un aparato DNA Termal Cycler (adquirido en Perkin-Elmer CETUR), programado del siguiente modo:

- 50 2 minutos, 55°C  
55 30 segundos, 72°C, seguido de 19 ciclos de:  
30 segundos, 94°C  
60 30 segundos, 55°C, y  
30 segundos, 72°C.

A la finalización del programa, el vial de reacción es extraído del ciclador térmico y la fase acuosa transferida 65 a un nuevo vial, extraída con fenol/cloroformo (50:50, vol) y precipitada con etanol y el DNA es recuperado por medio de procedimientos habituales. Este material es subsiguientemente sometido a los tratamientos adecuados para su inserción en el interior de un vector.

# ES 2 276 393 T3

Otro procedimiento para la preparación de variante, mutagénesis de cassette, está basado en la técnica descrita por Wells *et al.*, *Gene* 34: 315 (1985). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que comprende el CHF DNA de origen natural que tiene que ser mutado. El(s) codón(es) en el CHF DNA que tiene que ser mutado es(son) identificado(s). Estos tienen que ser un único punto de endonucleasa de restricción sobre cada uno de los lados de los punto(s) de mutación identificados. Si no existen los ciados puntos de restricción, los mismos pueden ser generados utilizando el procedimiento de mutagénesis mediada por oligonucleótido descrito anteriormente para introducirlos en las ubicaciones adecuadas en el CHF DNA de origen natural. Una vez los puntos de restricción han sido introducidos en el plásmido, el plásmido es cortado en estos puntos para linearizarlo. Utilizando procedimientos habituales se sintetiza un oligonucleótido de doble hebra que codifica para la secuencia del DNA entre los puntos de restricción pero que contiene la(s) deseada(s) mutación(es). Las dos hebras son sintetizadas de forma separada y son después hibridadas conjuntamente, utilizando técnicas habituales. Este oligonucleótido de doble hebra es identificado como la cassette. Esta cassette está diseñada para tener terminaciones 3' y 5', las cuales resultan compatibles con las terminaciones del plásmido linearizado, de tal forma que la misma puede ser ligada de forma directa con el plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia de CHF DNA mutada, a partir de CF de origen natural.

## 15 C. Inserción de ácido nucleico en un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, cDNA o DNA genómico) que codifica para CHF es insertado en un vector replicable para clonado adicional (amplificación de DNA) para expresión. Muchos vectores se encuentran disponibles y la selección del vector apropiado dependerá de (1) si el mismo tiene que ser utilizado para amplificación de DNA o para expresión e DNA, (2) del tamaño del ácido nucleico que tiene que ser insertado en el vector y (3) de la célula huésped que tiene que ser transformada con el vector. Cada uno de los vectores contiene diversos componentes que dependen de su función (amplificación de DNA o expresión de DNA) y de la célula huésped con la cual es compatible. Los componentes del vector incluyen generalmente, sin que ello represente ninguna limitación, no o mñas de entre: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento reforzador, un favorecedor y una secuencia de terminación de transcripción.

### (i) Componente de secuencia señal

Los CHFs de esta invención pueden ser producidos no tan solo directamente sino también como una fusión con un polipéptido heterólogo, preferiblemente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un punto de rotura específico en el 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 CHF DNA que es insertado en el vector. La secuencia de señal heteróloga seleccionada debe ser una que no sea reconocida y procesada (a saber, rota por una señal peptidasa) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan la secuencia señal de CHF de origen natural, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, a partir del grupo que comprende fosfatasa alcalina, penicilina, Ipp, o líderes endotoxina II estable al calor. Para la secreción de levadura la secuencia señal de origen natural puede ser sustituida por, por ejemplo, el líder invertasa de levadura, el líder factor alfa de levadura (incluyendo los líderes factor  $\alpha$  *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la patente USA n°. 5.010.182, concedida el 23 de abril de 1991), el líder de fosfatasa ácida de levadura, el líder de amilasas salivar de ratón, el líder carboxipeptidasa, el líder BAR1 de levadura, el líder lipasa lanuginosa *Humicola*, el líder glucoamilasa *C. albicans* (EP 362.179, publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento WO90/13646, publicado el 15 de noviembre de 1990. En expresión celular de mamífero, la secuencia de señal humana de origen natural (a saber, la secuencia CHF que normalmente dirige la secreción del CHF humano desde las células humanas *in vivo*) es satisfactoria, si bien pueden resultar adecuadas otras secuencias señal de mamífero, tales como las secuencias señal procedentes de CHFs de otros animales, las secuencias señal procedentes de un ligando de unión a otro miembro de la familia de receptores GH/citoquina y las secuencias señal procedentes de polipéptidos secretados de la misma o de especies relacionadas, al igual que los líderes secretores víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simples.

50 El DNA para la citada región precursora está ligado en marco de lectura a DNA que codifica para CHF maduro.

### (ii) Origen de componente de replicación

Tanto los vectores de expresión como los de clonaje contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Generalmente, en vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique de forma independiente a la del DNA cromosómico del huésped se incluyen orígenes de replicación o secuencia de replicación autónomas. Tales secuencias resultan bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación a partir del plásmido pBR322 resulta adecuado para la mayor parte de bacterias Gram-negativas, el 2  $\mu$  plásmido origen resulta adecuado para levaduras y diversos virus orígenes (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. Generalmente, el origen de componente de replicación no resulta necesario para vectores de expresión en mamíferos (el origen SV40 puede ser utilizado habitualmente tan solo porque contiene el favorecedor temprano).

La mayor parte de los vectores de expresión son vectores "lanzadera", a saber, los mismos son capaces de replicación en al menos tres clases de organismos pero pueden ser transfectados en otro organismo para expresión. Por ejemplo, un vector es clonado en *E. coli* y después el mismo vector es transfectado en levadura o en células de mamífero para expresión, a pesar de que el mismo no resulta capaz de replicarse forma independiente a las de los cromosomas de la célula huésped.

El DNA puede ser también amplificado por medio de inserción en el genoma del huésped. Esto se consigue de forma rápida utilizando especies bacilos como huéspedes, por ejemplo, incluyendo en el vector una secuencia de DNA que sea complementaria a una secuencia encontrada en DNA genómico de *Bacillus*. La transfección de *Bacillus* con este vector se traduce en recombinación homóloga con el genoma e inserción de CHF DNA. No obstante, la recuperación e DNA genómico que codifica para CHF es más compleja que la de un vector replicado de forma exógena, debido a que se requiere digestión por enzima de restricción para separar el CHF DNA.

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de clonaje y de expresión deben contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Este gen codifica para una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo de selección. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirá en el medio de cultivo. Los genes de selección habituales codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotrópicas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica para la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son transformadas de forma exitosa con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y por lo tanto sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de la citada selección dominante utilizan los fármacos neomicina (*Southern et al., J. Molec. Appl. Genet.*, 1: 327 (1982)), ácido micofenólico (*Mulligan et al., Science*, 209: 1422 [1980]), o higromicina (*Sugden et al., Mol. Cell. Biol.*, 5:410-413 [1985]). Los tres ejemplos proporcionados anteriormente utilizan genes bacterianos bajo control eucariota para canalizar la resistencia hacia el fármaco adecuado G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico), o higromicina, respectivamente.

Otro ejemplo de marcadores seleccionados adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para recoger el ácido nucleico CHF, tal como DHFR o timidina quinasa. Los transformadores de células de mamífero son ubicados bajo presión de selección que tan solo los transformadores están adaptados para sobrevivir en virtud de haber recogido el marcador. La presión de selección es impuesta mediante el cultivo de los transformadores en condiciones en las cuales la concentración de agente de selección en el medio es modificada de forma exitosa, conduciendo con ello a la amplificación o a la selección del gen y al DNA que codifica para CHF. La amplificación es el procedimiento a través el cual los genes con mayor demanda para la producción de una proteína crítica para el crecimiento son reiterados en tandem dentro de los cromosomas de generaciones exitosas de células recombinantes. A partir del DNA amplificado se sintetizan cantidades incrementadas de CHF. Entre otros ejemplos de genes amplificables se incluyen metalotioneina-I y II, preferiblemente los genes de metalotioneina I primate, adenosina deaminasa, ornitina descarbosilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección DHFR son primeramente identificadas mediante el cultivo de la totalidad de transformadores en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se utiliza DHFR de tipo natural es la línea celular de ovario de hámster chino (CHA) en actividad DHFR, preparadas y propagadas tal y como se describe por parte de Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 (1980). Las células transformadas son después expuestas a niveles crecientes de metotrexato. Esto conduce a la síntesis de múltiples copias del gen DHFR y, de forma concomitante, múltiples copias de otros DNA que comprenden los vectores de expresión, tales como el DNA que codifica para CHF. Esta técnica de amplificación puede ser utilizada con cualquier huésped adecuado, por ejemplo, ATCC N°. CCL61, CHO-K1, a pesar de la presencia de DHFR endógeno si, por ejemplo, se utiliza un gen DHFR mutante que es altamente resistente a Mtx (EP 117.060).

Alternativamente, células huésped (particularmente huéspedes de tipo natural que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de DNA que codifican para CHF, proteína DHFR de tipo natural y otro marcador seleccionable tal como aminoglicósido 3-fosfotransferasa (APH) puede ser seleccionado mediante cultivo celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Ver la patente USA n°. 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para ser utilizado en levaduras es el gen *trp1*, presente en el plásmido de levadura YRp7 (*Stinchcomb et al., Nature* 282: 39 [1979]; *Kingsman et al., Gene*, 7: 141 [1979]; o *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 N°. 44076 o PEP4-1 (Jones, *Genetics* 85: 12 [1977]). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levadura deficiente en Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) son complementadas por plásmidos conocidos que soportan el gen Leu2.

Además, para la transformación de levaduras *Kluyveromyces* pueden utilizarse vectores derivados del plásmido circular pKD1 1,6  $\mu$ m. *Bianchi et al., Curr. Genet.* 12: 185 (1987). Más recientemente, se informó por parte de *K. lactis* acerca de un sistema de expresión para producción de quimosina de ternera recombinante a gran escala. *Van den Berg, Bio/Technology* 8: 135 (1990). Se han descrito también vectores de expresión multicopia estables para la secreción de suero-albúmina humana recombinante madura por medio de cepas industriales de *Kluyveromyces*. *Fleer et al., Bio/Technology* 9: 968-975 (1991).

## (iv) Componente favorecedor

- Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un favorecedor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente unido al ácido nucleico CHF. Los favorecedores son secuencias no traducidas localizadas aguas arriba (5') del codón de partida de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 bp) que controla la transcripción y traducción de secuencias de ácido nucleico particulares, tal como la secuencia de ácido nucleico CHF, a la cual los mismos se encuentran unidos operativamente. Los citados favorecedores caen habitualmente dentro de dos tipos, inducibles y constitutivos. Los favorecedores inducibles son favorecedores que inician niveles incrementados de transcripción a partir de DNA bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En este momento, se tiene conocimiento de la existencia de un gran número de favorecedores reconocidos por una diversidad de células huésped potenciales. Estos favorecedores están operativamente unidos a DNA que codifica para CHF, mediante la eliminación del favorecedor a partir de la fuente de DNA, por medio de digestión con enzima de restricción e inserción de la secuencia de favorecedor aislado en el vector. Tanto la secuencia favorecedora de CHF como muchos favorecedores heterólogos pueden ser utilizados para dirigir la amplificación y/o la expresión del DNA CHF. No obstante, resultan preferidos los favorecedores heterólogos, dado que los mismos permiten generalmente una transcripción más elevada y alcanzar rendimientos más elevados de CHF producido de forma recombinante, en comparación con el favorecedor CHF de origen natural.
- Entre los favorecedores adecuados para ser utilizados con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de favorecedores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa (Chang *et al.*, *Nature* 275: 615 [1978]; y Goeddel *et al.*, *Nature* 281: 544 [1979]), fosfatasa alcalina, un sistema favorecedor triptófano (trp) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 [1980] y EP 36.776), y favorecedores híbridos tales como el favorecedor tac (deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 [1983]). No obstante, también resultan adecuados otros favorecedores híbridos. Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo con ello que un experto en la materia pueda unirlos a DNA que codifica para CHF (Siebenlist *et al.*, *Cell*, 20:269 [1980]), utilizando elementos de unión o adaptadores para suministrar cualquier punto de restricción. Los favorecedores utilizados en sistemas bacterianos contendrán también una secuencia Shine-Dalgarro (S.D.) unida de forma operativa al DNA que codifica para CHF.
- Se conocen favorecedores de secuencias para eucariotas. Virtualmente, la totalidad de genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente entre 25 y 30 bases aguas arriba del punto en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada entre 70 y 80 bases aguas arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CXCAAT, en la que X puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayor parte de genes eucariotas se encuentra una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A a la terminación 3' de la secuencia de codificación. La totalidad de estas secuencias son insertadas de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.
- Entre los ejemplos de secuencias favorecedoras adecuadas para ser utilizadas con huéspedes de levadura se incluyen los favorecedores para 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255: 2073 [1980]) u otros enzimas glicolíticos (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 [1968]; y Holland, *Biochemistry*, 17: 4900 [1978]), tales como enolasa, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.
- Otros favorecedores de levadura, los cuales son favorecedores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones favorecedoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociados con metabolismo de nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables para la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y favorecedores adecuados para ser utilizados en expresión de levadura son descritos adicionalmente en Hitzeman *et al.*, EP 73.657. Los reforzadores de levadura son también utilizados de forma ventajosa con favorecedores de levadura.
- La transcripción de CHF a partir de vectores en células huésped de mamíferos es controlada, por ejemplo, mediante favorecedores obtenidos a partir del genoma de virus tales como poliomavirus, virus de viruela aviar (UK 2.211.504, publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tales como Adenovirus 2), papilomavirus bovino, sarcomavirus aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de hepatitis B y, muy preferiblemente, Simian Virus 40 (SV40), procedentes de favorecedores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el favorecedor actina o un favorecedor inmunoglobulina, procedentes de favorecedores de choque térmico y a partir del favorecedor asociado normalmente con la secuencia de CHF, siempre y cuando los citados favorecedores sean compatibles con los sistemas celulares del huésped. Los favorecedores tempranos y tardíos del virus SV40 son obtenidos de forma adecuada en forma de fragmento de restricción SV40, el cual también contiene el origen vírico SV40 de replicación. Fiers *et al.*, *Nature*, 273: 113 (1978); Mulligan y Berg, *Science* 209: 1422-1427 (1980); Pavlakis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 7398-7402 (1981). El favorecedor temprano inmediato de cilomegalovirus humano es obtenido de forma adecuada en forma de fragmento de restricción HindIII. Greenaway *et al.*, *Gene*, 18: 355-360 (1982). En la patente USA n° 4.419.446 se describe un sistema para la expresión de DNA en huéspedes mamíferos utilizando el papilomavirus bovino como vector. En la patente USA n° 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Ver también Gray *et al.*, *Nature*, 295: 503-508 (1982) acerca de la expresión de cDNA que codifica para inmunointerferon en células de mono; Reyes *et al.*, *Nature* 297: 598-601 (1982) sobre expresión de  $\beta$ -interferón cDNA humano en células de ratón bajo control de un favorecedor timidina quinasa procedente de virus herpes simples; Cannani y Berg; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 5166-5170 (1982) sobre

# ES 2 276 393 T3

expresión del gen interferón  $\beta 1$  humano en células de conejo y de ratón cultivadas; y Gorman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6777-6781 (1982) sobre expresión de secuencias CAT bacterianas en células de riñón de mono CV-1; embrio-fibroblastos de pollo, células de ovario de hámster chino, células HeLa y células NIH-3T3 de ratón utilizando la repetición terminal larga de sarcoma virus de Rous como favorecedor.

5

## (v) Componente elemento reforzador

La transcripción de un DNA que codifica para el CHF de esta invención por medio de eucariotas superiores se ve a menudo incrementada mediante la inserción de una secuencia reforzadora en el vector. Los reforzadores son elementos de DNA que actúan en *cis*, habitualmente aproximadamente entre 10 y 300 bp, que actúan sobre un favorecedor para incrementar su transcripción. Los reforzadores son relativamente independientes en cuanto a orientación y posición, habiendo sido encontrados en 5' (Laimins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 993 [1981]) y 3' (Lusky *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 3: 1108 [1983]) de la unidad de transcripción, dentro de un intrón (Banerji *et al.*, *Cell* 33: 729 [1983]), al igual que dentro de la propia secuencia de codificación (Osborne *et al.*, *Mol. Cell Bio.*, 4: 1293 [1984]). Se conocen actualmente muchas secuencias reforzadoras procedentes de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Habitualmente, no obstante, se utilizará un reforzador procedente de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el reforzador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (bp 100-270). El reforzador favorecedor temprano eucariota, el reforzador poliomavirus sobre el lado tardío del origen de replicación y reforzadores adenovirus. Ver también Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos reforzadores para activación de favorecedores eucariotas. El reforzador puede ser empalmado en el vector en una posición 5' ó 3' de la secuencia que codifica para CHF, pero está preferiblemente localizado en un punto 5' del favorecedor.

10

## (vi) Componente de terminación de transcripción

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) contendrán también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del mRNA. Las citadas secuencias se encuentran habitualmente disponibles a partir de regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3', de DNAs o cDNAs víricos o eucariotas. Estas regiones contienen segmentos de nucleótido transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte 15 no traducida del mRNA que codifica para CHF.

20

## (vii) Construcción y análisis de vectores

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes listados anteriormente utiliza 25 técnicas de unión habituales. Plásmidos aislados o fragmentos de DNA son rotos, adaptados y religados en la forma deseada para generar los plásmidos requeridos.

30

Para que los análisis confirmen las secuencias correctas en plásmidos construidos, las mezclas de unión son utilizadas para transformar la cepa *E. coli* K12 294 (ATCC 31.446) y los transformadores exitosos seleccionados por su resistencia a ampicilina o tetraciclina, cuando resulte adecuado. Los plásmidos procedentes de transformadores son preparados, analizados mediante digestión con endonucleasa de restricción, y/o secuenciados mediante el procedimiento de Messing *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 9: 309: (1981) o mediante el procedimiento de Maxam *et al.*, *Methods in Enzymology*, 65: 499 (1980).

35

## (viii) Vectores de expresión transitorios

En la práctica de esta invención resultan particularmente útiles los vectores de expresión que proporcionan la expresión transitoria en células de mamíferos de DNA que codifica para CHF. En general, la expresión transitoria conlleva la utilización de un vector de expresión que es capaz de replicarse de manera eficaz en una célula huésped, de tal forma que la célula huésped acumule muchas copias del vector de expresión y, a su vez, sintetice elevados niveles de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Sambrook *et al.*, *supra*, pp. 16.17-16.22. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, permiten la identificación positiva adecuada de polipéptidos codificados por DNAs clonados, al igual que el cribado rápido de los citados polipéptidos en la búsqueda de las propiedades biológicas y fisiológicas adecuadas. Así pues, los sistemas de expresión transitorios resultan particularmente adecuados en la invención, a los efectos de identificar análogos y variantes de CHF de origen natural, los cuales sean CHF biológicamente activos.

40

## (ix) Vectores de células de vertebrado ejemplarizados adecuados

En Gething *et al.*, *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281: 40-46 (a979); EP 117.060 y EP 117058 se describen otros procedimientos, vectores y células huésped adecuadas para adaptación a la síntesis de CHF en cultivos celulares vertebrados recombinantes. El derivado pRK5 (EP 307.247) o pSV16V (WO 91/08291, publicada el 13 de junio de 1991), es un plásmido particularmente útil para la producción de CHF en cultivos celulares de mamíferos. El derivado de pRK5 pRK5B (Colmes *et al.*, *Science*, 253: 1278-1280 [1991]) resulta aquí particularmente adecuado para la citada expresión.

## ES 2 276 393 T3

### D. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para el clonado o la expresión de los vectores del presente documento son las células procariotas, de levadura o las eucariotas superiores descritas anteriormente. Entre las procariotas a tal propósito se incluyen las eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como Escherichia, por ejemplo, *E. coli*, Enterobacter, Enwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, Serratia, por ejemplo, *Serratia marcescans* y Shigella, al igual que Bacilli, tales como *B. Subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. Licheniformis* 41P, descrito en DD 266.710, publicado el 12 de abril de 1989), Pseudomonas tales como *P. aeruginosa* y Streptomyces. Un huésped de clonación *E. coli* preferido es el *E. coli* 294 (ATCC 31.446), si bien también resultan adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitativos. La cepa W3110 es un huésped particularmente preferido o huésped padre dado que es una cepa huésped común para fermentaciones de producto de DNA recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticos. Por ejemplo, la cepa W3110 puede ser modificada para efectuar una mutación genética en los genes que codifican para proteínas endógenas para el huésped, incluyéndose entre los ejemplos de los citados huéspedes la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, la cual posee el genotipo completo tonAΔ; la cepa 9E4 de *E. coli* W3110, la cual posee el genotipo completo de tonAΔ ptr3; la cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATTC 55.244), la cual posee el genotipo completo tonA prt3 phoAΔ,E15AΔ (argF-lac)169 ΔdegP ΔompT kan $r$ ; la cepa 37D6 de *E. coli* W3110, la cual posee el genotipo completo de tonA prt3 phoAΔE15AΔ(argF-lac)169 AdeG P ΔompT kan $r$ ; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación de supresión degP resistente no kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene la proteasa periplásmica mutante descrita en la patente n° 4.946.783, concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, resultan adecuados los procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

Además de procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras, resultan huéspedes de expresión o clonación adecuados para vectores de codifican para CHF. El *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadero común es la que más habitualmente se utiliza de entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. No obstante, para el presente caso resultan también de utilidad un determinado número de otros géneros, especies y cepas, tales como *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 90: 140 [1981]; EP 139.383, publicada el 2 de mayo de 1985); los huéspedes Kluyveromycetes (patente USA n° 4.943.529; Fleer *et al.*, *supra*), tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacterial.*, 73 [1983], *K. fragilis* (ATCC 12, 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, *supra*); *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowiae* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreektishna *et al.*, *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichodezia recia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); Schwanniomyces tales como *Schwanniomyces occidentales* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990), y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, Neurospora, *Penicillium Tolypocladium* (WO 91/00357, publicada el 10 de enero de 1991) y huéspedes Aspergillus, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Común.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Nelly and Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]).

Las células huésped adecuadas para la producción de CHF proceden de organismos multicelulares. Las citadas células huésped son capaces de efectuar un procesado complejo y de actividades de glicosilación. En principio, cualquier cultivo celular elevado resulta manejable, ya sea tanto si procede de cultivos vertebrados como invertebrados. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen las células de plantas y de insectos. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huésped de insecto insectos permisivas, a partir de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga); *Aedes aegypti* (mosquito); *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombix mori*. Ver, por ejemplo, Luckow *et al.*, *BIO/Technology*, 6: 47-55 (1988); Millar *et al.*, en *Genetic Engineering*, Setlow, J.K. *et al.*, eds., Vol 8 (Plenum Publishing, 1986), pp 277-279; y Maeda *et al.*, *Nature*, 315: 592-594 (1985). Una variedad de cepas víricas para transfección se encuentra disponible públicamente, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombix mori* NPV, y los citados virus pueden utilizarse como virus en el presente caso, según la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Los cultivos celulares de plantas de algodón, com, patata, haba de soja, petunias, tomate y tabaco pueden ser utilizados como huéspedes. Habitualmente, las células de plantas son transfecadas mediante incubación con determinadas cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, la cual ha sido manipulada previamente para contener el DNA CHF. Durante la incubación del cultivo celular de la planta con *A. tumefaciens*, el DNA que codifica para CHF es transferido al huésped de la célula de la planta de tal forma que el mismo es transfecado y expresará, en condiciones adecuadas, el DNA CHF. Además se encuentran disponibles secuencias señal y reguladoras compatibles con las células de las plantas, tales como las secuencias de favorecedor nopalina sintasa y las de señal de poliadenilación. Depicker *et al.*, *J. Mol. Appl. Gen.*, 1: 561 (1982). Además, segmentos de DNA aislados a partir de la región aguas arriba del gen T-DNA 780 son capaces de activar o de incrementar los niveles de transcripción de los genes que se expresan en plantas en tejido de planta que contiene DNA. EP 321.196, publicada el 21 de junio de 1989.

No obstante, el mayor interés existe en las células de vertebrados y la propagación de células de vertebrado en cultivos (cultivos tisulares) se ha convertido en un procedimiento rutinario en los años recientes (*Tissue Culture*, Academia Press, Kruse and Patterson, editors [1973]). Entre los ejemplos de líneas celulares de huésped de mamífero

de utilidad se encuentran una línea celular CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC, CRL, 1651); una línea celular de riñón embrionario humano (células 293 o 2893 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36: 59 [1977]); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL, 10); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub and Chasin, *Procd. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216 [1980+]; células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23: 243-251 [1980]); células de riñón de ratón (CV1 ATCC CCL.70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76; ATCC CRL, 1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL, 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL, 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (HepG2, HB 8065); células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383: 44-68 [1982]); células MRC 5; células FS4; y una línea de hematoma humano (Hep G2).

Las células huésped son transfectadas y preferiblemente transformadas con los vectores de expresión o de clonado descritos anteriormente en la presente invención y cultivados en medios nutriente convencionales modificados según resulte adecuado para la inducción de favorecedores, selección de transformadores o amplificación de los genes que codifican para las secuencias deseadas.

Transfección se refiere a la recogida de un vector de expresión por medio de una célula huésped, con independencia de si existe alguna secuencia que sea expresada de hecho. Se tiene conocimiento de la existencia de numerosos procedimientos de transfección por parte del experto en la materia ordinario, por ejemplo, CaPO<sub>4</sub> y electroporación. La transfección exitosa es generalmente reconocida cuando en el interior de la célula huésped tiene lugar alguna indicación de la operación de este vector.

Transformación significa introducción de DNA en el interior de un organismo a los efectos de que el DNA resulte replicable, ya sea como elemento extracromosómico o como integrante cromosómico. En función de la célula huésped utilizada, la transformación se efectúa utilizando técnicas habituales adecuadas para las citadas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en la sección 1.82 de Sambrook *et al., supra*, o la electroporación son generalmente utilizados para células procariotas o para otras células que contienen barreras celulares sustanciales. La infección con Agrobacterium se utiliza para la transformación de determinadas células de plantas, tal como se describe por parte de Shaw *et al.*, *Gene*, 23 315 (1983) y WO 89/05859, publicado el 29 de junio de 1989. Además, las plantas pueden ser transfectadas utilizando tratamiento con ultrasonidos, tal y como se describe en WO 91/00358, publicado el 10 de enero de 1991.

Para células de mamíferos carentes de las citadas paredes celulares, resulta preferido el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Gram. y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Aspectos generales acerca de la transformación de sistemas de huéspedes celulares de mamífero han sido descritos por Axel en la patente USA nº 4.399.216, concedida el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levadura son llevadas a cabo habitualmente por el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Procd. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3829 (1979). No obstante, para la introducción de DNA en el interior de las células pueden también utilizarse otros procedimientos, tales como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o poluciones, etc.. Para diversas técnicas para transformar células de mamíferos ver Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 1980) y Manssur *et al.*, *Nature*, 336: 348-252 (1988).

#### E. Cultivo de células huésped

Las células procariotas utilizadas para producir el polipéptido CHF de esta invención son cultivadas en medios adecuados, tal y como se describe generalmente en Sambrook *et al., supra*.

Las células huésped de mamífero utilizadas para producir el CHF de esta invención pueden ser cultivadas en una diversidad de medios. Para el cultivo de las células huésped resultan adecuados los medios comercialmente disponibles como Ham's F-10 (Sigma), F-12 (Sigma), Minimal Essential Medium ([MEM], Sigma), RPMI-1640 (Sigma), Medio Eagle Modificado por Dulbecco ([D-MEM, Sigma]) y D-MEM/F-12 (Gibco BRL). Además, cualquiera de los medios descritos, por ejemplo, en Ham y Wallace, *Methods in Enzymology*, 58: 44 (1979); Barnes and Sato, *Anal. Biochem.*, 102: 255 (1980); patentes USA nos. 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 5.122.469 o 4.560.655; patentes USA re. Nos. 30.985; WO 90/03430; o WO 87/00195, pueden ser utilizados como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede ser suplementado según sea necesario con hormonas y/o con otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina, aprotinina, y/o factor de crecimiento epidérmico ([EGF]), sales (tales como cloruro sódico, cálcico, magnésico y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleósidos (tales como adenina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco Gentamicina™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes en concentraciones finales en la banda micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. A las concentraciones adecuadas pude incluirse cualquier otro suplemento que pudiera resultar conocido por parte de los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son aquellas previamente utilizadas con la célula huésped seleccionada para expresión y resultarán evidentes por parte e los expertos en la materia.

En general, los principios, protocolos y las técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares de mamíferos *in vitro* pueden ser encontrados en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL, Press, 1991).

## ES 2 276 393 T3

Las células huésped indicadas en esta descripción abarcan células en cultivos *in vitro* al igual que células que se encuentran en un animal huésped.

### F. Detección de la expresión/amplificación genética

La amplificación y/o la expresión genética pueden ser medidas en una muestra de forma directa, por ejemplo, mediante análisis Southern convencional, análisis Northern para cuantificar la transcripción de mRNA (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 77: 5201-5205 [1980]), análisis de manchas (análisis de DNA) o mediante hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada adecuadamente, en base a las secuencias aquí proporcionadas. Pueden utilizarse varias marcas, muy habitualmente radioisótopos, particularmente <sup>32</sup>P. No obstante, pueden también utilizarse otras técnicas, tales como la utilización de nucleótidos modificados por biotina para la introducción en un polinucleótido. La biotina sirve entonces como punto de unión para avidina o anticuerpos, los cuales pueden ser marcados con una amplia variedad de marcas, tales como materiales que provocan fluorescencia, enzimas, o similares. Alternativamente, pueden utilizarse también anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de DNA, dúplex de RNA, y dúplex híbridos DNA-RNA o duplex DNA-proteína. A su vez, los anticuerpos puede ser marcados y el ensayo puede ser llevado a cabo donde el dúplex se une a una superficie, de tal forma que tras la formación del dúplex sobre la superficie, la presencia de anticuerpo unido al dúplex pueda ser detectada.

Alternativamente, la expresión genética puede ser medida mediante procedimientos inmunológicos, tales como teñido inmunohistoquímico de secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto gen. Mediante técnicas de teñido inmunohistoquímico se prepara una muestra celular, habitualmente mediante deshidratación y fijación seguido de reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto genético acoplado, donde las marcas resultan habitualmente visualmente detectables, tales como marcas enzimáticas, marcas fluorescentes, marcas luminiscentes y similares. Una técnica de teñido particularmente sensible adecuada para ser utilizada en la presente invención se describe el Hsu *et al.*, *Am. J. Clin. Path.*, 75: 734-738 (1980).

Los anticuerpos útiles para el teñido inmunohistoquímico y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser o bien monoclonales o policlonales y pueden ser preparados en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden ser preparados frente a polipéptidos CHF de origen natural o frente a péptidos sintéticos basados en decenas de DNA proporcionadas el en presente documento, tal y como se describe adicionalmente en la Sección 4 que sigue.

### G. Purificación de polipéptido CHF

El CHF es preferiblemente recuperado a partir de medio de cultivo en forma de polipéptido secretado, aunque el mismo puede ser también recuperado a partir de lisatos de células huésped cuando se produce de forma directa sin una señal secretora.

Cuando el CHF es producido en una célula recombinante distinta de una de origen humano, el CHF está completamente exento de proteínas celulares o de polipéptidos de origen humano. No obstante, para obtener preparaciones que sean sustancialmente homogéneas en relación con el CHF es necesario purificar el CHF procedente de proteínas o polipéptidos celulares. Como primer paso, el residuo de partículas, ya sea de células huésped o de fragmentos ligados, es eliminado, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración, opcionalmente, la proteína puede ser concentrada con un filtro de concentración de proteína disponible comercialmente, seguido de separación del CHF de otras impurezas a través de uno o más pasos seleccionados de entre cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento en columna de intercambio fónico (por ejemplo, sobre DEAE o matrices que contienen grupos carboximetilo o sulfopropilo), cromatografía sobre Ble Sepharose, CM Blue Sepharose, MONO-Q, MONO-S, lental-lectina-Sepharose, WGA-Sepharose, ConA-Sepharose, Ether Toyopearl, Ether Toyopearl, Butyl Toyopearl, Phenyl Toyopearl o proteína A-Sepharose, cromatografía SDS-PAGE, cromatografía de sílice, cromatofocalización, HPLC en fase inversa (por ejemplo, gel de sílice con grupos alifáticos colgantes), filtración con gel utilizando, por ejemplo, tamiz molecular Sephadex o cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía sobre columnas que se unen de forma selectiva al CHF y precipitación con sulfato amónico o etanol. En cualquiera de los pasos precedentes puede incluirse un inhibidor de proteasa para inhibir la proteólisis. Entre los ejemplos de inhibidores adecuados se incluyen el fluoruro de fenilmetilsulfonio (PMSF), leupeptina, pepstatina, aprotinina, fluoruro de 4-(2-aminoetil) bencenosulfonilo clorhidrato de bestatina, quimoestatina, y benzamidina.

Un esquema de purificación preferido conlleva ajustar el medio de cultivo acondicionado para células transfectadas con el clón relevante a NaCl 1,5M y aplicarlo a una columna Butyl Toyopearl<sup>TM</sup>. La columna es lavada con clorhidrato de Tris[hidroximetil]aminometano (TRIS-HCl), pH 7,5; contenido NaCl, y eluir la actividad con TRIS-HCl, pH 7,5, contenido de tensioactivo Zwittergent<sup>TM</sup> 3-10 10 mM. El pico de actividad es ajustado a NaCl 150 mM, pH 8,0; y aplicado a una columna MONO-Q Fast Flow. Esta columna es lavada con TRIS-HCl, pH 8,0, contenido NaCl y octilglucósido. Se encuentra actividad en la fracción del flujo de arrastre. El material activo es después aplicado a una columna C4 de fase inversa en TFA 0,1%, acetonitrilo 10% y eluido con un gradiente de TFA 0,1% hasta 80%. La actividad fracciona a aproximadamente 15-30 kDa sobre columnas de filtración en gel. Para la resolución y recuperación se espera resulte necesaria la presencia de un caotropo, tal como guanidina-HCl.

Las variantes de CHF en las cuales se hayan eliminado, insertado o sustituido restos son recuperadas de la misma forma que el CHF de origen natural, teniendo en cuenta cualquier cambio sustancial en las propiedades ocasionadas por la variación. Por ejemplo, la preparación de una fusión CHF con otra proteína o polipéptido, por ejemplo, un antí-

geno vírico o bacteriano, facilita la purificación; para adsorber el polipéptido de fusión puede utilizarse una columna de inmunoafinidad que contiene anticuerpo para el antígeno. Para absorber la variante CHF uniendo la misma a al menos un inmunopeptíope remanente pueden utilizarse columnas de inmunoafinidad, tales como una columna anti-CHF policlonal de conejo. Para inhibir la degradación proteolírica durante la purificación puede también utilizarse un 5 inhibidor de proteasa, tal como los definidos anteriormente y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes advenedizos. Un experto en la materia valorará el hecho de que los procedimientos adecuados para el CHF de origen natural pueden requerir modificación para tener en cuenta los cambios en el carácter del CHF o de sus variantes tras producción en cultivo celular.

10      *H. Modificaciones covalentes de polipéptidos CHF*

Dentro del campo de protección de esta invención se incluyen modificaciones covalentes de polipéptidos CHF. Tanto el CHF de origen natural como las variantes de secuencia de aminoácidos del CHF de origen natural pueden ser 15 modificadas covalentemente. Un tipo de modificación covalente incluida dentro del tipo de protección de la presente invención es la preparación de un fragmento de CHF variante. Los fragmentos de CHF variante que tienen hasta un total de aproximadamente 40 aminoácidos pueden ser preparados adecuadamente mediante síntesis química o mediante rotura enzimática o química del polipéptido CHF variante o de longitud completa. Otros tipos de modificaciones 20 del CHF o de fragmentos de los mismos son introducidas en la molécula mediante la reacción de restos aminoácidos objetivo del CHF, o fragmentos de los mismos, con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con restos N- o C-terminales.

Los restos cisteinilo se hacen reaccionar, muy habitualmente, con  $\alpha$ -haloacetatos (y con las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para proporcionar derivados carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos cisteinilo son también derivatizados mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido  $\alpha$ -bromo- 25  $\beta$ -(5-imidozolil)propiónico, cloroacetilfosfato, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, p-cloromercurio-benzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol.

Los restos histidilo son derivatizados mediante reacción con dietilpirocárbonato a pH 5,5-7,0, debido a que este 30 agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo puede resultar también útil, llevándose a cabo la reacción en medio cacodilato sódico 0,1 M, a pH 6,0.

Los restos lisinilo y amino-terminales son hechos reaccionar con anhídrido succínico o con otros ácido carboxílicos. La derivatización con estos agentes produce el efecto de invertir la carga de los restos lisinilo. Entre la relación de 35 reactivos adecuados para privatizar restos que contienen grupos  $\alpha$ -amino se incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pantanodiona y reacción catalizada por transaminasa con glicoxilato.

Los restos arginilo son modificados mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre los cuales 40 se encuentra el fenilglicoxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y la ninhidrina. La derivatización de los restos arginina requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas, debido al elevado  $pK_a$  del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, al igual que con el grupo amino-epsilon de arginina.

Pueden efectuarse modificaciones específicas de restos tirosilo, con particular interés en la introducción de marcas 45 espectrales en los restos tirosilo mediante reacción con compuestos diazonio aromáticos o con tetranitrometano. Muy habitualmente, para formar las especies de derivados O-acetiltirosilo y 3-nitro se utilizan N-acetiliidazol y tetranitrometano, respectivamente. Los restos tirosilo son yodados utilizando  $^{125}I$  ó  $^{131}I$ , para preparar proteínas marcadas que son utilizadas en radio-inmunoensayos, resultando adecuado el procedimiento de clorammina T descrito anteriormente.

50 Los grupos de cadena lateral carboxilo (aspartilo o glutamilo) son modificados selectivamente mediante reacción con carbodiimidas ( $R=N=C=N-R'$ ), en la que R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los restos aspartilo y glutamilo son convertidos en restos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

55 La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil para reticular CHF a una matriz soporte insoluble en agua o a una superficie utilizada en un procedimiento para purificar anticuerpos anti-CHF y viceversa. Entre los agentes reticulantes utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehido, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalíclico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres desuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidas funcionales tales como 60 la bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes derivatizantes tales como metil-3-[p-azidofenil]ditio)propioimidato generan intermedios fotoactivables que son capaces de formar retículos en presencia de la luz. Alternativamente, matrices reactivas insolubles en agua tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes USA n°s 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 y 4.330.440 son utilizados para inmovilización de proteínas.

65 Los restos glutamino y asparaginilo son desmidados frecuentemente a los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente. Estos restos son desamidados en condiciones neutras o básicas. La forma desamidada de estos restos cae dentro del campo de protección de esta invención.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y de lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983]), acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

5 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido CHF incluido dentro del campo de protección de esa invención comprende la alteración del patrón de glicosilación de origen natural del polipéptido. Por alteración se quiera dar a entender supresión de uno o más restos carbohidrato encontrados en el CHF de origen natural y/o adición de uno o más puntos de glicosilación que no se encuentran presentes en el CHF de origen natural.

10 La glicosilación de polipéptidos tiene lugar habitualmente a través de unión a -N o a -O. Unida a -N se refiere a la unión del resto carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en la que X es cualquier aminoácido con excepción de prolina, son las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto carbohidrato a la cadena lateral asparagina. Así pues, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un potencial punto de glicosilación. Glicosilación unida a -O hace referencia a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxíminoácido, muy habitualmente serina o treonina, si bien también pueden utilizarse 5-hidroxilisina o 5-hidroxiprolina.

20 La adición de puntos de glicosilación al polipéptido de CHF se alcanza de forma conveniente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos, de tal forma que la misma contenga una o más de las secuencias de tripéptido descritas anteriormente (para puntos de glicosilación unidos a N). La alteración puede ser también efectuada mediante la adición de, o la sustitución de, uno o más restos serina o treonina a la secuencia de CHF de origen natural (para puntos de glicosilación unidos a -O). Para facilitar las cosas, la secuencia de aminoácidos del CHF de origen natural es 25 preferiblemente alterada a través de cambios a nivel de DNA, particularmente mediante la mutación del DNA que codifica para el polipéptido CHF de origen natural en bases preseleccionadas, de tal forma que se generen codones que serán traducidos en los aminoácidos deseados. La mutación(es) de DNA puede(n) ser llevada(s) a cabo mediante la utilización de procedimientos descritos anteriormente en la sección 2B.

30 Otro medio de incrementar el número de restos carbohidrato sobre el polipéptido CHF es a través de acoplamiento químico o enzimático de glicósidos con el polipéptido. Estos procedimientos presentan la ventaja de que no requieren la producción del polipéptido en una célula huésped que tenga capacidad de glicosilación para la glicosilación unida a N- o unida a -O. En función del modo de acoplamiento utilizado, el(las) azúcar(es) puede(n) estar unido(s) a (a) arginina e histidina, (b) a grupos carboxilo libres, (c) a grupos sulfidrilo libres tales como los de cisteina, (d) a grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) a restos aromáticos tales como los de fenilalanina, tirosina o triptófano, o (f) al grupo amida de glutamina. Estos procedimientos se describen en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

40 La eliminación de cualquier resto carbohidrato presente en el polipéptido de CHF puede ser lograda química o enzimáticamente. La desglicosilación química requiere exposición del polipéptido al compuesto ácido trifluorometansulfónico o a un compuesto equivalente. Este tratamiento da lugar a la rotura de la mayor parte o de la totalidad de los azúcares, con excepción del azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), a la vez que el polipéptido permanece intacto. La desglicosilación química es descrita por Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 45 52 (1987) y por Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981). La rotura enzimática de los restos carbohidrato sobre polipéptidos puede ser alcanzada mediante la utilización de una diversidad de endo y exoglicosidasas, tal y como se describe en Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138: 350 (1987).

50 La glicosilación en potenciales puntos de glicosilación puede ser evitada mediante la utilización del compuesto tunicamicina, tal y como se describe por parte de Duskin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 3105 (1982). La tunicamicina bloquea la formación de uniones proteína-N-glicosídico.

Otro tipo de modificación covalente de CHF comprende la unión de polipéptido CHF a uno de entre una diversidad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma expuesta en las patentes USA n°s. 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 o 4.179.337.

60 El CHF puede ser también atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-[metilmetacrilato], respectivamente), en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas o en macroemulsiones. Las citadas técnicas son descritas en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, Ed. (1980).

65 Las preparaciones de CHF resultan también útiles en la generación de anticuerpos, como habituales en ensayos para CHF (por ejemplo, mediante el marcado de CHF para su utilización como habitual en un radio-inmunoensayo, inmunoensayo unido a enzima o en un ensayo de radio-receptor), en técnicas de purificación por afinidad y en ensayos de unión a receptor de tipo competitivo, cuando son marcados con radio-yodo, enzimas, fluoróforos, marcadores de rotación y similares.

# ES 2 276 393 T3

Dado que a menudo resulta difícil predecir con anticipación las características de una variante de CHF, se valorará el hecho de que hará falta algo de cribado de la variante recuperada para seleccionar la variante óptima. Se puede cribar en búsqueda de actividad hipertrófica cardíaca reforzada, anti-arrítmica, inotrópica, o neurotrófica, posesión de actividad antagonista de CHF, niveles de expresión incrementados, estabilidad oxidativa, capacidad para ser secretado en rendimientos elevados y similares. Por ejemplo, un cambio en el carácter inmunológico de la molécula de CHF, tal como la afinidad para un determinado anticuerpo, se mide mediante un inmunoensayo de tipo competitivo. La variante ensayada para los cambios en la supresión o reforzamiento de sus actividades hipertróficas, anti-arrítmicas, inotrópicas y neurotróficas, por comparación con las respectivas actividades observadas para el CHF de origen natural en el mismo ensayo (utilizando, por ejemplo, los ensayos hipertróficos y neurotróficos descritos en los ejemplos que siguen a continuación). Otras modificaciones potenciales de las propiedades de la proteína o polipéptido, tales como la estabilidad redox o térmica, hidrofobicidad, susceptibilidad para la degradación proteolítica, o la tendencia para acumularse sobre soportes o en multimeros son ensayadas a través de procedimientos bien conocidos en la técnica.

## I. Antagonistas de CHF

Los antagonistas de CHF pueden ser preparados mediante la utilización de la familia pronosticada de receptores de CHF (la familia de receptores GH/citoquina, incluyendo el CNTF, LIF, una subfamilia del receptor M de oncostatina). Así pues, el receptor puede ser clonado por expresión a partir de la familia; después se prepara una forma soluble del receptor, mediante la identificación del dominio extracelular y recorte del dominio transmembrana a partir del mismo. La forma soluble del receptor puede entonces ser utilizada como un antagonista, o el receptor puede ser utilizado para cribar las moléculas pequeñas que antagonizarían la actividad de CHF.

Alternativamente, utilizando la secuencia murina mostrada en la Figura 1 o la secuencia humana mostrada en la Figura 5, se preparan variantes de CHF de origen natural que actúan como antagonistas. Dado que la familia de receptor GH/citoquina es conocida por poseer dos puntos de unión sobre el ligando, los puntos de unión al receptor de CHF pueden ser determinados mediante estudios de unión y uno de ellos eliminado mediante técnicas habitual (supresión o sustitución radical), a los efectos de que la molécula actué como un antagonista. La actividad antagonista puede ser determinada mediante diversos medios, incluyendo ensayos de hipertrofia y neurotróficos descritos en el presente documento.

## J. Ensayo de hipertrofia

Para ensayar la actividad hipertrófica, se utiliza preferiblemente un ensayo miniaturizado. En este ensayo, el medio utilizado permite a las células sobrevivir a una densidad de placa baja, en ausencia de suero. Mediante la disposición en placa directamente en este medio, se eliminan los pasos de lavado, lo que se traduce en la eliminación de menos células. La densidad de placa es importante: muchas menos células y la supervivencia es reducida; muchas más células y miocitos comienzan a auto-inducir hipertrofia.

Los pasos involucrados son:

- (a) ubicar en placas de 96 pocillos con una suspensión de miocitos, a una densidad de aproximadamente  $7,5 \times 10^4$  células por mL en medio D-MEM/F-12 suplementado con al menos insulina, transferrina y aprotinina;
- (b) cultivar las células;
- (c) añadir una sustancia que tiene que ser sometida a ensayo (tal como una acerca de la cual se tenga la sospecha de que contiene un CHF);
- (d) cultivar las células con la sustancia; y
- (e) medir la hipertrofia.

El medio puede ser suplementado con elementos adicionales, tales como EGF, que aseguran una viabilidad más prolongada de las células, pero los citados suplementos no resultan esenciales. El medio D-MEM/F-12 está disponible en Gibco BRL, Gaithersburg, MD, y comprende uno de los siguientes medios:

ES 2 276 393 T3

<b>Componente</b>	<b>11320 1 x Líquido (mg/L)</b>	<b>11321 1 x Líquido (mg/L)</b>	<b>11330 1 x Líquido (mg/L)</b>	<b>11331 1 x Líquido (mg/L)</b>	<b>12400 Polvo (mg/L)</b>	<b>12500 Polvo (mg/L)</b>
<b>AMINOACIDOS</b>						
L-alanina	4,45	4,45	4,45	4,45	4,45	4,45
L-Arginina HCl	147,50	147,50	147,50	147,50	147,50	147,50
L-Asparagina H <sub>2</sub> O	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50	7,50
Acido L-aspártico	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65	6,65
L-cisteina.HCl.H <sub>2</sub> O	17,56	17,56	17,56	17,56	17,56	17,56
L-cisteina.2HCl	31,29	31,29	31,29	31,29	31,29	31,29
Äcido L-glutámico	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35	7,35
L-glutamina	365.00	365.00	365.00	365.00	365.00	365.00
Glicina	18,75	18,75	18,75	18,75	18,75	18,75

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 276 393 T3

Componente	11320	11321	11330	11331	12400	12500
	<u>1 x</u> <u>Líquido</u> (mg/L)	<u>1 x</u> <u>Líquido</u> (mg/L)	<u>1 x</u> <u>Líquido</u> (mg/L)	<u>1 x</u> <u>Líquido</u> (mg/L)	<u>Polvo</u> (mg/L)	<u>Polvo</u> (mg/L)
L-histidina.HCl.H <sub>2</sub> O	31,48	31,48	31,48	31,48	31,48	31,48
L-iso-leucina	54,47	54,47	54,47	54,47	54,47	54,47
L-leucina	59,05	59,05	59,05	59,05	59,05	59,05
L-lisina.HCl	91,25	91,25	91,25	91,25	91,25	91,25
L-metionina	17,24	17,24	17,24	17,24	17,24	17,24
L-fenilalanina	35,48	35,48	35,48	35,48	35,48	35,48
L-prolin	17,25	17,25	17,25	17,25	17,25	17,25
L-serina	26,25	26,25	26,25	26,25	26,25	26,25
L-treonina	53,45	53,45	53,45	53,45	53,45	53,45
L-triptófano	9,02	9,02	9,02	9,02	9,02	9,02
L-tyrosina.2Na.2H <sub>2</sub> O	55,79	55,79	55,79	55,79	55,79	55,79
L-valina	52,85	52,85	52,85	52,85	52,85	52,85
SALES INORGANICAS						
CaCl <sub>2</sub> anhidro	116,60	116,60	116,60	116,60	116,60	116,60
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013	0,0013
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,417	0,417	0,417	0,417	0,417	0,417
KCl	311,80	311,80	311,80	311,80	311,80	311,80
MgCl <sub>2</sub>	28,64	28,64	28,64	28,64	28,64	28,64
MgSO <sub>4</sub>	48,84	48,84	48,84	48,84	48,84	48,84
NaCl	6999,50	6999,50	6999,50	6999,50	6999,50	6999,50
NaHCO <sub>3</sub>	2438,00	2438,00	2438,00	2438,00	-----	-----
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	62,50	62,50	62,50	-----	62,50	62,50
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	71,02	71,02	71,02	-----	71,02	71,02
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,432	0,432	0,432	0,432	0,432	0,432
OTROS COMPONENTES						

ES 2 276 393 T3

<b>Componente</b>	<b>11320 1 x Líquido (mg/L)</b>	<b>11321 1 x Líquido (mg/L)</b>	<b>11330 1 x Líquido (mg/L)</b>	<b>11331 1 x Líquido (mg/L)</b>	<b>12400 Polvo (mg/L)</b>	<b>12500 Polvo (mg/L)</b>
D-glucosa	3151,00	3151,00	3151,00	3151,00	3151,00	3151,00
HEPES	-----	-----	3574,50	3574,50	3574,50	-----
Na hipoxantina	2,39	2,39	2,39	2,39	2,39	2,39
Acido linoleico	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042	0,042
Acido lipoico	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105	0,105
Rojo fenol	8,10	8,10	8,10	8,10	8,10	8,10
Putrescina.2H <sub>2</sub> O	0,081	0,081	0,081	0,081	0,081	0,081
Piruvato sódico	55,00	55,00	55,00	55,00	55,00	55,00
VITAMINAS						
Biotina	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035	0,0035
D-Ca pantotenato	2,24	2,24	2,24	2,24	2,24	2,24
Cloruro de colina	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98	8,98
Ácido fólico	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65	2,65
i-Inositol	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60	12,60
Niacinamida	2,02	2,02	2,02	2,02	2,02	2,02
Piridoxal-HCl	2,00	-----	2,00	-----	2,00	2,00
Piridoxina HCl	0,031	2,031	0,031	2,031	0,031	0,031
Riboflavina	0,219	0,219	0,219	0,219	0,219	0,219
Tiamina HCl	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17	2,17
Timidina	0,365	0,365	0,365	0,365	0,365	0,365
Vitamina B <sub>12</sub>	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68

El ensayo de hipertrofia preferido comprende:

- (a) precalentar los pocillos de placas de cultivo de tejido de 96 pocillos con un medio que contiene suero de ternera, preferiblemente medio D-MEM/F-12 que contiene 4% de suero de ternera fetal, en el que preferiblemente los pocillos son incubados con el medio durante aproximadamente ocho horas, a aproximadamente 37°C;
- (b) eliminar el medio;
- (c) colocar en placa una suspensión de miocitos en los 60 pocillos internos, a a razón de  $7,5 \times 10^4$  células por mL, en medio D-MEM/F-12, suplementado con insulina, transferrina y aproteína;
- (d) cultivar los miocitos durante al menos 24 horas;
- (e) añadir la sustancia de prueba;
- (f) cultivar las células con la sustancia de prueba (preferiblemente durante aproximadamente 24-72 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 48 horas); y
- (g) medir la hipertrofia, preferiblemente con tinte violeta cristal.

# ES 2 276 393 T3

Preferiblemente, el medio utilizado en el paso (c) es un medio libre de suero que contiene también penicilina/estreptomicina (pen/sterp) y glutamina. Muy preferiblemente, el medio contiene 100 mL de D-MEM/F-12, 100  $\mu$ L de transferrina (10 mg/mL), 20  $\mu$ L de insulina (5 mg/mL), 50  $\mu$ L de aprotinina (2 mg/mL); 1 mL de pen/sterp (JRC Biosciences N°. 59602-77P) y 1 mL de L-glutamina (200 mM).

5 La capacidad de ensayo de 1000 muestras únicas por semana acoplada con el requisito de tamaño pequeño de muestra de 100 pL o inferior ha permitido un clonado de expresión y purificación de proteína que hubiera resultado imposible de lograr utilizando los habituales procedimientos disponibles.

10 Otro procedimiento para someter a ensayo la hipertrofia conlleva la medición de la liberación de péptido natriurético auricular (ANP) a través de un ensayo que determina la competición para la unión de ANP de  $^{125}$ I-rata para una proteína de fusión A-IgG de receptor ANP de rata. El procedimiento adecuado para el uso resulta similar al utilizado para determinar gp120, utilizando una proteína de fusión descrita por Chamow *et al.*, *Biochemistry*, 29: 9885-9891 (1990).

## 15 K. *Ensayo neurotrófico*

El ensayo utilizado para determinar la actividad neurotrófica de ganglios ciliares descrito en Leung, *Neuron*, 8: 1045-1053 (1992) resulta adecuado en el presente caso. Brevemente, los ganglios filiales son disecados a partir de embriones de pollo E7-E8 y disociados en medio tripsina-EDTA (Gibco 15400-013), diluido 10 veces en solución salina tamponada con fosfato, durante un período de 15 minutos a 37°C. Los ganglios son lavados para liberarlos de tripsina, con tres lavados de medio de crecimiento (D-MEM alto en glucosa, suplementado con suero bovino fetal 10%, glutamina 1,5 mM, penicilina 100  $\mu$ g/mL y estreptomicina 100  $\mu$ g/mL) y después triturado suavemente en 1 mL de medio de crecimiento, formando una suspensión celular única. Las neuronas son enriquecidas mediante la colocación de esta mezcla de células en 5 mL de medio de crecimiento sobre un plato de cultivo de tejido de 100 mm, durante 4 horas a 37°C, en una incubadora de cultivo tisular. Durante este tiempo, las células no neuronales se pegan preferencialmente al plato y las neuronas pueden ser lavadas suavemente al final del período de incubación. Las neuronas enriquecidas son después colocadas en placas, en una placa de 96 pocillos revestida previamente con colágeno. En cada uno de los pocillos, se colocan entre 1000 y 2000 células, en un volumen final de entre 100 y 250  $\mu$ L, con las diluciones del CHF que tienen que ser objeto de comprobación. Después de un período de incubación de entre 2-4 días a 37°C, se valora el número de células vivas mediante teñido de la células vivas utilizando el tinte vital metalotionina (MTT). Una quinta parte del volumen de 5 mg/mL de MTT (Sigma M2128) es añadida a los pocillos. Después de un período de incubación de entre 2 y 4 horas a 37°C, las células vivas (rellenadas con un precipitado púrpura denso) son contabilizadas por medio de microscopía de fase con un aumento de 100x.

## 35 3. *Usos y composiciones terapéuticas y administración de CHF*

Se considera que el CHF puede ser utilizado como fármaco para el tratamiento de mamíferos (por ejemplo, animales o humanos) *in vivo*, que presentan fallo cardíaco, arritmia u otros trastornos inotrópicos y/o neuropatías periféricas y otros trastornos que involucran neuronas motoras u otras neuronas, en los cuales el CNTF se muestra activo.

40 Por ejemplo, el CHF puede resultar útil en el tratamiento de fallo cardíaco congestivo, en los casos en los que los inhibidores ACE no pueden ser utilizados o no resultan tan eficaces. Opcionalmente, el CHF es combinado con o administrado conjuntamente con otros agentes para tratamiento de fallo cardíaco congestivo, incluyendo los inhibidores ACE.

45 Si se utiliza, la cantidad eficaz de inhibidor ACE que tiene que ser administrada quedará a criterio del médico o veterinario. Para alcanzar la gestión óptima del fallo cardíaco congestivo se efectúa una administración y ajuste de la dosis, teniendo en cuenta, idealmente, la utilización de diuréticos o digitalis, y condiciones tales como hipotensión y dificultades renales. Adicionalmente, la dosis dependerá de factores tales como el tipo de inhibidor utilizado y del paciente específico que esté siendo tratado. Habitualmente, la cantidad utilizada será la misma dosis que la que hubiera sido utilizada para inhibidores ACE sin CHF.

55 Así pues, por ejemplo, una dosis de prueba para enalapril es 5 mg, la cual es después incrementada hasta 10-20 mg por día, una vez al día, según tolerancia del paciente. Como otro ejemplo, el captopriilo es administrado inicialmente por vía oral a pacientes humanos en una dosis de prueba de 6,25 mg y se procede después al escalado de la dosis, a medida que el paciente la tolera, hasta 25 mg dos veces al día (BID) o tres veces por día (TID) y puede valorarse hasta 50 mg BID o TID. El nivel de tolerancia se estima mediante la determinación de si el descenso en la presión sanguínea va acompañado de signos de hipotensión. Si resulta indicado, la dosis puede ser incrementada hasta alcanzar los 100 mg BID o TID. El captopriilo es producido para ser administrado como ingrediente activo, en combinación con hidroclorotiazida y como núcleo de pH estabilizado teniendo un revestimiento entérico o de liberación retardada, el cual protege al captopriilo hasta que el mismo alcanza el colon. El captopriilo se encuentra disponible para ser administrado en forma de comprimidos o cápsulas. Una discusión acerca de la dosis, administración, indicaciones y contraindicaciones asociadas con captopriilo u otros inhibidores ACE puede ser encontrada en Physicians Desk Referente, Medical Economics Data Production Co., Montvale, NJ. 2314-2320 (1994).

65 El CHF resulta potencialmente útil en la generación, maduración y supervivencia de oligodendrocitos *in Vitro*, para la protección de oligodendrocitos frente a muerte natural y muerte inducida por factor de necrosis tumoral, en la supervivencia y diferenciación de astrocitos y en la inducción del desarrollo de astrocitos de tipo 2, y en la estimulación

# ES 2 276 393 T3

de la producción recombinante de receptores de factores de crecimiento nervioso de baja afinidad y de CD-4 por parte de microglías del sistema nervioso central (CNS) de rata.

El CHF resulta también potencialmente útil por tener un efecto inotrópico sobre el músculo esquelético desnervado.

- 5 Además, se espera que tenga las respuestas proliferativas y de unión de las células hematopoyéticas transfectadas con receptores de baja afinidad para el factor inhibidor de leucemia, oncostatina M y factor neurotrófico ciliar, que regule la expresión del gen fibrinógeno en hepatocitos mediante unión al receptor de interleuquina-6, que desarrolle acciones tróficas sobre células de carcinoma embrionario murinas, que sea un pirógeno endógeno y que desarrolle un efecto mitogénico sobre células de neuroblastoma IMR 32 humanas.

10 Además, se espera que el CHF refuerce las respuestas al factor de crecimiento nervioso de neuronas simpáticas de rata cultivadas, que conserve las motoneuronas y sus músculos objetivo en ratas en desarrollo, que induzca el brote de neuronas motoras *in vivo*, que favorezca la supervivencia de neuronas corticoespinales en rata recién nacida *in vitro*, que evite la degeneración de las neuronas dopamínergicas de sustancia negra en ratas adultas *in vivo*, que modifique el umbral de sensibilidad de neuronas piramidales de hipocampo para daño provocado por excioxina, que evite la generación neuronal y favorezca la producción de receptores NGF de baja afinidad en el CNS de rata adulta y que refuerce la supervivencia de neuronas en cultivos de hipocampo de rata embrionaria.

20 Estas actividades se traducen en el tratamiento de la totalidad de enfermedades neurodegenerativas mediante CHF, incluyendo neuropatías periféricas (motoras y sensoriales), ALS, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ictus, enfermedad de Huntington y enfermedades oftalmológicas, por ejemplo, aquellas relacionadas con la retina.

25 El CHF puede resultar también de utilidad como tratamiento adjunto de trastornos neurológicos, conjuntamente con los citados factores neurológicos como, por ejemplo, CNTF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4 y NT-5.

30 El ácido nucleico que codifica para CHF puede ser utilizado como diagnóstico para tipificación específica de tejido. Por ejemplo, procedimientos tales como hibridación *in situ*, análisis de Northern y Southern y análisis de PCR, pueden ser utilizados para determinar si el DNA y/o el RNA que codifican para CHF se encuentran presentes en el(s) tipo(s) de célula(s) que está(n) siendo evaluada(s).

35 En ensayos de diagnóstico cuantitativos puede también utilizarse polipéptido CHF aislado, como habitual o como control, frente al cual pueden prepararse muestras que contienen cantidades desconocidas de CHF.

40 Las formulaciones terapéuticas de CHF para el tratamiento de fallo cardíaco y trastornos neurológicos son preparadas para almacenamiento mediante el mezclado de CHF, que tiene el grado deseado de pureza, con sopores, excipientes o estabilizadores opcionalmente fisiológicamente aceptables, (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*), en forma de pastel liofilizado o de soluciones acuosas. Los sopores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones utilizadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (por debajo de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como sueroalbúmina, gelatina o immunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidina; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes azucarados, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, Pluronics o polietilenglicol (PEG).

45 El CHF que tiene que ser utilizado en administración *in vivo* tiene que ser estéril. Ellos se logra de forma rápida por medio de filtración a través de membranas de filtración estériles, con anterioridad o después de liofilización y reconstitución. El CHF será habitualmente almacenado en forma liofilizada o en forma de solución.

50 Las composiciones terapéuticas de CHF son habitualmente colocadas en el interior de un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón agujereable por medio de una aguja de inyección hipodérmica.

55 La ruta de administración de CHF o de anticuerpo CHF está en consonancia con los procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión a través de rutas intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intra-arterial o intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida, tal y como se muestra más adelante. El CHF es administrado de forma continua mediante infusión o inyección bolus. El anticuerpo CHF es administrado de la misma forma, o mediante administración en la corriente sanguínea o sistema linfático.

60 Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidas que contienen la proteína, las cuales se presentan como artículos con una determinada forma, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), tal y como se describe por parte de Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 [1981] y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 [1982] o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente USA nº 3.773.919, EP 58481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22: 547-556 [1983]), acetato de vinilo-etileno no degradable (Langer *et al.*, *supra*), copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(*l*)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

Si bien polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas por espacio de más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante largos períodos de tiempo, las mismas pueden desnaturalizarse o acumularse como resultado de exposición a humedad a 37°C, dando lugar a pérdida de actividad biológica y a posibles cambios en inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización de proteínas, en función del mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de acumulación contempla la formación de enlaces S-S a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede ser alcanzada mediante la modificación de restos sulfidrilo, liofilización a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, utilizando los aditivos deseados y desarrollando composiciones matriciales de polímeros específicos.

Entre las composiciones de CHF de liberación sostenida se incluyen las de CHF atrapado en liposomas. Los liposomas que contienen CHF se preparan a través de procedimientos conocidos *per se*: DE 3.218.121; Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes USA nos 4.485.045; y EP 102.324. Ordinariamente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (entre 200-800 Angstroms), en los cuales el contenido en lípidos es superior a aproximadamente 30% en moles de colesterol, siendo la proporción seleccionada para terapia de CHF óptima.

La cantidad eficaz de CHF que tiene que ser utilizada terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, de la ruta de administración y de la dolencia del paciente. Por consiguiente, resultará necesario que el terapeuta valore la dosis y modifique la ruta de administración en la forma requerida para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis diaria típica oscilará entre aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal del paciente o más por día, en función de los factores mencionados anteriormente, preferiblemente aproximadamente 10 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día. Habitualmente, el clínico administrará el CHF hasta que se alcance una dosis que logre el efecto deseado para el tratamiento de la disfunción neural o de corazón. Por ejemplo, la cantidad sería una que incrementase la contractilidad ventricular y redujese la resistencia vascular periférica o que mejorase o tratase dolencias de similar importancia en pacientes con fallo cardíaco congestivo. El avance en esta terapia es fácilmente monitorizado a través de ensayos convencionales.

#### 4. Preparación de anticuerpo CHF

##### (i) Materiales de partida y procedimientos

Las inmunoglobulinas (Ig) y determinadas variantes de las mismas resultan conocidas y muchas de ellas han sido preparadas en cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, ver las patentes USA n°s. 4.745.055; EP 256.654; EP 120.694; EP 125.023; EP 255.694; EP 266.663; WO 88/03559; Faulkner *et al.*, *Nature* 298: 286 (1982); Morrison, *J. Immun.*, 123: 793 (1979); Koehler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2197 (1980); Raso *et al.*, *Cancer Res.*, 41: 2073 (1981); Morrison *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 2: 239 (1984); Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984). Se conocen también cadenas de inmunoglobulina variadas. Ver por ejemplo, las patentes N°s. USA 4.444.878; WO 88/03565 y EP 68.763 y las referencias citadas en las mismas. El resto inmunoglobulina en las quimeras de la presente invención puede ser obtenido a partir de subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferiblemente a partir de IgG-1 o de IgG-3.

##### (ii) Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales para polipéptidos CHF o fragmentos de CHF son generalmente obtenidos en animales a través de múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) inyecciones de CHF o de fragmentos de CHF y un adyuvante. Puede resultar de utilidad el conjugar el CHF o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos objetivo para una proteína que es inmunogénica en la especie que tiene que ser inmunizada, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, sueroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de haba de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster sulfosuccinimida de meleimidobenzoilo (conjugación a través de restos cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos lisina), glutaraldehido, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub>, o R<sup>1</sup>N=C=NR, en el que R y R<sup>2</sup> son grupos alquilo diferentes.

Los animales son inmunizados frente al polipéptido CHF o al fragmento de CHF, conjugados inmunogénicos o derivados, mediante la combinación de 1 mg o 1 µg del péptido o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradermalmente en múltiples puntos. Un mes más tarde los animales son estimulados con entre 1/5 y 1/10 parte de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund, mediante inyección subcutánea en múltiples puntos. Entre 7 y 14 días más tarde, se extrae sangre de los animales y el suero es sometido a ensayo en búsqueda de CHF o del fragmento del fragmento de anticuerpo. Los animales son estimulados hasta que la valoración alcanza un nivel plano. Preferiblemente, el animal es estimulado con el conjugado del mismo CHF o del fragmento de CHF, pero conjugado a proteínas diferentes y/o a través de diferentes reactivos de reticulación. Los conjugados pueden ser también preparados en cultivo celular recombinante como fusiones de proteína. Asimismo, para reforzar la respuesta inmune, se utilizan de forma adecuada agentes acumulantes, tales como alum.

(iii) *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, a saber, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos con la excepción de mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Así pues, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo, en el sentido de que no se trata de una mezcla de anticuerpos concretos.

Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales CHF de la invención pueden ser obtenidos utilizando el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975) o pueden ser obtenidos mediante procedimientos de DNA recombinantes (Cabilly *et al.*, *supra*).

En el procedimiento hibridoma, un ratón u otro animal huésped adecuado, tal como un hámster, es inmunizado tal y como se ha descrito anteriormente para generar linfocitos que produzcan o que sean capaces de producir anticuerpos que se unan de forma específica al CHF o al fragmento de CHF utilizado para inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos son después fusionados con células de melanoma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 [Academic Press, 1986]).

Las células hibridoma preparadas de este modo son sembradas y cultivadas en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parenterales y no fusionadas. Por ejemplo, si el mieloma parenteral carece del enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HPRT o HPRT), el medio de cultivo para hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias éstas que evitan el crecimiento de células deficientes en HPRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de forma eficaz, soportan una producción estable de anticuerpo de elevado nivel por parte de células de producción de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como un medio HAT. De entre las mismas, las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas celulares de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponible comercialmente en Salk Institute Cell Distributor Center, San Diego, California, USA y células SP-2 disponible en el American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA.

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma son cultivadas es ensayado para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CHF. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por medio de células de hibridoma es determinada mediante inmunoprecipitación o mediante ensayo de unión *in vitro*, tal como un radio-inmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoabsorvente unido a enzima (ELISA).

La afinidad de unión para el anticuerpo monoclonal puede ser determinada, por ejemplo, por medio de análisis Scatchard de Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Una vez se han identificado las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseada, los clones pueden ser subclonados por medio de procedimientos de dilución limitadores y cultivados por medio de procedimientos habituales (Goding, *supra*). Entre los medios de cultivo adecuados a tal efecto se incluyen, por ejemplo, los medios D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden ser cultivadas *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones son separados de forma adecuada del medio de cultivo, del fluido ascítico o del suero a través de procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina, tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálsis o cromatografía por afinidad.

El DNA que codifica para los anticuerpos monoclonales de la invención es rápidamente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican para cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida del citado DNA. Una vez aislado, el DNA puede ser colocado en vectores de expresión, los cuales son después transfectados en células huésped tales como células *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster, chino (CHO) o células de mieloma que no producen, por el contrario, la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped de mieloma. Entre los artículos de revisión sobre expresión recombinante en bacterias de DNA que codifica para el anticuerpo se incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opinióin in Immunol.*, 5: 256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188 (1992).

El DNA puede ser también modificado, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia que codifica para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en vez de las secuencias de codificación homólogas murinas (Morrison, *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 81: 6851 [1984]) o mediante unión covalente, a la secuencia de codificación de la inmunoglobulina, de todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no inmunoglobulina. De esta forma, se preparan anticuerpos "químéricos" o "híbridos" que tienen, en el presente caso, la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal anti-CHF.

Habitualmente, los citados dominios constantes de un anticuerpo de la invención son sustituidos por los citados polipéptidos no inmunoglobulina, o los dominios variables de un punto de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención son sustituidos por los mismos, para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un punto de combinación de antígeno que tiene una especificidad para el CHF y otro punto de combinación de antígeno que presenta especificidad para un antígeno diferente.

Los anticuerpos quiméricos o híbridos pueden ser también preparados *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que conllevan agentes reticuladores. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptopbutiramidato.

Para aplicaciones diagnósticas, los anticuerpos de la invención serán habitualmente marcados con un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$  ó  $^{125}\text{I}$ ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; marcas isotópicas radioactivas, tales como, por ejemplo,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^3\text{H}$ , o un enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano.

Cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica para la conjugación separada de anticuerpo con el resto detectable puede ser utilizado, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13: 1014 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407 (1982).

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser utilizados en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A manual of Techniques*, pp. 147-158 (CRC Press, Inc, 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un producto habitual marcado (el cual puede ser un CHF o un parte inmunológicamente reactiva del mismo) para competir con el analito muestra de prueba (CHF) para unión con una cantidad límite de anticuerpo. La cantidad de CHF en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de compuesto habitual que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de compuesto habitual que queda unido, los anticuerpos generalmente son insolubilizados con anterioridad o después de la competencia, por lo que el compuesto habitual y el analito que están unidos a los anticuerpos pueden ser separados de forma conveniente a partir del compuesto habitual y analito que no quedan unido.

Los ensayos tipo sándwich conllevan la utilización de dos anticuerpos, cada uno de ellos capaces de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítope, de la proteína (CHF) para ser detectable. En un ensayo sándwich, el analito de muestra de prueba está unido mediante un primer anticuerpo, el cual es inmovilizado sobre un soporte sólido y después un segundo anticuerpo se une al analito, formando de este modo un complejo de tres partes insoluble. David and Green, patente USA n°. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede ser marcado con un resto detectable (ensayos sándwich directos) o puede ser medido utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina marcado con un resto detectable (ensayo de sándwich directo). Por ejemplo, un tipo de ensayo de sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el resto detectable es un enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano).

#### 45 (i) *Anticuerpos humanizados*

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en el estado de la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoácido introducidos en el mismo procedente de una fuente que es no humana. Estos restos aminoácidos no humanos son a menudo identificados como restos "import", los cuales son habitualmente tomados de un dominio variable "import". La humanización puede ser esencialmente llevada a cabo 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]), sustituyendo las secuencias de un anticuerpo humano por las secuencias CDRs o CDR de un roedor. Por consiguiente, los citados anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Cabilly *et al.*, *supra*), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la correspondiente secuencia procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los cuales algunos restos CDR y posiblemente algunos restos FR son sustituidos por restos procedentes de puntos análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para ser utilizados en la preparación de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el denominado procedimiento "mejor adaptado", la secuencia de dominio variable de un anticuerpo de roedor es cribada frente a la librería entera de secuencias de dominio variable humanas. La secuencia humana más próxima a la del roedor es entonces aceptada como el marco humano (FR) para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2296 [1993]; Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 [1987]). Otro procedimiento utiliza un marco particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco puede ser utilizado para diferentes anticuerpos humanizados (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 [1992]; Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151: 2623 [1993]).

Resulta adicionalmente importante que los anticuerpos sean humanizados con retención de elevada afinidad para el antígeno y de otras importantes propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados son preparados a través de un procedimiento de análisis de las secuencias parenterales y diversos productos humanizados conceptualmente, utilizando modelos tridimensionales de las secuencias humanizadas y parentales. Se dispone habitualmente de modelos tridimensionales, los cuales resultan familiares para los expertos en la materia. Se dispone de programas de ordenador que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas exposiciones permite llevar a cabo el análisis del papel probable de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, a saber, el análisis de los restos que influencian la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, pueden seleccionarse restos FR y combinarlos a partir del consenso y secuencias de importación, a los efectos de alcanzar las características de anticuerpo deseadas para el(los) antígeno(s) objetivo. En general, los restos CDR están directa y muy sustancialmente involucrados en la influencia sobre la unión a antígeno.

15 (v) *Anticuerpos humanos*

Los anticuerpos monoclonales humanos pueden ser obtenidos a través del procedimiento hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc. New York, 1987); y Boemer *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86-95 (1991).

Resulta ahora posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que sean capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión de homocigoto del gen ( $J_H$ ) de la región de unión de cadena pesada de anticuerpo en ratones químéricos y de línea germinal mutante da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia del conjunto de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en los ratones mutantes de línea germinal da lugar a la producción de anticuerpos humanos tras el desafío con antígeno. Ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362: 255-258 (1993); Brugermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993).

Alternativamente, la tecnología de exposición de fago (McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-553 [1990]) puede ser utilizada para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulina, procedentes de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo son clonados en marco en, o bien un gen de proteína de revestimiento mayor, o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y mostrados como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de DNA de hebra única del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan lugar también a la selección del gen que codifica para el anticuerpo que muestra esas propiedades. Así pues, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La exposición del fago puede ser llevada a cabo de una diversidad de formas; para su revisión ver, por ejemplo, Jonson, Kevin S y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology*, 3: 564-571 (1993). Para la exposición del fago pueden utilizarse diversas fuentes de segmentos de gen-V. Claxton *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) aisló un conjunto diverso de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña librería combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V procedentes de donantes humanos inmunizados y de anticuerpos para un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) pueden ser aislados siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o Griffith *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993).

En una respuesta inmune natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una elevada velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán una afinidad más levada, y las células B que muestran elevada afinidad para inmunoglobulina superficial son replicadas y diferenciadas con preferencia durante el desafío de antígeno subsiguiente. Este proceso natural puede ser imitado utilizando la técnica conocida como "redistribución e cadena" (Marks *et al.*, *BIO/Technol.*, 10: 779-783 [1992]). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por medio de exposición de fago puede ser mejorada por medio de la sustitución secuencial de los genes de la región V de cadena pesada y cadena ligera por repertorios de variante (repertorios) de origen natural de genes de dominio V, obtenidos a partir de donantes no inmunizados. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y de fragmentos de anticuerpo con afinidades en la región nM. Una estrategia para la preparación de repertorios de anticuerpos fago muy grandes ha sido descrita por parte de Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993).

La redistribución genética puede ser también utilizada para derivar anticuerpos humanos procedentes de anticuerpos de roedores, cuando el anticuerpo humano presenta similares afinidades y especificidades hacia el anticuerpo de roedor de partida. Según este procedimiento, al cual se le denomina también como "impresión de epítope", el gen de dominio V de cadena ligera o pesada de anticuerpos de roedor obtenido por medio de la técnica de exposición de fago es sustituido por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando quimera humano-roedor. La selección sobre antígeno da lugar a un aislamiento de variables humanas capaces de restaurar un punto de unión a antígeno funcional, a saber, el epítope gobierna (imprime) la elección de partner. Cuando se repite el proceso con vistas a sustituir el remanente de dominio V de roedor, se obtiene un anticuerpo humano (ver PCT WO 93/06213, publicada el 1 de

abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor para injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, los cuales no tienen restos marco o restos de origen roedor.

5 (vi) *Anticuerpos bi-específicos*

Los anticuerpos bi-específicos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el primer caso, una de las especificidades de unión es para CHF, la otra es para cualquier otro antígeno y preferiblemente para otro ligando que se une a un miembro de la familia de receptores GH/citoquina. Por ejemplo, los anticuerpos bi-específicos que se unen específicamente a CHF y a un factor neurotrófico, o a dos diferentes tipos de polipéptidos CHF, caen dentro del campo de la presente invención.

En el estado de la técnica se tiene conocimiento acerca de la existencia de procedimientos para la preparación de anticuerpos bi-específicos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos bi-específicos se basa en la co-expresión de dos pares de inmunoglobulinas de cadena ligera-cadena pesada, en el que las dos cadenas pesadas presentan diferentes especificidades (Milstein and Cuello, *Nature*, 305: 537-539 [1983]). Debido al surtido aleatorio de cadenas ligeras y cadenas pesadas de inmunoglobulina, estos híbridos (quadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpo, de los cuales tan solo una presenta la estructura bi-específica correcta. La purificación de la molécula corregida, lo cual se lleva a cabo mediante pasos de cromatografía de afinidad, es algo engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. En el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991), se describen procedimientos similares.

Según un planteamiento diferente y más preferido, los dominios de anticuerpo variable con las especificidades de unión deseadas (puntos de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente se produce con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>. Resulta preferido tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el punto necesario para la unión de cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los DNAs que codifican para las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, para la cadena ligera de inmunoglobulina, son insertados en vectores de expresión separados y son co-transfectados en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones múltiples de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones, cuando relaciones desiguales utilizadas de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Resulta, no obstante, posible, insertar las secuencias de codificación para dos o para la totalidad de tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la producción de al menos dos cadenas de polipéptido en relaciones iguales da lugar a elevados rendimientos o cuando las relaciones son de no particular relevancia. En una realización preferida de este planteamiento, los anticuerpos bi-específicos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena ligera-cadena pesada de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se averiguó que esta estructura asimétrica facilita la separación de compuesto bi-específico deseado a partir de combinaciones de cadena de inmunoglobulina no queridas, dado que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en tan solo una mitad de la molécula bi-específica, da lugar a una vía fácil de separación.

Para detalles adicionales acerca de la generación de anticuerpos bi-específicos, ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

45 (vii) *Anticuerpos heteroconjugados*

Los anticuerpos heteroconjugados caen también dentro del campo de protección de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Los citados anticuerpos han sido, por ejemplo, propuestos para dirigirse hacia células del sistema inmune para células no queridas (patente USA nº. 4.676.980) y para el tratamiento de infección por HIV (WO 91/00360; WO 92/00373; y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden ser preparados utilizando cualquier procedimiento de reticulación que resulte adecuado. Se tiene conocimiento acerca de agentes reticulantes adecuados y se describen en la patente USA nº 4.676.980, junto con un determinado número de técnicas de reticulación.

55 5. *Usos de anticuerpos CHF*

Los anticuerpos CHF resultan de utilidad en ensayos de diagnóstico para CHF, por ejemplo, su producción en células específicas, tejidos o suero. Los anticuerpos son marcados de la misma forma que el CHF descrito anteriormente y/o inmovilizados sobre una matriz insoluble. En una realización de un ensayo de unión a receptor, una composición de anticuerpo que se une a la totalidad o a una pluralidad seleccionada de CHFs es inmovilizada sobre una matriz insoluble, la muestra de prueba es puesta en contacto con la composición de anticuerpo inmovilizado para absorber la totalidad de CHFs y, seguidamente, los CHFs inmovilizados son puestos e contacto con una diversidad de anticuerpos específicos para cada uno de los CHF, siendo cada uno de los anticuerpos identificable de forma individual como específico para un CHF predeterminado, a través de marcas únicas tales como fluoróforos concretos o similares. Mediante la determinación de la presencia y/o la cantidad de cada una de las marcas únicas, puede determinarse la proporción relativa y la cantidad de cada uno de los CHF.

Los anticuerpos de esta invención resultan también de utilidad para inmunizar pacientes de forma pasiva.

Los anticuerpos CHF resultan también de utilidad para la purificación de CHF a partir de cultivos celulares recombinantes o de fuentes naturales. Los anticuerpos CHF que no reaccionan de forma detectable con el CHF de rata pueden purificar CHF exento de la citada proteína.

5 Los ensayos de diagnóstico adecuados para CHF y sus anticuerpos son bien conocidos de por si. Además de los bioensayos descritos en los ejemplos mostrados más adelante, en los que el candidato CHF es objeto de comprobación para ver si tiene actividad hipertrófica, anti-arrítmica, inotrópica o neurotrófica, resultan de utilidad las técnicas de inmunoensayo de inhibición estéricas, de tipo sándwich y competitivas. Los procedimientos tipo sándwich y los competitivos utilizan un paso de separación de fase como una parte integral del procedimiento, mientras se llevan  
10 a cabo ensayos de inhibición estérica en una mezcla de reacción única. Fundamentalmente, se utilizan los mismos procedimientos para el ensayo de CHF y para las sustancias que se unen al CHF, si bien determinados procedimientos resultarán favorecidos en función del peso molecular de la sustancia que esté siendo sometida a ensayo. Por consiguiente, la sustancia que tiene que ser objeto de prueba es identificada en el presente documento como analito, con independencia de su estatus, de lo contrario como un antígeno o anticuerpo, y las proteínas que se unen al analito son  
15 denominadas partners de unión, ya sean anticuerpos, receptores de superficie celular o antígenos.

La totalidad de los procedimientos analíticos para CHF o sus anticuerpos utilizan uno o más de los siguientes reactivos: análogos de analito marcados, análogos de analito inmovilizados, partner de unión marcado, partner de unión inmovilizado y conjugados estéricos. Los reactivos marcados son también conocidos como "trazadores".  
20

La marca utilizada (y esto también resulta de utilidad para marcar ácido nucleico de CHF para ser utilizado como sonda) es cualquier funcionalidad que resulte detectable que no interfiera con la unión de analito y su partner de unión. Se conocen numerosas marcas para ser utilizadas en inmunoensayos, incluyéndose entre los ejemplos restos que pueden ser detectados directamente, tales como fluorocromo, marcas quimioluminiscentes y radioactivas, al igual que restos, tales como enzimas, que tiene que ser hechos reaccionar o derivatizar para ser detectados. Entre los ejemplos de las citadas marcas se incluyen los radioisótopos  $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{3}\text{H}$  y  $^{131}\text{I}$ ; fluoróforos tales como quelatos de tierra rara o fluoresceina y sus derivados; rodamina y sus derivados; dansilo, umbeliferona; luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente USA n°. 4.737.456); luciferina; 2,3-dihidroftalazinedionas; malato deshidrogenasa; ureasa; peroxidasa como la peroxidasa de rábano (HRP); fosfatasa alcalina;  $\beta$ -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima; sacárido-oxidases, por ejemplo, glucosa-oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa; oxidases heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con un enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tinte tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa; biotina/avidina; marcas rotatorias, marcas para bacteriófagos, radicales libres estables; y similares.  
25  
30  
35

Los expertos en la materia tendrán conocimiento de otras marcas adecuadas que pueden ser utilizadas según la presente invención. La unión de estas marcas a CHF, anticuerpos o a fragmentos de los mismos puede ser lograda utilizando técnicas habitualmente conocidas por parte de los expertos en la materia. Por ejemplo, para unir el polipéptido con el producto fluorescente, quimioluminiscente o con las marcas para enzimas pueden utilizarse, por ejemplo, agentes de acoplamiento tales como dialdehidos, carbodiimidas, bis-imidatos, bencidina bis-diazotizada y similares. Ver, por ejemplo, la patente USA n° 3.940.475 (fluorimetría) y 3.645.090 (enzimas); Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13: 1014-1021 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Methods*, 40: 219-230 (1981); Nygren, *J. Histochem and Cytochem.*, 30: 407-412 (1982); O'Sullivan *et al.*, "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", en *Methods in Enzymology*, ed. J.J. Lgone and H. Vunakis, Vol 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pp. 147-166; Kennedy *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, 70: 1-31 (1976); y Schurs *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 81: 1-40 (1977). Las técnicas de acoplamiento mencionadas en la referencia más reciente son el procedimiento glutaraldehido, el procedimiento peryodato, el procedimiento dimaleimida y el procedimiento de éster de m-maleimido bencinilo-N-hidroxisuccinimida.  
40  
45  
50  
55

En la práctica de la presente invención, las marcas de enzima son una realización preferida. Ningún enzima individual resulta ideal como marca en cada ensayo concebible. Por el contrario, uno tiene que determinar que enzima resulta adecuado para un particular sistema de ensayo. Los criterios relevantes a la hora de elegir los enzimas son el número de movimientos del enzima puro (el número de moléculas substrato convertidas en producto por punto enzimático por unidad de tiempo), la pureza de la preparación de enzima, la sensibilidad de detección de su producto, la facilidad y la velocidad de detección de la reacción enzimática, la ausencia de factores interferentes o de actividad tipo enzima en el fluido de prueba, la estabilidad del enzima y de su conjugado, la disponibilidad y el coste del enzima y de su conjugado, y similares. Incluidos entre la relación de enzimas preferidos utilizados como marcas en los ensayos de la presente invención se encuentran la fosfatasa alcalina, HRP, beta-galactosidasa, ureasa, glucosa oxidasa, glucoamilasa, malato deshidrogenada, y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. La ureasa figura en la relación de las marcas enzimáticas más preferidas, debido particularmente a los indicadores de pH cromogénicos que convierten a su actividad en rápidamente visible para el ojo desnudo.  
60

Para determinados procedimientos de ensayo se requiere la inmovilización de los reactivos. La inmovilización conlleva la separación del partner de unión de cualquier analito que permanezca libre en la solución. Esto se logra, de forma convencional, o bien insolabilizando el partner de unión o su análogo analito con anterioridad al procedimiento de ensayo, tal como mediante adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich *et al.*, patente USA n°. 3.720.760), por medio de acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando reticulación con glutaraldehido), o mediante insolabilización del partner o de su análogo con posterioridad, por ejemplo, por medio de inmunoprecipitación.  
65

## ES 2 276 393 T3

Otros procedimientos de ensayo conocidos como ensayos competitivos o de sándwich, han sido establecidos y ampliamente utilizados en la industria de diagnósticos comerciales.

Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo de trazador para competir con el analito de la muestra de prueba por un determinado número de puntos de unión sobre un partner de unión común. El partner de unión es generalmente insolubilizado con anterioridad o después de la competición y, seguidamente, el trazador y el analito unidos al partner de unión son separados del trazador y del analito no unidos. Esta separación se obtiene mediante decantación (cuando el partner de unión fue pre-insolubilizado) o mediante centrifugación (cuando el partner de unión precipitó después de la reacción de competición). La cantidad de analito de muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de trazador unida, medida a través de la cantidad de sustancia marcadora. Se preparan curvas dosis-respuesta con cantidades conocidas de analito y se comparan con los resultados de la prueba para determinar cuantitativamente la cantidad de analito presente en la muestra de prueba. Estos ensayos son denominados sistemas ELISA, cuando los enzimas se utilizan como marcadores detectables.

Otra especie de ensayo competitivo, denominado ensayo "homogéneo", no requiere una fase de separación. Aquí, se prepara un conjugado del enzima con el analito y se utiliza, de tal forma que cuando el anti-analito se une al analito, la presencia de anti-analito modifica la actividad enzimática. En este caso, el CHF o sus fragmentos inmunológicamente activos son conjugados con un puente orgánico bifuncional a un enzima, tal como peroxidasa. Los conjugados son seleccionados para ser utilizados como anti-CHF, a los efectos de que la unión del anti-HF inhiba o potencie la actividad enzimática de la marca. Este procedimiento per se es ampliamente utilizado bajo la denominación EMIT.

En los procedimientos de obstaculización estérica para ensayos homogéneos se utilizan conjugados estéricos. Estos conjugados son sintetizados mediante la unión covalente de un hapteno de bajo peso molecular a un pequeño analito, a los efectos de que el anticuerpo para el hapteno sea sustancialmente incapaz de unirse al conjugado al mismo tiempo que el anti-analito. Bajo este procedimiento de ensayo, el analito presente en la muestra de prueba se unirá al anti-analito, permitiendo con ello que el anti-hapteno se una al conjugado, dando lugar a un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, a un cambio en la fluorescencia cuando el hapteno es un fluoróforo.

Los ensayos tipo sándwich resultan particularmente útiles para la determinación de anticuerpos de CHF o anti-CHF. En ensayos tipo sándwich secuenciales, un partner de unión inmovilizado es utilizado como analito muestra de prueba adsorbente, la muestra de prueba es eliminada mediante lavado, el analito unido es utilizado para adsorber el partner de unión marcado y el material unido es entonces separado del marcador residual. La cantidad de trazador unido es directamente proporcional al analito de la muestra de prueba. A la hora de comprobar la actividad CHF en muestras de prueba, resulta de utilidad un ensayo tipo sándwich secuencial utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CHF, como un anticuerpo, y un anticuerpo anti-CHF policlonal, como el otro anticuerpo.

Los ensayos anteriores son ensayos de diagnóstico meramente ejemplarizados para CHF y sus anticuerpos. Dentro del campo de protección del presente documento se incluyen otros procedimientos desarrollados ahora o a partir de ahora para la determinación de estos analitos, incluyendo los bioensayos descritos anteriormente.

Los siguientes ejemplos se aportan a título ilustrativo y no limitativo. Las descripciones de la totalidad de las menciones que aparecen en la memoria son expresamente incorporadas al presente documento como referencias.

### 45 Ejemplo I

#### *Identificación y actividad in vitro de un CHF*

##### A. *Ensayo de material clonado por expresión*

El ensayo utilizado para hipertrofia es un ensayo de hipertrofia de corazón de rata recién nacida *in vitro*, descrito en general del siguiente modo:

###### 1. *Preparación de la suspensión celular de miocito*

La preparación de la suspensión celular de miocito se basa en procedimientos anticipados en Chien *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 75: 1770-1780 (1985) e Iwaki *et al.*, *supra*. Ventrículos procedentes de los corazones de cría de rata Sprague-Dawley, de entre 1 y 2 días, fueron extraídos y triseccionados. Los ventrículos desmenuzados fueron digeridos con una serie de tratamientos de colagenasa secuenciales. La purificación de la suspensión de célula única resultante sobre un gradiente de Percoll discontinuo dio lugar a una suspensión del miocitos con un 95% de pureza.

###### 2. *Colocación en placa y cultivo de los miocitos*

Dos procedimientos publicados para la ubicación en placas y el cultivo de miocitos son los siguientes: (1) Long *et al.*, *supra*, pre-colocaron la suspensión celular en placas durante un período de 30 minutos en MEM/suero de ternera 5%. Los miocitos no unidos fueron después ubicados en placas en MEM exento de suero, suplementadas con insulina, transferrina, BrdU y sueroalbúmina bovina, en platos de cultivo celular de 35 mm, a una densidad de 7,5 x 10<sup>4</sup> células por mL. (2) Iwaki *et al.*, *supra*, colocaron la suspensión celular en platos de cultivo tisular con D-MEM/199/suero de

# ES 2 276 393 T3

caballo 5%/suero de ternera fetal 5%, de 10 cm, a razón de  $3 \times 10^5$  células por mL. Después de 24 horas de cultivo, las células fueron lavadas e incubadas en D-MEM/199 exento de suero.

- Se ha desarrollado un protocolo diferente, de acuerdo con esta invención, para la ubicación en placas y el cultivo de estas células, con vistas a incrementar su capacidad de comprobación con un ensayo miniaturizado. Los pocillos de las placas de cultivo tisular de 96 pocillos son pre-revestidos con D-MEM/F12/suero de ternera fetal 4%, durante un período de 8 horas a 37°C. Este medio es extraído y la suspensión celular ubicada en placas en los 60 pocillos interiores, a razón de  $7,5 \times 10^4$  células por mL en D-MEM/F-12, suplementado con insulina, transferrina y aproteína. Este medio contiene también habitualmente un antibiótico, tal como penicilina/estreptomicina y glutamina. Este medio permite que estas células sobrevivan a esta baja densidad de placa, sin la presencia de suero. Una vez las células han sido cultivadas durante un período de 24 horas, se añaden las sustancias de prueba directamente en los pocillos.

## 3. Lectura de hipertrofia

- Después de estimulación con agonistas adrenérgicos o endotelina, las células de miocardio de rata recién nacida muestran diversas características de la hipertrofia celular del músculo cardíaco *in vivo*, observadas en el fallo cardíaco congestivo, incluyendo un incremento en el tamaño celular y un incremento en el conjunto de una proteína contráctil individual en unidades contráctiles organizadas. Chien *et al.*, FASEB J, *supra*. Estos cambios pueden ser observados con un microscopio de fase inversa y el grado de hipertrofia marcado con una escala arbitraria de 7 a 0, representando el 7 las células completamente hipertrofiadas y 3 las células no estimuladas. Los estados 3 y 7 pueden ser observados en Simpson *et al.*, Circulation Research, 51: 787-801 (1982), Figura 2, A y B, respectivamente. Para facilitar la lectura microscópica de los cultivos de 96 pocillos y para generar un registro permanente, los miocitos son fijados y teñidos, después del período de comprobación adecuado, con tinte violeta de cristal en metanol. El violeta de cristal es habitualmente utilizado como tinte para proteína para células cultivadas.

- Adicionalmente, puede tomarse una alícuota de las placas de 96 pocillos y monitorizarla para determinar la expresión de marcadores proteína de la respuesta, tal como liberación de ANF o ANP.

## B. Clonado por expresión

- Poli(A)<sup>+</sup> RNA fue aislado (Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69: 1408-1412 [1972]; Cathala *et al.*, DNA, 2: 329-335 [1983], a partir de cuerpos embrioides de ratón de 7 días. Los cuerpos embrioides fueron generados por medio de diferenciación de células madre (ES) embrionarias pluripotentes (Doetschmann *et al.*, J. Embryol. Exp. Morphol., 87: 27-45 [1985]). La línea de celulas madre embrionarias ES-D3 (ATCC N°. CRL 1934) fue mantenida en estado no diferenciado en un medio que contenía LIF (Williams *et al.*, Nature, 336: 684-687 [1988]). Este medio contenía D-MEM (glucosa elevada), glutamina 1%, 2-mercaptopropionato 0,1 mM, penicilina-estreptomicina, suero bovino fetal inactivado por calor 15%, y LIF de ratón 15 ng/ml. Cuando estas células fueron colocadas en cultivo en suspensión, en el mismo medio sin LIF y conteniendo el 20% de suero bovino fetal inactivado por calor al 20% (día 0), las mismas se acumularon y diferenciaron entre estructuras multicelulares denominadas cuerpos embrioides. Al octavo día de cultivo, en una fracción de los cuerpos se formaron estructuras de tipo corazón primordial latente. Los cuerpos embrioides fueron evaluados en lo referente a la producción de actividad CHF, mediante el cambio de las células ES diferenciadoras a medio exento de suero (D-MEM/F-12, glutamina 1%, penicilina-estreptomicina, conteniendo sueroalbúmina bovina 0,03%) durante un período de acumulación de 24 horas. Con anterioridad al ensayo, el medio acondicionado fue concentrado 10 veces con una membrana de ultrafiltración 3-K (Amicon) y dializado frente a medio e ensayo. El medio acondicionado para 24 horas contadas a partir del tercer día proporcionó unas cifras de hipertrofia de entre 4,5-5,5 y, empezando en el sexto día, unas cifras de entre 5,5-7,5.

- Se preparó una librería de cDNA en el vector de expresión plásmido, pRK5B (Colmes *et al.*, Science, 253: 1278-1280 [1991]), siguiendo una estrategia de cebado de vector Strathdee *et al.*, Nature, 356: 763-767 [1992]). El vector, pRK5B, fue linearizado en un punto NotI, tratado con fosfatasa alcalina y unido al oligonucleótido de hebra única, ocdl.1.3, que tiene la secuencia:

- 5'-GCGGCCGAGCTCGAATTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT (SEQ ID NO: 5). El producto ligado fue después cortado con BstXI y el fragmento de vector 4700-bp aislado mediante electroforesis en gel agarosa. El vector fue adicionalmente purificado por medio de cromatografía oligo dA.

- La librería de expresión fue construida utilizando 1  $\mu$ g de poli (A)<sup>+</sup> RNA, 5  $\mu$ g de cebador vector y reactivos procedentes de Amersham. Después de la síntesis de la primera y segunda hebras y de las reacciones de relleno de polimerasa T4 DNA, el material fue dimensionado para determinar la existencia de insertos superiores a 500 bp mediante electroforesis en gel y circularizado por medio de unión a extremo romo, sin adición de elementos de unión. Las uniones se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante electroporación. A partir de 1  $\mu$ g de poli (A)<sup>+</sup>RNA, se generaron 499 ng de cDNA de doble hebra. Se unieron diecisiete nanogramos de cDNA y 3,3 ng fueron transformados para generar 780.000 clones, 83% de los cuales presentaban insertos con un tamaño promedio de 1470 bp.

- Se aisló DNA a partir de grupos de entre 75 y 15.000 clones y se transfeció en células 293 de riñón embrionario humano por medio de transfección con lipofectamina (Gibco BRL). Para transfecir 200.000 células en platos de 6 pocillos se utilizaron dos microgramos de DNA. Las células fueron incubadas en 2 mL de medio de ensayo libre de

suero, durante 2 días. Este medio comprendía 100 mL de D-MEM/F-12, 100  $\mu$ L de transferrina (10 mg/mL), 20 pL de insulina (5 mg/mL), 50  $\mu$ L de aprotinina (2 mg/mL), 1 mL de pen/step (JRH Biosciences N°. 59602-77P) y 1 mL de L-glutamina (200 mM). La eficacia de la expresión y transfección fue monitorizada a través de la inclusión de 0,2 pg de DNA para un plásmido que expresa una forma secretada de fosfatasa alcalina (Tate *et al.*, *FASEB J.*, 4: 227-231 [1990]).

Mil microlitros de medio de cultivo acondicionado procedentes de cada uno de los grupos transfectados fueron sometidos a ensayo para determinar la hipertrofia en un volumen final de 200  $\mu$ L. Para algunos grupos, el medio acondicionado se concentró entre 4 y 5 veces antes de ser sometido a ensayo con microconcentradores Centricon 3<sup>TM</sup> (Amicon). Noventa grupos de entre 10.000 y 15.000 clones, 359 grupos de entre 1000 y 5800 clones y 723 grupos de entre 75 y 700 clones fueron transfectados y sometidos a ensayo para determinar la actividad hipertrófica. De estos 1172 grupos, se averiguó que dos de ellos resultaron positivos. El grupo 437 (un grupo de 187 clones) y el grupo 781 (un grupo de 700 clones) proporcionaron marcadores de 4. Un clon puro (designado como pchf. 437.48) procedente del grupo 437 fue aislado por medio de retransfección de grupos positivos que contenían menos y menos números de clones, hasta que se obtuvo un clon único. Un clon puro procedente del grupo 781 (designado como pchf. 781) fue aislado por medio de hibridación de colonia con el inserto procedente del clon pchf. 437.48.

La secuencia para el inserto de clon pchf.781 es proporcionada en la Figura 1 (SEQ ID NOS: 1,2 y 3 para las dos hebras de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos, respectivamente). La secuencia del inserto de clon pchf. 437.48 está en consonancia con el clon 781 que empieza en la base 27 (subrayado).

El primer marco de lectura abierta del clon pchf.781 (ver traducción, Figura 1) codifica para una proteína de 203 aminoácidos (traducida MW= 21,5 kDa). Esta proteína contiene un resto cisteína, un potencial punto de glicosilación unido a N, y ninguna secuencia de señal de secreción N-terminal hidrófoba. La región no traducida 3' del clon pchf.781 contiene una repetición de ratón habitual conocida como b1 (bp-895-1015). La hibridación de cuerpo embrionario poli (A)<sup>+</sup> RNA de 7 días con una sonda procedente del clon pchf.781 muestra una banda única de -1,4kb, que es aproximadamente del mismo tamaño que el inserto procedente de los clones cDNA.

La secuencia codificada no resulta altamente similar (> 35% de identidad de aminoácidos) a ninguna otra secuencia de proteínas en la base de datos Dayhoff. No obstante, la misma ha mostrado un bajo grado de similitud con una familia de proteínas relacionadas de lejos, que incluye CNTF, interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-11 (IL-11), LIF y oncostatina M (OSM) (Bazan, *Neuron*, 7: 197-208 [1991]). El CHF de ratón mantiene un 24% de identidad de aminoácidos con el LIF de ratón (Rose and Todaro, WO 93/05169) y un 21% de identidad con el CNTF humano (Mc Donald *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1090: 70-80 [1991]). Ver la Figura 2 para un alineamiento de secuencias de CHF de ratón y CNTF humanas. El CNTF, la IL-6, la IL-11, el LIF y la OSM utilizan proteínas que señalan el receptor relacionado, incluyendo gp 130, que son miembros de la familia de receptor GH/citoquina (Kishimoto *et al.*, *Cell*, 76: 253-262 [1994]). El CNTF, como el CHF, carece de secuencia señal de secreción N-terminal.

#### C. Identidad y actividad de clon

Para demostrar que el clon pchf.781 codifica para un CHF, se llevaron a cabo estudios de expresión, tanto para la transfección de células 293 como para utilizar un sistema transcripción/traducción SP6 acoplado *in vitro*. El marcado con <sup>35</sup>S-metionina y cisteína de las proteínas producidas por medio de células 293 transfectadas por pchf.781 (en comparación con células transfectadas por vector) mostraba que el medio acondicionado contenía una proteína marcada de aproximadamente 21,8 kDa y que el extracto celular mostraba una proteína de 22,5 kDa. Los medios acondicionados a partir de estas transfecciones proporcionaban un marcador de morfología 6, cuando se ensayaron para determinar la hipertrofia cardíaca a una dilución de 1:4, utilizando el ensayo descrito anteriormente. Los medios acondicionados procedentes de transfecciones no marcadas proporcionaron un marcador de morfología de entre 5,5 y 6,5, a una dilución 1.1.

Estos ensayos resultaron también positivos para una segunda medición de liberación de ANP en hipertrofia cardíaca. Ver la Figura 3. Este ensayo fue llevado a cabo por medio de determinación de la competencia para la unión de <sup>125</sup>I-ANP de rata, para una proteína de fusión IgG-receptor A de ANP de rata. Este procedimiento es similar al utilizado para la determinación de gp 120, utilizando una proteína de fusión CD4-IgG (Chamow *et al.*, *Biochemistry*, 29: 9885-9891 [1990]). Brevemente, pocillos de microvaloración fueron revestidos con 100  $\mu$ L de anticuerpo IgG anti-humano de rata (2  $\mu$ g/mL) durante el transcurso de una noche a 4°C. Después de lavar con solución salina tamponada con fosfato contenido sueroalbúmina bovina 0,5%, los pocillos fueron incubados con 100  $\mu$ L de 3 ng/mL de IgG-receptor A de ANP de rata (producido y purificado de forma análoga a IgG-receptor A de ANP humano) (Bennett *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 23060-23067 [1991]), durante una hora a 24°C. Los pocillos fueron lavados e incubados con 50  $\mu$ L de ANP habitual de rata o muestra durante una hora a 24°C. Seguidamente 50  $\mu$ L de <sup>125</sup>I-ANP de rata (Amersham) fueron añadidos, para un periodo adicional de incubación de una hora. Los pocillos fueron lavados y contados para determinar la extensión de la competencia de unión. Las concentraciones de ANP en las muestras fueron determinadas mediante comparación con una curva habitual de ANP de rata.

El marcado con <sup>35</sup>S-metionina de las proteínas preparadas por medio de transcripción/traducción *in vitro* acoplada a SP6 (materiales procedentes de Promega) del clon pchf.781 mostró una proteína marcada de 22,4 kDa. El producto de traducción marcado resultó activo cuando se sometió a ensayo para determinar la hipertrofia cardíaca a una difusión de 1:200 (marcador de morfología 5-6). Para verificar que la banda marcada 22.4 kDa era la responsable de la actividad

# ES 2 276 393 T3

hipertrófica, el producto de traducción marcado fue aplicado a una columna C4 de fase inversa (Synchropak RO-4-4000) equilibrada en acetonitrilo 10%, TFA 0,1% y eluida con un gradiente de acetonitrilo. Picos coincidentes de proteína marcada y de actividad hipertrófica eluyeron a acetonitrilo -55%.

- 5 Se ha informado acerca de actividad hipertrófica de miocito cardíaco y de parcialmente purificado procedente de fibroblastos cardíacos de rata. Long *et al.*, *supra*. Para investigar adicionalmente la identidad del presente CHF, se cultivaron fibroblastos cardíacos de rata. El medio acondicionado a partir de estos cultivos primarios no tenía hipertrofia cardíaca en el ensayo de hipertrofia de corazón de rata recién nacida *in vitro*. La hibridación por mancha de mRNA de fibroblasto de rata aislado a partir de estos cultivos muestra una clara banda a 1,4 kb cuando se aplica una sonda con un fragmento de región codificante del clon pchf.781 (la hibridación se llevó a cabo en 5 x SSC, formamida 20% a 42°C, con un lavado final en 0,2 x SSC a 50°C).

## D. Purificación de factor

- 15 El medio de cultivo acondicionado por células transfectadas con el clon pchf.781 o con un clon humano es ajustado con NaCl 1,5 M y aplicado a una columna Butyl-650M Toyopearl™. La columna es lavada con TRIS-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 1M y la actividad eluida con TRIS-HCl 10 mM, pH 7,5; Zwittergent™ 3-10 10 mM. El pico de actividad es ajustado a NaCl 150 mM, pH 8,0 y aplicado a una columna MONO-Q Fast Flow. La columna es lavada con TRIS-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM; octilglucósido 0,1% y se detecta actividad en la fracción de arrastre. El material activo 20 es entonces aplicado a una columna C4 de fase inversa en TFA 0,1%, acetonitrilo 10%, y eluida con una gradiente de TFA 0,1% hasta el 80%. La actividad fracciona a entre aproximadamente 15 y 30 kDa sobre columna de filtración en gel. Se espera que un caotropo, tal como guanidina-HCl resulte necesario para la resolución y recuperación.

## Ejemplo II

### Comprobación de la actividad hipertrófica *in vivo*

#### A. Ratas normales

- 30 El CHF procedente del Ejemplo I es objeto de prueba en ratas normales para observar su efecto sobre parámetros cardiovasculares, tales como presión sanguínea, ritmo cardíaco, resistencia vascular sistémica, contractilidad, fuerza de batido del corazón, hipertrofia concéntrica o dilatada, presión sistólica ventricular izquierda, presión media ventricular izquierda, presión final diastólica ventricular izquierda, gasto cardíaco, índice de íctus, parámetros histológicos, tamaño ventricular, grosor de pared, etc.

#### B. Modelo de ratón para sobrecarga de presión

El CHF purificado es también objeto de comprobación en el modelo de ratón de sobrecarga de presión, en el que la arteria pulmonar es contraída, dando lugar a fallo ventricular derecho.

#### C. Modelo disfuncional murino RV

- 40 Para comprobar el CHF puede utilizarse un modelo murino retrovírico de disfunción ventricular y el dP/dt, la fracción de eyección y los volúmenes pueden ser objeto de ensayo con el ensayo de hipertrofia descrito anteriormente. 45 En este modelo, la arteria pulmonar del ratón es contraída con la finalidad de generar hipertrofia y fallo pulmonar.

#### D. Modelo de ratón transgénico

- 50 Ratones transgénicos que albergan un gen de fusión favorecedor de actina muscular-IGF-I muestran hipertrofia músculo-esquelética y cardíaca, sin evidencia de miopatía o de fallo cardíaco. Además, los ratones dirigidos al gen IGF-I muestran defectos en la biogénesis cardíaca (al igual que en el esqueleto), incluyendo los genes de proteína contráctil de músculo ventricular de expresión marcadamente decreciente. El CHF purificado es objeto de prueba en estos dos modelos.

- 55 Modelos adicionales de disfunción cardíaca y cardiomiopatía dilatada, sin necrosis, basados en genética pueden ser desarrollados en ratones transgénicos y en ratones dirigidos a gen (ratones MLC-ras; banda aórtica de ratones deficientes en IGF-I heterozigotos).

#### E. Modelo de rata para post-infarto de miocardio

- 60 El CHF purificado es también objeto de comprobación en un modelo de rata post-infarto de miocardio, el cual resulta predictivo de fallo cardíaco congestivo humano en la producción de péptido natriurético. Específicamente, ratas Sprague-Dawley macho (Charles River Breeding Laboratories, Inc, ocho semanas de edad) son aclimatadas a la instalación durante al menos una semana antes de la cirugía. Las ratas son alimentadas con comida para rata peletizada y agua a voluntad y alojadas en una habitación clara, con la temperatura controlada.

### 1. Ligado de arteria coronaria

El infarto de miocardio se produce por el ligado de la arteria coronaria izquierda, tal y como se describe por parte de Greenen *et al.*, *J. Appl. Physiol.*, 93: 92-96 (1987) y Buttrick *et al.*, *Am. J. Physiol.*, 260: 11473-11479 (1991).  
 5 Las ratas son anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg, por vía intraperitoneal), incubadas via traqueotomía y ventiladas por medio de un respirador (Harvard Apparatus Model 863). Después de llevar a cabo una toracotomía en el lado izquierdo, la arteria coronaria izquierda es ligada aproximadamente a 2 mm de su origen con una sutura de seda 7-0. Animales simulados son sometidos al mismo procedimiento con la excepción de que la sutura se hace pasar por debajo de la arteria coronaria y después es eliminada. La totalidad de las ratas es manipulada según la "Posición  
 10 de la Asociación de Corazón Americano sobre so de Animales en Investigación", adoptada el 11 de noviembre de 1984 por la American Heart Association. Entre cuatro y seis semanas después del ligado, el infarto de miocardio podía evolucionar hacia fallo cardíaco en ratas.

En pacientes clínicos, el infarto de miocardio o la enfermedad coronaria constituye la causa más habitual de fallo  
 15 cardíaco. El fallo cardíaco congestivo en este modelo imita razonablemente el fallo cardíaco congestivo en la mayoría de pacientes humanos.

### 2. Electrocardiogramas

Una semana después de la cirugía, se obtienen electrocardiogramas en condiciones de anestesia suave con metofano, para documentar el desarrollo de infartos. Las ratas ligadas de este estudio son subagrupadas en función de la profundidad y persistencia de ondas Q patológicas a través de derivaciones precordiales. Buttrick *et al.*, *supra*; Kloner *et al.*, *Am. Heart J.*, 51: 1009-1013 (1983). Esto proporciona un estimativo bruto del tamaño del infarto y asegura el que los infartos grandes y los pequeños no se encuentran distribuidos de forma diferencial en las ratas ligadas tratadas con CHF o con antagonistas CHF y vehículo. La confirmación se efectúa mediante medición precisa del tamaño de infarto.  
 20  
 25

### 3. Administración de CHF o de antagonista de CHF

Transcurridas cuatro semanas desde la cirugía, el CHF o el antagonista de CHF (10 µg/kg a 10 mg/kg, dos veces al día durante 15 días) o el vehículo salino son inyectados subcutáneamente, tanto en ratas ligadas como en controles simulados. Se mide el peso corporal dos veces por semana durante el tratamiento. El CHF o el antagonista de CHF son administrados en solución salina o agua como vehículo.  
 30

### 4. Caracterización

Después de 13 días de tratamiento con CHF, antagonista de CHF o vehículo, las ratas son anestesiadas con pentobarbital sódico (50 mg/kg, vía intraperitoneal). Un catéter (PE 10 fusionado con PE 50) relleno con solución salina-heparina (50/U/mL) es implantado en la aorta abdominal, a través de la arteria femoral derecha, para llevar a cabo la medición de la presión arterial y el ritmo cardíaco. Un segundo catéter (PE-50) es implantado en la aurícula derecha a través de la vena yugular, para determinar la medición de la presión auricular derecha y para inyectar la solución salina. Para la medición de la presión ventricular izquierda y la contractilidad (dP/dt), un tercer catéter (PE-50) es implantado en el ventrículo izquierdo a través de la arteria carótida derecha. Para la medición del gasto cardíaco a través de un procedimiento de termodilución, se inserta un termistor (Lyons Medical Instrument Co., Sylmar, CA) en el arco aórtico. Los catéteres son exteriorizados en la parte posterior del cuello con la ayuda de un alambre de acero inoxidable tunelado de forma subcutánea y después fijados. Después de la implantación del catéter, la totalidad de las ratas son alojadas individualmente.  
 40  
 45

### 5. Mediciones hemodinámicas

Un día después de la cateterización, el catéter termistor es procesado en un sistema de microcomputadora (Lyons Medical Instrument Co.) para determinación del gasto cardíaco, y los restantes tres catéteres son conectados a un transductor de presión Modelo CP-10 (Century Technology Company, Inglewood, CA), acoplado a un polígrafo Grass Model 7 (Grass instruments, Quincy, MA). La presión arterial media (MAP), la presión arterial sistólica (SAP), el ritmo cardíaco (HR), la presión arterial derecha (RAP), la presión sistólica ventricular izquierda (LVSP), la presión media ventricular izquierda (LVMP), la presión final diastólica ventricular izquierda (LVEDP), la presión sistólica ventricular izquierda (LVSP), la presión media ventricular izquierda (LVMP), la presión final diastólica ventricular izquierda (LVEDP), y la máxima ventricular izquierda (dP/dt) son medidas en ratas conscientes, no reprimidas.  
 50

Para la medición del gasto cardíaco, se inyectan 0,1 mL de solución salina isotónica, en forma de bolus, a temperatura ambiente, a través del catéter de la vena yugular. La curva de termodilución es monitorizada a través de registradores de traza simultánea VR-16 (Noneywell Co., NY) y el gasto cardíaco (CO) es obtenido de forma digital a través de la microcomputadora. El volumen sistólico (SV)=CO/HR; el índice cardíaco (CI)= CO/BW; la resistencia vascular sistémica (SVR)= MAP/CI.  
 60

Tras la medición de estos parámetros termodinámicos, se recoge 1 mL de sangre a través del catéter arterial. El suero es separado y almacenado a -70°C para medición de los niveles de CHF o de diversos parámetros bioquímicos, si así se desea.  
 65

# ES 2 276 393 T3

A la conclusión de los experimentos, las ratas son anestesiadas con pentobarbital sódico (60 mg/kg) y el corazón es detenido en diástole con inyección intra-auricular de KC1 (1M). Se extrae el corazón y la aurícula y los grandes vasos son extraídos del ventrículo. El ventrículo es pesado y fijado en formalina tamponada al 10%.

- 5 La totalidad de los experimentos son aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee of Genentech Inc, con anterioridad al inicio del estudio.

## 6. *Mediciones de tamaño de infarto*

- 10 La pared libre del ventrículo derecho es diseccionada del ventrículo izquierdo. El ventrículo izquierdo es cortado en cuatro rodajas transversales desde el vértice hasta la base. Se cortan cinco secciones de micrómetro, se tiñen con tinte tricomo de Massons y se montan. Las circunferencias endocárdicas y epicárdicas del ventrículo izquierdo infartado y no infartado son determinadas con un planímetro Digital Image Analyzer. La circunferencia infartada y la circunferencia ventricular izquierda de las cuatro rodajas son sumadas separadamente para cada una de las superficies 15 epicárdicas y endocárdicas y la suma son expresadas en forma de ratio de circunferencia infartada a circunferencia ventricular izquierda para cada una de las superficies. Estas dos relaciones son después promediadas y expresadas en forma de porcentaje para tamaño de infarto.

## 7. *Análisis estadístico*

- 20 Los resultados son expresados en forma de media ± SEM. Se llevan a cabo análisis a una vía y dos vías de varianza (ANOVA), para valorar las diferencias en parámetros dentro de los grupos. Las diferencias significativas son después sometidas a análisis *post hoc*, utilizando el procedimiento de Newman-Keuls. P<0,05 es considerado significativo.

## 25 8. *Resultados*

No se espera que el peso corporal medio antes y después del tratamiento con CHF o con antagonista CHF o vehículo sea diferente entre los grupos experimentales. El tamaño del infarto en ratas ligadas no se espera que difiera entre el grupo tratado con vehículo y el grupo tratado con CHF, o con antagonista de CHF.

- 30 Se espera que la administración de CHF o de antagonista de CHF a las ratas ligadas, a las dosis expuestas anteriormente, de lugar a una hipertrofia cardíaca mejorada, mediante el incremento de la contractilidad ventricular y el descenso en la resistencia vascular periférica sobre la observada con los controles simulados tratados con vehículo y en los controles de rata ligados. Este resultado esperado demostraría que la administración de CHF o de antagonista 35 de CHF mejora la función cardíaca en el fallo cardíaco congestivo. En ratas simuladas, no obstante, la administración de CHF o de antagonista de CHF, a esta dosis, no se espera que modifique significativamente la función cardíaca, con la excepción de un posible ligero descenso en la presión arterial y en la resistencia vascular periférica.

- 40 Podría esperarse, razonablemente, que los datos de rata en el presente documento puedan ser extrapolados a caballos, vacas, humanos y a otros mamíferos, efectuando correcciones, en función del peso corporal del mamífero, según procedimientos clínicos y veterinarios reconocidos. Utilizando protocolos y procedimientos habituales, el clínico o veterinario será capaz de ajustar las dosis, la pauta y el modo de administración el CHF o del antagonista de CHF, para alcanzar los efectos máximos en el mamífero que está siendo tratado. Se cree que los humanos responderán también de este modo.

## 45 Ejemplo III

### *Tratamiento clínico propuesto de cardiomiopatía dilatada*

#### 50 A. *Intervención*

- Se propone la autoadministración en pacientes de CHF o de antagonista de CHF, a una dosis inicial de entre 10 y 150 µg/kg/día. La dosis sería ajustada hacia abajo en el caso de efectos adversos. Si no se determinan efectos 55 benéficos y efectos adversos no limitativos en el momento de la re-evaluación, la dosis sería ajustada hacia arriba. Las dosis de medicación concurrentes (por ejemplo, captopril como inhibidor ACE y diuréticos) serían ajustadas a discreción del médico del estudio. Una vez administrada la dosis máxima durante 8 semanas, la administración de CHF o de antagonista de CHF se detiene, y la re-evaluación se lleva a cabo después de un período de tiempo similar fuera de tratamiento (o un placebo).

#### 60 B. *Criterios de inclusión*

Los pacientes serían considerados para participar en el estudio si cumplen con los siguientes criterios:

- Cardiomiopatía dilatada (DCM). DCM idiopática o DCM isquémica sin áreas concretas de aquinesia/disquinesia 65 del ventrículo izquierdo (LV), en ventriculografía de contraste o ecocardiografía 2D. Evidencia de función sistólica dificultosa, incluyendo, o bien dimensión diastólica final de LV(EDD) > 3,2 cm/m<sup>2</sup> BSA, o EDV > 82 mL/m<sup>2</sup> sobre ecocardiografía 2D, acortamiento fraccional LV < 28% en ecocardiografía, o fracción de eyeción (mediante ventriculografía de contraste o angiografía de radionúclido) < 0,49.

# ES 2 276 393 T3

- Síntomas. New York Heart Association clase III o ejercicio pico  $\text{VO}_2 < 16 \text{ mL/kg/min}$  (ajustado por edad), estable durante al menos un mes con digoxina, diuréticos y vasodilatadores (inhibidores ACE).

5 - Terapia inhibidora de ACE concurrente

- "ventanas" ecocardiográficas adecuadas, para permitir la valoración del volumen y la masa ventricular izquierda.

10 - Capacidad de auto-administración de CHF o de antagonista de CHF, según el programa de dosificación, y de regresar, de forma fiable, para valoraciones de seguimiento.

10 - Consentimiento del paciente y del médico primario del paciente para participar.

15 - Ausencia de criterios de exclusión.

## 15 C. Criterios de exclusión

Los pacientes serán excluidos si son tomadas en consideración cualquiera de las siguientes razones:

20 - Cardiomiopatía dilatada como resultado de enfermedad cardíaca valvular (operable o no), etiologías tratables específicas (incluyendo alcohol, si no se ha intentado la abstinencia) o enfermedad de arteria coronaria operable.

25 - Ejercicio limitado por dolor en pecho o enfermedad vascular periférica obstructiva.

25 - Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

30 - Diabetes mellitus o dificultades de tolerancia de glucosa.

30 - Historia de síndrome de túnel carpal o evidencia de señal de Tinel positiva, tras examen.

35 - Historial de piedras en riñón.

35 - Osteoartritis sintomática.

35 - Incapacidad para consentir o para participar en ergometría bicíclica en serie, con monitorización hemodinámica invasiva (tal y como se describe más adelante)

40 - Malignidad activa

## D. Valoración del paciente

40 1) Puntos de valoración importantes: base, después de pico estable de CHF o de antagonista de CHF, se mantiene la dosis durante 8 semanas; después, igual periodo de interrupción a partir del cese en la administración del fármaco.

45 - Se puede anticipar que los pacientes permanecerían en el hospital durante dos o tres días al inicio del tratamiento activo, con pesadas diarias y datos de laboratorio, incluyendo electrolitos, fósforo, BUN, creatinina y glucosa. A continuación, serían monitorizados en el piso del Clinical Research Center durante un período adicional de dos o tres días.

50 i. Examen físico

50 ii. Marcador de puntos de síntomas (Nelly *et al.*, Amer. Heart J., 119: 1111 [1990]).

55 iii. Datos de laboratorio: CBC; electrolitos (incluyendo  $\text{Mg}^{+2}$  y  $\text{Ca}^{+2}$ ); BUN; creatinina, fósforo; perfil de lípidos y de glucosa en ayunas (colesterol total, HDL-C, LDL-C, triglicéridos); prueba de funcionamiento de hígado (AST, ALT, fosfatasa alcalina, bilirrubina total); proteína total, albúmina, ácido úrico y CHF.

60 iv. Ecocardiografía doppler, 2D y modo-M, incluyendo: dimensiones diastólica y sistólica, a nivel de músculo papilar; estimado de fracción de eyección por planimetría de área, a partir de vistas de cámara 2 y de cámara 4 apicales, volúmenes diastólicos y sistólicos estimados mediante el procedimiento de la regla de Simpson y masa ventricular izquierda estimada; valoración doppler de entrada de flujo en la válvula mitral (IVRT, pico E, pico A, tiempo de desaceleración, duración de onda A), y perfil de flujo de vena pulmonar (área de flujo sistólico, área de flujo diastólico, duración inversa A y velocidad).

65 v. Hemodinámica de descanso y en ejercicio y consumo de oxígeno, medido utilizando una ergometría en bicicleta, con catéteres arteriales y pulmonares insertados de forma percutánea. El nivel de esfuerzo percibido sería marcado en la escala Borg y las mediciones presión sistólica en arteria pulmonar,

## ES 2 276 393 T3

diastólica y medias, al igual que presiones arteriales y la presión de enclavamiento capilar pulmonar sería medida en cada uno de los incrementos de carga de trabajo, junto con el contenido de oxígeno venoso mezclado y arterial, para calcular el gasto cardíaco.

- 5 vi. Valoración de la grasa corporal y de la masa corporal magra, al igual que el aguante y la resistencia muscular esquelética.

### 2) Puntos de valoración interinos: semanalmente

- 10 i) Examen físico  
ii) Marcador de puntos de síntomas  
iii) Datos de laboratorio: electrolitos, BUN, creatinina, fósforo, glucosa en ayunas, somatomedina-C y CHF.

### E. Beneficios potenciales

- 1) Sensación de bienestar mejorada.
- 20 2) Tolerancia al ejercicio incrementada
- 3) Resistencia muscular y masa corporal magra incrementadas
- 4) Resistencia vascular sistémica reducida
- 25 5) Comportamiento cardíaco reforzado
- 6) Hipertrofia miocárdica compensatoria reforzada.

### Ejemplo IV

#### Comprobación de actividad neurotrófica *in vitro*

Se llevó a cabo un ensayo utilizado para determinar la actividad neurotrófica de los ganglios filiales, tal y como se describe por Leung, *Neuron*, 8: 1045-1053 (1992). Brevemente, los ganglios ciliares fueron diseccionados a partir de embriones de pollo E7-E8 y se disociaron en trispsina-EDTA (Gibco 15400-013) diluido diez veces en solución salina tamponada durante 15 minutos a 37°C. Los ganglios fueron lavados para liberarlos de trispsina, con tres lavados de medio de crecimiento (D-MEM con glucosa elevada, suplementado con suero bovino fetal 10%, glutamina 1,5 mM, penicilina 100 µg/mL y estreptomicina 100 µg/mL) y después se trituró suavemente en 1 mL de medio de crecimiento en una suspensión de célula única. Las neuronas fueron enriquecidas mediante colocación en placas de esta mezcla celular en 5 mL de medio de crecimiento sobre un plato de medio de cultivo de 100 mm durante 4 horas a 37°C, en un incubador de cultivo tisular. Durante este tiempo, las células no neuronales se pegaron preferencialmente al plato y las neuronas fueron lavadas suavemente hasta dejarlas libres al final de la incubación.

45 Las neuronas enriquecidas fueron después colocadas en placas de 96 pocillos, previamente revestidos con colágeno. En cada uno de los pocillos se colocaron entre 1000 y 2000 células, con un volumen final de entre 100 y 250 µL, con diluciones del medio acondicionado a partir de células 293 transfectadas por pchf.781 del Ejemplo I. Las células fueron también colocadas en placas, junto con el medio acondicionado 293 transfectado como control, y con un habitual CNTF como comparación. Después de transcurrido un período de incubación de entre 2 y 4 días a 37°C, 50 se valoró el número de células vivas mediante teñido de las mismas utilizando el tinte vital metalotionina (MTT). Una quinta parte del volumen de MTT de 5 mg/mL (Sigma M2128) fue añadido a los pocillos. Después de transcurrido un período de incubación de entre 2 y 4 horas a 37°C, se procedió al conteo de las células vivas (rellenadas con un denso precipitado púrpura), mediante microscopía con un aumento de 100x.

55 Los resultados del ensayo se muestran en la Figura 4. Puede observarse que la transfección pchf.781 (triángulos) incrementaba la supervivencia de las neuronas vivas (medido mediante conteo celular), dado que la fracción de volumen de ensayo de medio acondicionado 293 transfectado aumentaba. Esto es similar al patrón para el CNTF habitual (círculos) y está en contraste con la transfección control (cuadrados), la cual no mostraba incremento en la supervivencia como función de la fracción incrementada de volumen de ensayo de medio incrementado. Esto indica que el 60 CHF resulta de utilidad como agente neurotrófico, teniendo un efecto similar al observado con el CNTF.

### Ejemplo V

Una fuente de mRNA que codifica para CHF humano (conocido también como cardiotrofina-1 humana [CT-1]) 65 fue identificada mediante cribado de poly(A)+RNA procedente de varios tejidos adultos, con una sonda procedente de clones cDNA CHF de ratón. El corazón, el músculo esquelético, el colon, el ovario y la próstata mostraron una banda de 1,8 kb, tras hibridación de mancha con una sonda CHF de ratón 180-bp (extendiéndose desde 19 bp 5' del ATG de inicio a través del aminoácido 50) en formamida 20%, 5 x SSC a 142°C, con un lavado final a 0,25 x SSC a 52°C.

# ES 2 276 393 T3

Los clones que codifican para CT-1 humano fueron aislados mediante cribado de una librería de cDNA de corazón humano (Clontech) con la misma sonda y condiciones (lavado final a 55°C).

5 Se aislaron 11 clones después de cribar 1 millón. Los insertos EcoRI de varios de los clones fueron subclonados en vectores plásmidos y se determinaron sus secuencias de DNA.

La secuencia de DNA procedente del clon h5 (SEQ ID NOS: 6 y 7 para las hebras sentido y antisentido, respectivamente) se muestra en la Figura 5 e incluye la región de codificación completa. El clon h5 (pBSSK+hu.CT1.h5) fue depositado el 26 de julio de 1994 en la American Type Culture Collection, como ATCC N°. 75.841. La secuencia de 10 DNA de otro clon, designado como h6, coincide con la del clon h5 en la región de solapamiento. El clon h6 empieza en la base 47 del clon h5 y se extiende 3' del clon h5 durante 521 bases adicionales. La secuencia de proteína codificada de CT-1 humano (SEQ ID NO: 8) es idéntica en un 79% a la secuencia CHF de ratón (SEQ ID NO: 3), como resulta evidente a partir de la Figura 6, en la que el anterior es designado como "humct1" y el posterior es designado como "chf.781".

15 Para demostrar que el CT-1 humano codificado por el clon h5 es biológicamente activo, el fragmento EcoRI fue clonado en el vector de expresión de mamífero pRK5 (EP 307.247), en el único punto EcoRI para proporcionar el plásmido pRK5.hu.CTI. Este plásmido fue transfectado en células 293 humanas y las células mantenidas en medio libre de suero durante un período de entre 3 y 4 días. Este medio fue después sometido a ensayo para determinar 20 la hipertrofia de miocito, tal y como se describe anteriormente para el CHF de ratón. El medio acondicionado 293 transfectado resultó ser claramente activo en este ensayo (marcador de hipertrofia de 5,5, a una dilución 1:20).

## Depósito de material

25 El siguiente plásmido ha sido depositado ante la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC):

	Plásmido	Dep. ATCC n°.	Fecha de depósito
30	pBSSK+hu.CT1.h5	75.841	26 julio 1994

El depósito fue efectuado de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest sobre International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo fiable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito se pondrá a disposición por parte de la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest y sujeto a un acuerdo entre Genentech Inc y ATCC, lo que asegura la disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito para el público, tras la concesión de la correspondiente patente USA o tras la publicación de cualquier solicitud de patente USA o de otros países, lo que tenga lugar primero y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por el US Comissioner of Patents and Trademarks como autorizado al mismo, según el 35USC§122 y las reglas del Comissioner de acuerdo con el mismo (incluyendo 37 CFR § 1,14, con particular referencia a 886 OG 638).

45 El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de plásmido en depósito dejara de existir o se perdiera o destruyera siendo cultivado en las condiciones adecuadas, se procedería a la pronta sustitución del plásmido, tras notificación, por otro de del mismo plásmido. La disponibilidad del plásmido depositado no tiene que ser construida como una licencia para practicar la invención, en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno según sus leyes de patentes.

50 La precedente memoria escrita es considerada como suficiente para permitir que un experto en la materia lleva la invención a la práctica. La presente invención no tiene que quedar limitada en su campo de protección a la construcción depositada, dado que la realización depositada pretende ser una única ilustración de determinados aspectos de la invención y cualquier construcción que resulte funcionalmente equivalente cae dentro del campo de protección de la invención. El depósito de material en el presente caso no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento resulta inadecuada para llevar a la práctica cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni tiene que ser construida como limitativa del campo de protección de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que la misma declara. Ciertamente, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la precedente descripción y caen dentro del campo de las reivindicaciones anexas.

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Polipéptido factor de hipertrofia cardíaca (CHF) aislado, excluyendo el de rata, que comparte al menos el 75% de identidad de secuencia con la secuencia traducida mostrada en la Figura 1 y que muestra una actividad biológica de actividad hipertrófica, inotrópica, anti-arrítmica o neurotrófica de un polipéptido CHF de origen natural.
- 10      2. Polipéptido CHF de la reivindicación 1, que tiene la secuencia traducida mostrada en la Figura 1.
- 15      3. Polipéptido CHF de la reivindicación 1, que es CHF maduro humano que tiene la secuencia traducida mostrada en la Figura 5.
- 20      4. Anticuerpo aislado que es capaz de unirse al polipéptido CHF de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3.
- 25      5. Anticuerpo de la reivindicación 4, que comprende un anticuerpo monoclonal, químérico, humanizado o biespecífico o uno de sus fragmentos que se une a antígeno.
- 30      6. Línea celular hibridoma que produce el anticuerpo de la reivindicación 4 ó de la reivindicación 5.
- 35      7. Procedimiento para detectar CHF, que comprende la puesta en contacto del anticuerpo de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, con una muestra o célula sospechosa de contener CHF y la detección de si ha tenido lugar la unión.
- 40      8. Procedimiento para purificar moléculas de CHF, que comprende la puesta en contacto de una fuente de CHF que contiene las moléculas de CHF que tienen que ser purificadas con el anticuerpo de la reivindicación 4 o de la reivindicación 5 inmovilizado sobre un soporte, bajo condiciones en las cuales las moléculas de CHF que tienen que ser purificadas son adsorbidas de forma selectiva sobre el anticuerpo inmovilizado, el lavado del soporte para eliminar el material no adsorbido, y la elución con un tampón de elución de las moléculas que tienen que ser purificadas del anticuerpo en el cual las mismas están adsorbidas.
- 45      9. Molécula de ácido nucleico aislada que codifica para el CHF de las reivindicaciones 1, 2 ó 3.
- 50      10. Molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, que comprende la secuencia de ácido nucleico de marco de lectura abierto mostrada en la Figura 1.
- 55      11. Molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, que comprende la secuencia de ácido nucleico de marco de lectura abierto mostrada en la Figura 5.
- 60      12. Molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, que comprende, además, un favorecedor unido operativamente a la molécula de ácido nucleico.
- 65      13. Molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, que es DNA y que comprende la secuencia de DNA traducida mostrada en la Figura 1.
- 70      14. Molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, que es DNA y comprende la secuencia de DNA traducida mostrada en la Figura 5.
- 75      15. Molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, que está marcada.
- 80      16. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 85      17. Vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9, unida operativamente a secuencias control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.
- 90      18. Célula huésped que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.
- 95      19. Procedimiento de utilización de una molécula de ácido nucleico que codifica para CHF, para efectuar la producción de CHF, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 18.
- 100     20. Procedimiento de la reivindicación 19, en el que el CHF es recuperado a partir de la célula huésped.
- 105     21. Procedimiento de la reivindicación 19, en el que el CHF es recuperado del medio de cultivo de células huésped.
- 110     22. Procedimiento de la reivindicación 19, en el que la célula huésped es transfectada con un vector de expresión que comprende una molécula ácido nucleico de CHF.
- 115     23. Procedimiento para determinar la presencia de una molécula de ácido nucleico de CHF en una muestra de prueba, que comprende hibridar la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9 a un ácido nucleico de la muestra de prueba y determinar la presencia de ácido nucleico de CHF.

# ES 2 276 393 T3

24. Procedimiento de amplificación de una muestra de prueba de ácido nucleico que comprende el cebado de una reacción en cadena de polimerasa de ácido nucleico de la muestra de prueba con una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9.

5 25. Procedimiento para someter a ensayo una muestra de prueba para determinar la actividad hipertrófica, que comprende:

- (a) colocar en placas de 96 pocillos una suspensión de miocitos a una densidad celular de aproximadamente  $7,5 \times 10^4$  células por mL en medio D-MEM/F-12, que comprende insulina, transferrina y aprotinina;
- 10 (b) cultivar las células;
- (c) añadir la muestra de prueba a las células cultivadas;
- 15 (d) cultivar las células con la muestra de prueba; y
- (e) medir la hipertrofia.

26. Uso de un polipéptido CHF según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 ó 3, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico, tallo cardíaco o un trastorno arrítmico o inotrópico.

20 27. Uso según la reivindicación 26, en el que el medicamento es para administración con un inhibidor ACE, con otro factor miocardiotorífico, anti-arrítmico o inotrópico o con una molécula neurotrófica para el tratamiento del trastorno.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**FIG. 1A**

1 GGATAAGCCT GGGGCCAGCA TGAGCCAGAG GGAGGGAAAGT CTGGAAGACC  
 CCTATTGGA CCCCGGTGCT ACTCGGTCCTC CCTCCCTTCA GACCTTCTGG  
 1 M S Q R E G S L E D H  
  
 51 ACCAGACTGA CTCCCTCAATC TCATTCCTAC CCCATTGGA GGCCAAGATC  
 TGTTCTGACT GAGGAGTTAG AGTAAGGATG GGGTAAACCT CCGTTCTAG  
 12 Q T D S S I S F L P H L E A K I  
  
 101 CGCCAGACAC ACAACCTTGC CGGCCTCTTG ACCAAATATG CAGAACAACT  
 GGGTCTGTG TGTTGGAACG GCGGGAGGAC TGGTTTATAC GTCTTGTGAA  
 28 R Q T H N L A R L L T K Y A E Q L  
  
 151 TCTGGAGGAA TACGTGCAGC AACAGGGAGA GCCCTTTGGG CTQCCCCGGCT  
 AGACCTCCCT ATGCACGTCG TTGTCCTCT CGGGAAACCC GACGGCCCOGA  
 45 L E E Y V Q Q Q G E P F G L P G F  
  
 201 TCTCACCAACC GGGGCTGGCG CTGGCCGGCC TGAGTGGCCC GGCTCCGAGC  
 AGAGTGGTGG CGCCGACGGC GACGGGCGGG ACTCACCGGG CCGAGGGCTCG  
 62 S P P R L P L A G L S G P A P S  
  
 251 CATGCAGGGC TACCGGTGTC CGAGCGGCTG CGGCAGGATG CAGCGCGCT  
 GTACGTCCCG ATGGCACACAG GCTCGCCGAC GCGTCTCTAC GTGGCGGGAA  
 78 H A G L P V S E R L R Q D A A A L  
  
 301 GAGTGTGCTG CCCCGCTGT TGGATGCCGT CGGCCGCCGC CAGGCGGAGC  
 CTCACACGAC GGGCGCGACA ACCTACGGCA GGCGGCCGGCG GTCCGCCTCG  
 95 S V L P A L L D A V R R R Q A E L  
  
 351 TGAACCCCGCG CGCCCCCGCGC CTGCTGCGGA GCCTGGAGGA CGCAGCCCGC  
 ACTTGGCGCGC GCGGGCGCG GACGACGCC CGAACCTCT CGTCCGGCG  
 112 N P R A P R L L R S L E D A A R  
  
 401 CAGGTTCGGG CCCTGGCGCG CGGGTGGAG ACAGTGTGG CGCGCGCTGGG  
 GTCCAAGCCG GGGACCCCGCG GCGCCACCTC TGTCACGACC GGGCGOGACCC  
 128 Q V R A L G A A V E T V L A A L G  
  
 451 CGCTGCAGCC CGCGGGCGCG GGCAGAGCC CGTCACCGTC GCCACCCCT  
 GCGACGTCGG CGCCCGGGC CGGGTCTCGG CGAGTGGCAG CGGTGGGAGA  
 145 A A A R G P G P E P V T V A T L F  
  
 501 TCACGGCCAA CAGCACTGCA GGCATCTCTC CAGCCAAGGT GCTGGGGTTC  
 AGTGCGGGTT GTCGTGACGT CGCTAGAAGA GTGGTCTCCA CGACCCCAAG  
 162 T A N S T A G I F S A K V L G F  
  
 551 CACGTGTGCG GCCTCTATGG CGAGTGGGTG AGCCGCACAG AGGGCGACCT  
 GTGCACACGCG CGGAGATAACC GCTCACCCAC TCGGCCTGTC TCCCGCTGGA  
 178 H V C G L Y G E W V S R T E G D L  
  
 601 GGGCCAGCTG GTGCCAGGGG CGGTGGCTG AGAGTGAATA CTTTTCTTG  
 CGGGTCTGAC CACGGTCCCC CGCAGCGGAC TCTCACTTAT GAAAAAGAAC  
 195 G Q L V P G G V A O

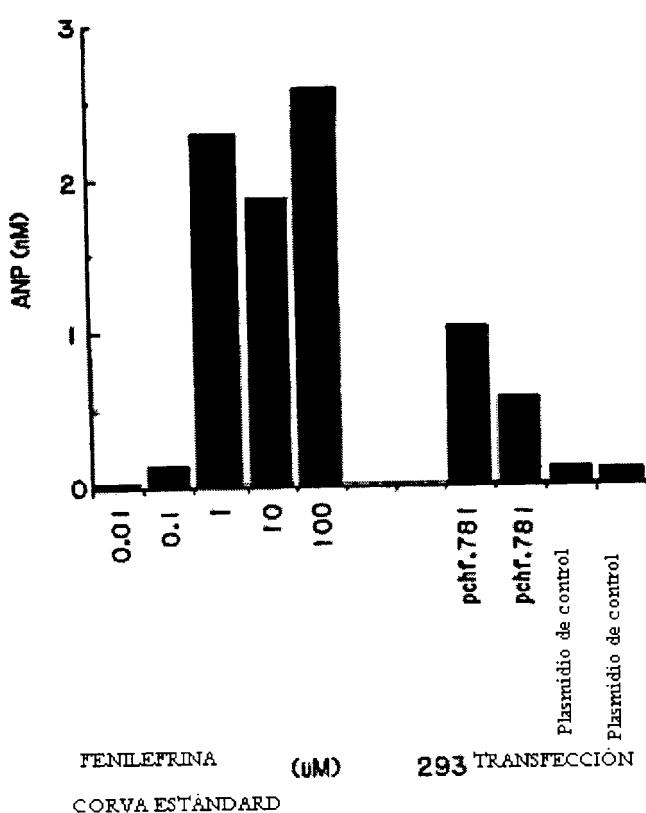
**FIG. 1B**

651 TAAGCTCGCT CTGTCGCCTC TCTTTGGCTT CAAATTTCT GTCTCTCCAT  
 ATTCGAGCGA GACAGAGCGG AGAAACCGAA GTTTAAAAGA CAGAGAGGTA  
 701 CTGTGTCCCTG TGTGTTCTTG GGCTGTCCCT ATCTTTCTGC ATTTGTGTGG  
 GACACAGGAC ACACAAGAAC CCGACAGGGA TAGAAAGACG TAAACACACC  
 751 TCTCTCTCTT CTGCTCTCCT CTCTGCAGGG AGCTTCTTT TTCCAACAGT  
 AGAGAGAGAA GACGAGAGGA GAGACGTCCC TCGAAGAAAA AAGGTTGTCA  
 801 TTCTCGTTTT GTCTCTCTCC AGTCTTGAAC ACTTTGTCT CCGAGAGGTC  
 AAGAGCAAAA CAGAGAGAGG TCAGAACTTG TGAAACAGA GGCTCTCCAG  
 851 TCTTTTGT TCCCTGTCTC TTGGTTCTT CTTTGTTC TTGCTTGCTT  
 AGAAAAACAA AGGAACAGAG AACCAAGAAA GAAACGAACG AACGAACGAA  
 901 GCTTGCTTGT TGTTGAGACA GGGTCTCACC ATATAGCTCT GGATGGCCTG  
 CGAACGAACA ACAACTCTGT CCCAGAGTGG TATATCGAGA CCTACCGGAC  
 951 GAACTTGCTA TGTAGGCCAG GCTGGCCTCC AGCTCATAGA GATCCACTTG  
 CTGAAAGAT ACATCCGGTC CGACCGGAGG TCGAGTATCT CTAGGTGAAC  
 1001 CCTCCGACTC CCAATTCCCC CATCTGTCTC CCTGTGATCC ATATGGGTAT  
 GGAGGCTGAG GGTTAAAGGG GTAGACAGAG GGACACTAGG TATAACCCATA  
 1051 GTGTAACCCCT TACTTTGTCT CATGGAGGTG ACAATTTC TCCCCTCAGT  
 CACATTGGGA ATGAAACAGA GTACCTCCAC TGTAAAAAG AGGGAAGTCA  
 1101 TTCTTTGTTC TTTACTGACC AGAAAAGTGC CTACTTGTCC CCTGGTGGCA  
 AGAAAACAAG AAATGACTGG TCTTTCTAGG GATGAAACAGG GGACCAACGGT  
 1151 AGGCCATTCA CCTTAGGACC TTCCCACCAAG TTCTTTGTGA GGCAAATCCC  
 TCCGGTAAGT GGAATCCTGG AAGGGTGGTC AAGGAAACAT CCGTTTAGGG  
 1201 TCCCCCTTTC AGGTCTTCC CTTTCATACC GCCCTAGGCT GGTCAATGGA  
 AGGGGAAAC TCCAGGAAGG GAAAGTATGG CGGGATCCGA CCAGTTACCT  
 1251 GAGAGAAAGG CAGAAAAACA TCTTTAAAGA GTTTTATTG AGAATAAATT  
 CTCTCTTCC GTCTTTTGT AGAAATTCT CAAAATAAAC TCTTATTAA  
 1301 AATTTTGTA AATAAAATGT TTAACAATAA AACTAAACTT TTATGAAAAA  
 TTAAAAACAT TTATTTACA AATTGTATT TTGATTTGAA ATAACCTTTT  
 1351 AA (polyA)  
 TT

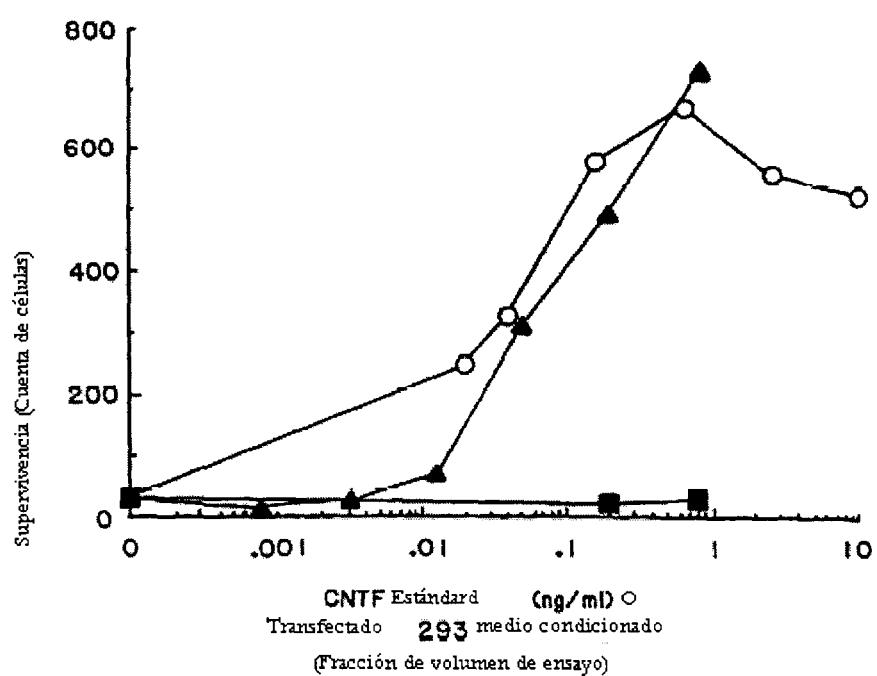
**FIG. 2**

chf. 781	MSQREGSLEDHQTDSSISFLPHLEAKIROTHNILARLLTKYAEQLLEEYVQ ***                  ***          *  *  *
humcntf	MAPTEHSPPLTPHRRDLCRSRSTIWLARKIRSDLTALTESYVK 10              20              30              40
60              70              80              90              100	
chf. 781	QQGEPPFGLPGFSPPRLFLAGLSGPAPSHAGLPVSERLRQDAALSVLPAL **              *          *          ***          *          *
humcntf	HQGLNKNINLDSADGMPVA----STDQWSELTEAERLQENLQAYRTFHVL 50              60              70              80
110            120            130            140	
chf. 781	LD-AVRRRQAELNPRAPRLLRSLEDAARQVALGAAVETVLAALGAAARG *              *          *          ***          *          *
humcntf	LARLLEDQQVHFTPTEGDFHQAINTLLLQVAAFAYQIEELMILLEYKIPR 90              100            110            120            130
150            160            170            180            190	
chf. 781	PGPEPVTVATLFTANSTAGIFSAKVLGFHVCGLYGEWVSRTEDDLGQLVP *              *          *          *          *          *
humcntf	NEADGMPINV----GDGGLFEKKLWGLKVLQELSOWTVRSIHDL-RFIS 140              150            160            170            180
200	
chf. 781	GGVAO
humcntf	SHQTGIPARGSHYIANNKIM 190              200

FIG. 3



**FIG. 4**



**FIG. 5A**

1 GTGAAGGGAG CCGGGATCA G CAGGGGCCA GCATGAGCCG GAGGGAGGGA  
 1 CACTTCCCTC GGCCCTAGTC GGTCCCCGGT CGTACTCGGC CTCCCTCCCT  
 M S R R E G  
  
 51 AGTCTGGAAG ACCCCCAGAC TGATTCTCA GTCTCACTTC TTCCCCACTT  
 7 TCAGACCTTC TGGGGTCTG ACTAAGGAGT CAGAGTGAAG AAGGGGTGAA  
 S L E D P Q T D S S V S L L P H L  
  
 101 GGAGGCCAAG ATCCGTCAAG CACACAGCT TGCGCACCTC CTCACCAAAT  
 24 CCTCCGGTTC TAGGCAGTCT GTGTGTGGAA ACGGGTGGAG GAGTGGTTTA  
 E A K I R Q T H S L A H L L T K Y  
  
 151 ACGCTGAGCA GCTGCTCCAG GAATATGTGC AGCTCCAGGG AGACCCCTTC  
 41 TGCGACTCGT CGACGAGGTC CTTATAACACG TCGAGGTCCC TCTGGGGAAAG  
 A E Q L L Q E Y V Q L Q G D P F  
  
 201 GGGCTGCCCA GCTTCTCGCC GCCGCGGCTG CCGGTGGCCG GCCTGAGCGC  
 57 CCCGACGGGT CGAACAGCGG CGGCGCCGAC GGCCACCGGC CGGACTCGCG  
 G L P S F S P P R L P V A G L S A  
  
 251 CCCGGCTCCG AGCCACGCGG GGCTGCCAGT GCACCGAGCGG CTGGGGCTGG  
 74 GGGCGGAGGC TCGGTGCGCC CCGACGGTCA CGTGTGCGCC GACGCCGACC  
 P A P S H A G L P V H E R L R L D  
  
 301 ACGGGGCGGC GCTGGCGCGC CTGCCCCCGC TGCTGGACGC AGTGTGTCGC  
 91 TGCGCCGCGC CGACCGCGCGC GACGGGGGGCG ACQACCTGCU TCAACACAGCG  
 A A A L A A L P P L L D A V C R  
  
 351 CGCCAGGGCG AGCTGAACCC GGGCGCGCGC CGGCTGCTGC GCGGCGTGG  
 107 GCGGTCCGGC TCGACTTGGG CGCGCGCGGC GCGGACGACG CGGCGGACCT  
 R Q A E L N P R A P R L L R R L E  
  
 401 GGACGCGGCG CGCCAGGGCC GGGCCCTGGG CGCCGCCGTG GAGGCCTTGC  
 124 CCTGCGCCGC GCGGTCCGGG CCCGGGACCC GCGGCGGCAC CTCCGGAACG  
 D A A R Q A R A L G A A V E A L L  
  
 451 TGGCCGCGCT GGGCGCGGCC AACCGGGGGC CCCGGGCCGA GCGGGGGGCC  
 ACCGGCGCGA CGGGCGGCCG TTGGCGCCCG GGGCCCGGCT CGGGGGGGCGG  
 141 A A L G A A N R G P R A E P P A

**FIG. 5B**

501 GCCACCGCCT CAGCCGCCTC CGGCCACGGGG GTCTTCCCCG CCAAGGTGCT  
 CGGTGGCGGA GTGGGCGGAG CGGGTGGCCC CAGAAGGGGC GGTTCCACGA  
 157 A T A S A A S A T G V F P A K V L  
  
 551 GGGGCTCGCG GTTTGCGGCC TCTACCGCGA GTGGCTGAGC CGCACCGAGG  
 CCCCGAGGGG CAAACGGCGG AGATGGCGCT CACCGACTCG GCGTGGCTCC  
 174 G L R V C G L Y R E W L S R T E G  
  
 601 GCGAACCTGGG CCAGCTGCTG CCCGGGGGCT CGGCCCTGAGC GCCGCGGGGC  
 CGCTGGACCC GGTGGACGGAC GGGCCCCCGA GCGGACTCG CGGCACCCCG  
 191 D L G Q L L P G G S A O  
  
 651 AGCTCGCCCC GCCTCCCTCCC GCTGGGTTCC GTCTCTCCTT CCGCTTCCTT  
 TCGAGCGGGG CGGAGGAGGG CGACCCAAGG CAGAGAGGAA GGCGAAGAAA  
  
 701 GTCTTCTCT GCCGCTGTCG GTGTCTGTCT GTCTGCTCTT AGCTGTCTCC  
 CAGAAAGAGA CGGCGACAGC CACAGACAGA CAGACGAGAA TCGACAGAGG  
  
 751 ATTGCCCTCGG CCTTCTTTGC TTTTGTGGG GGAGAGGGGA GGGGACGGGC  
 TAACGGAGCC GGAAGAACCG AAAAACACCC CCTCTCCCTT CCCCTGCCCG  
  
 801 AGGGTCTCTG TCGCCCAGGC TGGGGTGCAG TGGCGCGATC CCAGCACTGC  
 TCCCAGAGAC AGCGGGTCCG ACCCCACGTC ACCGCGCTAG GGTCGTGACG  
  
 851 AGCTCTAACCC TCCTGGGCTC AAGCCATCCT TCCGCCTCAG CTTCCCCAGC  
 TCGGAGTTGG AGGACCCGAG TTCGGTAGGA AGGCGGAGTC GAAGGGGTCTG  
  
 901 AGCTGGGACT ACAGGCACGC GCCACCACAG CGGGCTAATT TTTTATTTAA  
 TCGACCCCTGA TGTCCGTGCG CGGTGGTGTC GGCGGATTAA AAAATAATT  
  
 951 TTTTTGTAG AGACGGAGGTT TCGCCATGTT GCCCAGGCTG GTCTTGAACCT  
 AAAAACATC TCTGCTCCAA AGCGGTACAA CGGGTCCGAC CAGAACTTGA  
  
 1001 CGGGGGCTCA AGCGATCC  
 GGGCCCCGAGT TCGCTAGG

**FIG. 6**

humct1	1	MSRREGSLEDPQTDSVSLLPHLEAKIRQTHSLAHLTKYAEQLLQEYVQLOG
		** ***** * ***** * ***** * * ***** * * * * *
chf.781	1	MSQREGSLEDHQTDSIISFLPHLEAKIRQTHNLARILLTKYAEQLLEETVQQOG
		***** *
humct1	54	DPFGLPSFSPPRILFVAGLSAPAPSRAAGLPVHERLRLDAALAALPPPLDAVCR
		***** *
chf.781	54	FPPMLPGFSPPRILPLAGLSGPAPSHAGLPWSERILRQDAALSVPALLDAVRR
		***** *
humct1	107	RQAELNPRAPRLLRRLEDAARQARALGAAVEALLAALGAANRGPRAEPPARTA
		***** *
chf.781	107	RQAELNPRAPRLLRSLEDAARQVRALGAAVETVLAALGAAARGPGPEPVTVAT
		***** *
humct1	160	--SAASATGVFPAXVLGLRVCGLYREWLSRTEGDLGQLLPGGSA
		* *
chf.781	160	LFTANSTAGIPSAKVLGFHVCGLYGEWWSRTEGDLGQLVPGGVA

ES 2 276 393 T3

**LISTA DE SECUENCIAS**

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5                   (i) SOLICITANTE: Genentech, Inc  
                     (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Cardiotrofina y usos de la misma  
                     (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 8  
10                  (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:  
                     (A) DESTINATARIO: Genentech, Inc  
                     (B) CALLE: 460 Point San Bruno Blvd.  
15                  (C) CIUDAD: South San Francisco  
                     (D) ESTADO: California  
                     (E) PAÍS: USA  
                     (F) ZIP: 94080  
20                  (v) FORMA LEIBLE POR ORDENADOR:  
                     (A) TIPO DE MEDIO: 5,25 pulgadas, disco magnético flexible de 360 kb.  
                     (B) ORDENADOR: PC compatible IBM  
25                  (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS  
                     (D) SOFTWARE: patin (Genentech)  
                     (vi) DATOS DE SOLICITUD HABITUALES  
30                  (A) NÚMERO DE SOLICITUD  
                     (B) FECHA DE SOLICITUD  
                     (C) CLASIFICACIÓN  
                     (vii) DATOS DE LA SOLICITUD PRIORITARIA  
35                  (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/233609  
                     (B) FECHA DE SOLICITUD: 25 de abril de 1994  
                     (viii) INFORMACIÓN AGENTE/ABOGADO  
40                  (A) NOMBRE: Hasak, Janet E.  
                     (B) NÚMERO DE REGISTRO: 28.616  
                     (C) NÚMERO DE REFERENCIA DEL DOSIER: 894P1PCT  
45                  (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

50

55

60

65

ES 2 276 393 T3

GGATAAGCCT GGGGCCAGCA TGAGCCAGAG GGAGGGAAGT CTGGAAGACC 50  
5 ACCAGACTGA CTCCCTCAATC TCATTCCTAC CCCATTTGGA GGCCAAGATC 100  
10 CGCCAGACAC ACAACCTTGC CCGCCTCCTG ACCAAATATG CAGAACAACT 150  
15 TCTGGAGGAA TACGTGCAGC AACAGGGAGA GCCCTTTGGG CTGCCGGGCT 200  
20 TCTCACCACC GCGGCTGCCG CTGGCCGGCC TGAGTGGCCC GGCTCCGAGC 250  
25 CATGCAGGGC TACCGGTGTC CGAGCAGGCTG CGGCAGGATG CAGCCGCCCT 300  
30 GAGTGTGCTG CCCGCGCTGT TGGATGCCGT CCGCCGCCGC CAGGCGGAGC 350  
35 TGAACCCGCG CGCCCCCGCGC CTGCTGCCGA GCCTGGAGGA CGCAGCCCGC 400  
40 CAGGTTGGGG CCCTGGGCGC CGCGGTGGAG ACAGTGCTGG CCGCGCTGGG 450  
45 CGCTGCAGCC CGCGGGCCCG GGCCAGAGCC CGTCACCGTC GCCACCTCT 500  
50 TCACGGCAA CAGCACTGCA GGCATCTTCT CAGCCAAGGT GCTGGGTTTC 550  
55 CACGTGTGCG GCCTCTATGG CGAGTGGGTG AGCCGCACAG AGGGCGACCT 600  
60 GGGCCAGCTG GTGCCAGGGG GCGTCGCCTG AGAGTGAATA CTTTTCTTG 650  
65 TAAGCTCGCT CTGTCTCGCC TCTTTGGCTT CAAATTTCT GTCTCTCCAT 700  
70 CTGTGTCTTG TGTGTTCTTG GGCTGTCCCT ATCTTCTGC ATTTGTGTGG 750  
75 TCTCTCTCTT CTGCTCTCTT CTCTGCAGGG AGCTTCTTT TTCCAACAGT 800  
80 TTCTCGTTTT GTCTCTCTCC AGTCTTGAAC ACTTTGTCT CCGAGAGGTC 850  
85 TCTTTTGTT TCCTTGTCTC TTGGTTCTTT CTTTGCTTGC TTGCTTGCTT 900  
90 GCTTGCTTGT TGTGAGAGACA GGGTCTCACCA ATATAGCTCT GGATGGCCTG 950  
95 GAACTTGCTA TGTAGGCCAG GCTGGCCTCC AGCTCATAGA GATCCACTTG 1000  
100 CCTCCGACTC CCAATTCCCC CATGTGTCTC CCTGTGATCC ATATGGGTAT 1050

ES 2 276 393 T3

GTGTAACCT TACTTGTCT CATGGAGGTG ACAATTTTC TCCCTTCAGT 1100

5 TTCTTTGTTC TTTACTGACC AGAAAAGTGC CTACTTGTCC CCTGGTGGCA 1150

10 AGGCCATTCA CCTTAGGACC TTCCCACCAAG TTCCCTTGTA GGCAAATCCC 1200

15 TCCCCCTTG AGGTCTTCC CTTTCATACC GCCCTAGGCT GGTCAATGGA 1250

20 GAGAGAAAGG CAGAAAAACA TCTTTAAAGA GTTTTATTTG AGAATAAATT 1300

AATTTTGTA AATAAAATGT TTAACAATAA AACTAAACTT TTATGAAAAA 1350

25 AA 1352

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1352 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

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

CCTATTCGGA CCCCGGTCGT ACTCGGTCTC CCTCCCTTCA GACCTTCTGG 50

40 TGGTCTGACT GAGGAGTTAG AGTAAGGATG GGGTAAACCT CCGGTTCTAG 100

GCGGTCTGTG TGTTGGAACG GGCGGAGGAC TGGTTTATAC GTCTTGTGA 150

45 AGACCTCCCTT ATGCACGTCG TTGTCCCTCT CGGGAAACCC GACGGCCCGA 200

50 AGAGTGGTGG CGCCGACGGC GACCGGCCGG ACTCACCGGG CCGAGGCTCG 250

55 GTACGTCCCG ATGGCCACAG GCTCGCCGAC GCGTCCTAC GTCGGCGGGA 300

60 CTCACACGAC GGGCGCGACA ACCTACGGCA GGCGGCGGCG GTCCGCCTCG 350

ACTTGGGCGC GCGGGGCGCG GACGACGCCT CGGACCTCCT GCGTCGGGCG 400

65 GTCCAAGCCC GGGACCCGCG GCGCCACCTC TGTCAAGACC GCGCGACCC 450

ES 2 276 393 T3

GCGACGTCGG GCGCCCGGGC CCGGTCTCGG GCAGTGGCAG CGGTGGGAGA 500  
5 AGTGCCGGTT GTCGTGACGT CCGTAGAAGA GTCGGTTCCA CGACCCCAAG 550  
10 GTGCACACGC CGGAGATAAC GCTCACCCAC TCGGCGTGTC TCCCCTGGA 600  
15 CCCGGTCGAC CACGGTCCCC CGCAGCGGAC TCTCACTTAT GAAAAAGAAC 650  
20 ATTGAGCGA GACAGAGCGG AGAAACCGAA GTTTAAAAGA CAGAGAGGTA 700  
25 GACACAGGAC ACACAAGAAC CCGACAGGGA TAGAAAGACG TAAACACACC 750  
30 AGAGAGAGAA GACGAGAGGA GAGACGTCCC TCGAAGAAAA AAGGTTGTCA 800  
35 AAGAGCAAAA CAGAGAGAGG TCAGAACTTG TGAAAACAGA GGCTCTCCAG 850  
40 AGAAAAACAA AGGAACAGAG AACCAAGAAA GAAACGAACG AACGAACGAA 900  
45 CGAACGAACA ACAACTCTGT CCCAGAGTGG TATATCGAGA CCTACCGGAC 950  
50 CTTGAAACGAT ACATCCGGTC CGACCGGAGG TCGAGTATCT CTAGGTGAAC 1000  
55 GGAGGCTGAG GTTTAAAGGG GTAGACAGAG GGACACTAGG TATAACCCATA 1050  
60 CACATTGGGA ATGAAACAGA GTACCTCCAC TGTTAAAAG AGGGAAGTCA 1100  
65 AAGAAACAAG AAATGACTGG TCTTTCACG GATGAACAGG GGACCACCGT 1150  
70 TCCGGTAAGT GGAATCCTGG AAGGGTGGTC AAGGAAACAT CCGTTTAGGG 1200  
75 AGGGCGAAAC TCCAGGAAGG GAAAGTATGG CGGGATCCGA CCAGTTACCT 1250  
80 CTCTCTTCC GTCTTTTGT AGAAATTCT CAAAATAAAC TCTTATTTAA 1300  
85 TTAAAAACAT TTATTTACA AATTGTTATT TTGATTTGAA AATACTTTT 1350

60 TT 1352

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 203 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido

# ES 2 276 393 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 3

5           Met Ser Gln Arg Glu Gly Ser Leu Glu Asp His Gln Thr Asp Ser  
      1                       5                       10                       15

10           Ser Ile Ser Phe Leu Pro His Leu Glu Ala Lys Ile Arg Gln Thr  
      20                       25                       30

15           His Asn Leu Ala Arg Leu Leu Thr Lys Tyr Ala Glu Gln Leu Leu  
      35                       40                       45

20           Glu Glu Tyr Val Gln Gln Gly Glu Pro Phe Gly Leu Pro Gly  
      50                       55                       60

25           Phe Ser Pro Pro Arg Leu Pro Leu Ala Gly Leu Ser Gly Pro Ala  
      65                       70                       75

30           Pro Ser His Ala Gly Leu Pro Val Ser Glu Arg Leu Arg Gln Asp  
      80                       85                       90

35           Ala Ala Ala Leu Ser Val Leu Pro Ala Leu Leu Asp Ala Val Arg  
      95                       100                       105

40           Arg Arg Gln Ala Glu Leu Asn Pro Arg Ala Pro Arg Leu Leu Arg  
      110                       115                       120

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

50           Val Glu Thr Val Leu Ala Ala Leu Gly Ala Ala Ala Arg Gly Pro  
      140                       145                       150

55           Gly Pro Glu Pro Val Thr Val Ala Thr Leu Phe Thr Ala Asn Ser  
      155                       160                       165

60           Thr Ala Gly Ile Phe Ser Ala Lys Val Leu Gly Phe His Val Cys  
      170                       175                       180

65           Gly Leu Tyr Gly Glu Trp Val Ser Arg Thr Glu Gly Asp Leu Gly  
      185                       190                       195

70           Gln Leu Val Pro Gly Gly Val Ala  
      200                       203

50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

55 (A) LONGITUD: 200 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 4

ES 2 276 393 T3

45 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 50 bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIPO DE HEBRA: úni
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 5

GCGGCCGCGA GCTCGAATTC TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

50

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1018 bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) TIPO DE HEBRA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 276 393 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO: 6

5                    GTGAAGGGAG CCGGGATCAG CCAGGGGCCA GCATGAGCCG GAGGGAGGGA 50  
10                  AGTCTGGAAG ACCCCCAGAC TGATTCTCA GTCTCACTTC TTCCCCACTT 100  
15                  GGAGGCCAAG ATCCGTCAGACACACAGCCT TGCGCACCTC CTCACCAAAT 150  
20                  ACGCTGAGCA GCTGCTCCAG GAATATGTGC AGCTCCAGGG AGACCCCTTC 200  
25                  GGGCTGCCCA GCTTCTCGCC GCCCGGGCTG CCGGTGGCCG GCCTGAGCGC 250  
30                  CCCGGCTCCG AGCCACGCGG GGCTGCCAGT GCACGAGCGG CTGCGGCTGG 300  
35                  ACGGCGCGGC GCTGGCCGCG CTGCCCCCGC TGCTGGACGC AGTGTGTCGC 350  
40                  CGCCAGGCCG AGCTGAACCC GCGCGCGCCG CGCTGCTGC GCCGCCTGGA 400  
45                  GGACGCGGCG CGCCAGGCCG GGGCCCTGGG CGCCGCCGTG GAGGCCTTGC 450  
50                  TGGCGCGCCT GGGCGCCGCC AACCGCGGGC CCCCCGGCCGA GCCCCCCGCC 500  
55                  GCCACCGCCT CAGCCGCCTC CGCCACCGGG GTCTTCCCCG CCAAGGTGCT 550  
60                  GGGGCTCCGC GTTGCGGCC TCTACCGCGA GTGGCTGAGC CGCACCGAGG 600  
65                  GCGACCTGGG CCAGCTGCTG CCCGGGGGCT CGGCCTGAGC GCGCGGGGC 650  
70                  AGCTCGCCCC GCCTCTCTCC GCTGGGTTC GCTCTCTTT CCGCTTCTTT 700  
75                  GTCTTTCTCT GCCGCTGTCG GTGTCTGTCT GTCTGCTCTT AGCTGTCTCC 750  
80                  ATTGCCTCGG CCTTCTTTGC TTTTGTGGG GGAGAGGGGA GGGGACGGGC 800  
85  
90  
95

ES 2 276 393 T3

AGGGTCTCTG TCGCCCAGGC TGGGGTGCAG TGGCGCGATC CCAGCACTGC 850

5 AGCCTCAACC TCCTGGGCTC AAGCCATCCT TCCGCCTCAG CTTCCCCAGC 900

AGCTGGACT ACAGGCACGC GCCACCACAG CGGGCTAATT TTTTATTAA 950

10 TTTTTTAG AGACGAGGTT TCGCCATGTT GCCCAGGCTG GTCTTGAACT 1000

15 CCGGGGCTCA AGCGATCC 1018

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1018 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 25 (C) TIPO DE HEBRA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:7

30

35

40

45

50

55

60

65

# ES 2 276 393 T3

CACTTCCCTC GGCCCTAGTC GGTCCCCGGT CGTACTCGGC CTCCCTCCCT 50  
5 TCAGACCTTC TGGGGGTCTG ACTAAGGAGT CAGAGTGAAG AAGGGGTGAA 100  
CCTCCGGTTTC TAGGCAGTCT GTGTGTCGGA ACGCGTGGAG GAGTGGTTA 150  
10 TGCAGACTCGT CGACGGAGGTC CTTATACACG TCGAGGTCCC TCTGGGAAG 200  
CCCAGCGGGT CGAAGAGCGG CGGCAGCGAC GGCCACCGGC CGGACTCGCG 250  
15 GGGCCGAGGC TCGGTGCGCC CCGACGGTCA CGTGCTCGCC GACGCCGACC 300  
TGCGCCGCG CGACCGGCGC GACGGGGCG ACACCTGCG TCACACAGCG 350  
20 GCGGTCCGGC TCGACTTGGG CGCGCGCGC GCGGACGACG CGGCGGACCT 400  
CCTGCGCCGC CGGGTCCGGG CCCGGGACCC GCGGCGGCAC CTCCGGAACG 450  
ACCGGGCGGA CCCGCGGCGG TTGGCGCCCG GGGCCCGGCT CGGGGGCGG 500  
30 CGGTGGCGGA GTCGGCGGAG GCGGTGGCCC CAGAAGGGGC GGTTCCACGA 550  
CCCCGAGGCG CAAACGCCCG AGATGGCGCT CACCGACTCG GCGTGGCTCC 600  
35 CGCTGGACCC GTCGACGAC GGGCCCCCGA GCCGACTCG CGGCGCCCCG 650  
TCGAGCGGGG CGGAGGAGGG CGACCCAAGG CAGAGGAGAA GCGAAGAAA 700  
40 CAGAAAGAGA CGCGCACAGC CACAGACAGA CAGACGAGAA TCGACAGAGG 750  
TAACGGAGCC GGAAGAAACG AAAAACACCC CCTCTCCCT CCCCTGCCCG 800  
45 TCCCAGAGAC AGCGGGTCCG ACCCCACGTC ACCCGCTAG GGTGTTGACG 850  
TCGGAGTTGG AGGACCCGAG TTCGGTAGGA AGGCGGAGTC GAAGGGTTCG 900  
50 TCGACCCCTGA TGTCCGTGCG CGGTGGTGTGTC GGCGGATTAA AAAATAAATT 950  
AAAAAACATC TCTGCTCCAA AGCGGTACAA CGGGTCCGAC CAGAACTTGA 1000  
55 GGGCCCGAGT TCGCTAGG 1018  
60

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 201 aminoácidos  
(B) TIPO: áminoácido

ES 2 276 393 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:8

5	Met Ser Arg Arg Glu Gly Ser Leu Glu Asp Pro Gln Thr Asp Ser	1	5	10	15
	Ser Val Ser Leu Leu Pro His Leu Glu Ala Lys Ile Arg Gln Thr		20	25	30
10	His Ser Leu Ala His Leu Leu Thr Lys Tyr Ala Glu Gln Leu Leu		35	40	45
	Gln Glu Tyr Val Gln Leu Gln Gly Asp Pro Phe Gly Leu Pro Ser		50	55	60
15	Phe Ser Pro Pro Arg Leu Pro Val Ala Gly Leu Ser Ala Pro Ala		65	70	75
	Pro Ser His Ala Gly Leu Pro Val His Glu Arg Leu Arg Leu Asp		80	85	90
20					
	Ala Ala Ala Leu Ala Ala Leu Pro Pro Leu Leu Asp Ala Val Cys		95	100	105
25	Arg Arg Gln Ala Glu Leu Asn Pro Arg Ala Pro Arg Leu Leu Arg		110	115	120
	Arg Leu Glu Asp Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala Leu Gly Ala Ala		125	130	135
30	Val Glu Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly Ala Ala Asn Arg Gly Pro		140	145	150
	Arg Ala Glu Pro Pro Ala Ala Thr Ala Ser Ala Ala Ser Ala Thr		155	160	165
35	Gly Val Phe Pro Ala Lys Val Leu Gly Leu Arg Val Cys Gly Leu		170	175	180
	Tyr Arg Glu Trp Leu Ser Arg Thr Glu Gly Asp Leu Gly Gln Leu		185	190	195
40	Leu Pro Gly Gly Ser Ala		200	201	

45

50

55

60