(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 279 508**

(51) Int. Cl.:
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/52 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **94902233 .9**
(86) Fecha de presentación : **15.11.1993**
(87) Número de publicación de la solicitud: **0669929**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.1995**

(54) Título: **Ligando elk, una citoquina.**

(30) Prioridad: **13.11.1992 US 977693**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2007

(73) Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**
51 University Street
Seattle Washington 98101, US

(72) Inventor/es: **Lyman, Stewart;**
Beckmann, M. Patricia y
Baum, Peter R.

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Ligando elk, una citoquina.

Antecedentes de la invención

La proteína de la superficie de la célula denominada elk es un miembro de una familia de proteínas conocidas como receptoras de la tirosina quinasa. Las proteínas de esta familia tienen una actividad intrínseca de la quinasa que se activa por en enlazamiento al ligando (Ullrich y colaboradores, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:713, 1986). Se descubrió primero un clon parcial de elk en una genoteca de expresión de ADNc de cerebro de rata que fue seleccionada por las proteínas que expresan la actividad de la tirosina quinasa (Letwin y colaboradores, *Oncogene*, 3:621, 1988). Luego, se derivó una secuencia completa que se expande por la región completa de codificación de elk a partir de clones parciales aislados a partir de una genoteca de ADNc de cerebro de rata y de una genoteca de cerebro cerebeloso de rata utilizando el clon parcial como una sonda (Lhotak y colaboradores, *Mol. Cell. Biol.* 11:2496, 1991). La proteína elk está muy cercanamente relacionada con una variedad de otros receptores de tirosina quinasas, incluidos hek (Boyd y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 267:3262, 1992 y Wicks y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 89:1611, 1992); los homólogos de hek mek4 y cek4 (Sajjadi y colaboradores, *New Biol.* 3:769, 1991); eek (Chan y colaboradores, *Oncogene* 6:1057, 1991); erk (Chan y colaboradores, *supra*.), eck (Lindberg y colaboradores, *Mol. Cell. Biol.* 10:6316, 1990); cek5 (Pasquale, E.B., *Cell Regulation* 2:523, 1991); y eph (Hirai y colaboradores, *Science* 238:1717, 1987). Las proteínas de esta subfamilia están relacionadas no solamente en sus dominios citoplasmáticos, sino también en sus dominios extracelulares, que son 41 a 68% idénticos. En forma muy interesante, las distribuciones en el tejido de estos diferentes receptores son diversas. Por ejemplo, la expresión del ARNm de elk se ha observado que se limita a los testículos y al cerebro (Lhotak y colaboradores, *supra*), mientras que eck se encuentra no solamente en estos mismos dos tejidos sino en el pulmón, el intestino, el riñón, el bazo, el ovario, al igual que en la piel.

Los ligandos para el receptor de las tirosina quinasas son un grupo diverso de proteínas que afectan el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia de las células que expresan a los receptores. Hasta la fecha, no se ha descubierto un ligando para elk. La identificación del ligando putativo probaría ser útil en la investigación de la naturaleza de los procesos celulares que podrían estar regulados por la proteína elk.

Resumen de la invención

La presente invención provee una nueva citoquina denominada ligando elk (elk-L) que se une al receptor de la superficie de la célula de la rata conocido como elk. La presente invención también proporciona ADN aislado que codifica a la proteína elk-L, vectores de expresión que contienen al ADN aislado, y un método para producir elk-L por medio del cultivo de células huésped que contienen a los vectores de expresión bajo condiciones apropiadas para la expresión de la proteína elk-L. También se divulgan los anticuerpos dirigidos contra la proteína elk-L o un fragmento inmunogénico de los mismos.

Descripción detallada de la invención

En el primer aspecto de la presente invención se provee un ADN aislado que codifica a una proteína elk-L capaz de enlazarse a elk, en donde dicho ADN contiene una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de los nucleótidos 1-1041, 73-1041, 1-711 y 73-711 de la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto de la presente invención se provee un ADN aislado que codifica a una proteína elk-L capaz de enlazamiento a elk, en donde dicho elk-L contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de los aminoácidos 1-322 y 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, la presente invención provee proteína elk-L madura biológicamente activa purificada caracterizada porque la secuencia de aminoácidos N-terminal es Ala-Thr-Pro-Leu-Ala-Lys-Asn-Leu-Glu-Pro-Val-Ser.

En otro aspecto, la presente invención provee una proteína elk-L purificada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste de los aminoácidos 1-322 y 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

Un ADNc que codifica a un nuevo ligando de proteína que se enlaza a una proteína en la superficie de la célula de rata conocido como elk ha sido aislado de acuerdo con la presente invención. También se proveen los vectores de expresión que contienen al ADNc del ligando elk (elk-L) y métodos para producir polipéptidos elk-L recombinantes por medio del cultivo de células huésped que contienen a los vectores de expresión bajo condiciones apropiadas para la expresión de elk-L, y recuperar al elk-L expresado. La proteína purificada de elk-L es también abarcada por la presente invención, incluidas las formas solubles de la proteína que contiene al dominio extracelular.

La presente invención también provee elk-L o fragmentos antigénicos del mismo que pueden actuar como inmunógenos para generar anticuerpos específicos para los inmunógenos elk-L. Los anticuerpos monoclonales específicos para elk-L o fragmentos antigénicos del mismo pueden ser por lo tanto.

La nueva cisteína divulgada aquí es un ligando para elk, un receptor de la superficie de la célula de rata que es un miembro de la familia del receptor de la tirosina quinasa. Los miembros de esta familia de receptores tienen una actividad de quinasa que se activa por enlazamiento del ligando. El enlazamiento de elk-L a elk sobre la superficie de la célula puede iniciar una señal biológica medida por elk. Un uso del ligando elk de la presente invención es como una herramienta de investigación para estudiar la naturaleza de esta señal biológica y el papel que elk-L, junto con elk, pueden jugar en el desarrollo o en la diferenciación de las células que soportan al receptor de elk. La expresión del ARNm de elk ha sido detectada en el cerebro y los testículos de las ratas (Lhotak y colaboradores, *supra*), y se ha sugerido la posibilidad de que elk sea capaz de activación oncogénica (Letwin y colaboradores, *supra*).

Los polipéptidos de elk-L de la presente invención encuentran uso como reactivos para purificación de proteína y también pueden ser empleados en análisis *in vitro* para la detección de elk o de elk-L o las interacciones de los mismos. Estos y otros usos de los ligandos elk se discuten adicionalmente más adelante.

Para identificar a las células adecuadas para ser usadas como fuentes de ácido nucleico en el intento de clonación, se seleccionaron más de 30 tipos diferentes de células humanas y murinas por su habilidad para enlazar elk (en la forma de una proteína de fusión que contiene elk de rata y un polipéptido en Fc del anticuerpo). Como se describe en el Ejemplo 2, ninguno de los tipos de células exhibía un enlazamiento detectable de elk. Ya que el tejido placentario es rico en factores de crecimiento y diferenciación, se seleccionó una genoteca de expresión de ADNc de placenta humana con elk/Fc de rata en un intento para aislar un clon de elk-L. Aunque no se sabía si una placenta expresó o no un elk-L, y la habilidad de elk de rata para enlazarse a elk-L humano también era desconocida, se aisló exitosamente el ADNc de elk-L humano como se describe en el Ejemplo 3. La secuencia de ADN y la secuencia codificada de aminoácidos de la región de codificación de un clon de ADNc de elk-L humano se exponen en la SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2.

Se aisló el ADNc de elk-L humano que contiene la región de codificación a partir del clon positivo y se lo insertó dentro del sitio Sma I (en la región del sitio de clonación múltiple) del vector de clonación pBLUESCRIPT® SK(-), disponible con Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA. El vector resultante recombinante, designado tele 7 en pBLUESCRIPT® SK(-), en células DH5α de *E. coli*, fue depositado con el American Type Culture Collection el 9 de octubre de 1992, y se le asignó el número de acceso No. ATCC 69085. El depósito se hizo bajo los términos del Tratado de Budapest.

La comparación tanto de las secuencias de nucleótidos como de aminoácidos codificados del clon de ADNc de elk-L humano con las bases de datos Swisspro y del Genbank mostraron que la secuencia del ligando elk era única. Se identificó una secuencia de aminoácidos en esta búsqueda que compartió una identidad limitada de secuencia con el ligando elk. Esa secuencia era para la proteína B61, que había sido previamente identificada como el producto de un gen nuevo de respuesta temprana inmediata inducido por TNF en células endoteliales de la vena umbilical humana (Holzman y colaboradores, *Mol. Cell. Biol.* 10:5830, 1990). Todos los cuatro residuos de cisteína en el dominio extracelular de las dos proteínas están conservados, y la identidad total de aminoácidos entre elk-L humano y B61 es del 33%. En contraste con el ligando elk, se ha reportado que se segrega la proteína B61, pero termina con una cola hidrófoba y se ha sugerido que está asociada con la membrana a través de un enlace con glicosilfosfatidil inositol (Holzman y colaboradores, *supra*). La función de la proteína B61 es desconocida.

El término "elk-L" como se lo utiliza aquí se refiere a un género de polipéptidos que son capaces de enlazarse a elk y exhibir homología con los polipéptidos elk-L nativos divulgados aquí, que contienen una secuencia de aminoácidos que está por encima del 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. El elk-L humano está dentro del alcance de la presente invención, como lo son las proteínas elk-L derivadas de otras especies de mamíferos incluidos pero no limitándose a células de murino, rata, bovino, porcino, o de diferentes primates. Como se lo utiliza aquí el término "elk-L" incluye proteínas enlazadas a la membrana (que contienen un dominio citoplasmático, una región transmembrana, y un dominio extracelular) así como proteínas truncadas que retienen la propiedad de enlazamiento a elk. Tales proteínas truncadas incluyen, por ejemplo elk-L soluble que contiene únicamente al dominio extracelular (enlazamiento al receptor).

El ADNc de elk-L humano puede ser radiomarcado y utilizado como una sonda para aislar otros ADNc de elk-L de mamífero por medio de hibridación cruzada entre especies. Por ejemplo, una genoteca de ADNc preparada a partir de tejido de placenta de otra especie de mamífero puede ser seleccionada con ADNc de elk-L humano radiomarcado para aislar un clon positivo. Alternativamente, los ARNm aislados de diferentes líneas celulares se pueden seleccionar por medio de hibridación de Northern para determinar una fuente adecuada de ARNm de elk-L de mamífero para el uso en la clonación de un gen de elk-L.

Aunque se empleó una proteína de fusión elk/Fc en el procedimiento de selección descrito en el Ejemplo 3 más adelante, elk puede ser utilizado para seleccionar los clones y las líneas celulares candidatas para la expresión de las proteínas elk-L. La proteína de fusión elk/Fc, sin embargo, ofrece la ventaja de poderse purificar fácilmente. Además, se forman enlaces disulfuro entre las regiones Fc de dos cadenas separadas de proteína de fusión, creando dímeros. El receptor dimérico elk/Fc fue escogido por la ventaja potencial de un enlazamiento más alto por afinidad de el ligando elk. En vista de la posibilidad de que el ligando que está siendo buscado fuera multimérico.

Otras regiones Fc del anticuerpo pueden se sustituidas por la región Fc de la IgG humana descrita en el Ejemplo 1. Otras regiones Fc adecuadas son aquellas que pueden enlazarse con gran afinidad a la proteína A o a la proteína G,

e incluyen a la región Fc de la IgG de murino o fragmentos de la región Fc de IgG1 humana, por ejemplo, fragmentos que contiene al menos la región de bisagra de tal manera que se formaran los enlaces disulfuro entre cadenas.

Una modalidad de la presente invención provee polipéptidos elk-L solubles. Los polipéptidos elk-L solubles contiene todo o parte del domino extracelular de un elk-L nativo pero carece de la región transmembrana que causaría la retención del polipéptido sobre una membrana celular. Los polipéptidos elk-L solubles contienen convenientemente al polipéptido señal nativo (o un heterólogo) cuando se lo sintetiza inicialmente para promover la secreción, pero el péptido señal se escinde por la secreción de elk-L a partir de la célula. Los polipéptidos elk-L solubles que se pueden emplear retienen la capacidad para enlazar al receptor de elk. El elk-L soluble puede incluir también parte de la región transmembrana o parte del domino citoplasmático u otras secuencias, siempre que la proteína elk-L soluble pueda ser secretada.

El elk-L soluble se puede identificar (y distinguir de su contraparte no soluble enlazada a la membrana) separando las células intactas que expresan la proteína deseada a partir del medio de cultivo, por ejemplo, por centrifugación, y analizando el medio (sobrenadante) por la presencia de la proteína deseada. La presencia de elk-L en el medio indica que la proteína fue secretada de las células y por lo tanto es una forma soluble de la proteína deseada. El elk-L soluble puede ser una forma de ocurrencia natural de esta proteína.

El uso de formas solubles de elk-L es conveniente para ciertas aplicaciones. La purificación de las proteínas a partir de las células huésped recombinantes se facilita, ya que las proteínas solubles son secretadas a partir de las células. Además, las proteínas solubles son generalmente más adecuadas para administración intravenosa.

Los ejemplos de polipéptidos elk-L solubles incluyen a aquellos que comprenden al dominio extracelular completo de una proteína elk-L nativa. Una de tales proteínas elk-L solubles comprende desde el aminoácido 1 (Ala) hasta el aminoácido 23 (Lys) de la SEQ ID NO: 2. Cuando se expresa inicialmente dentro de una célula huésped, la proteína soluble puede comprender adicionalmente uno de los péptidos señal heterólogos descritos más adelante que es funcional dentro de las células huésped empleadas. Alternativamente, la proteína puede contener al péptido señal nativo, de tal manera que el elk-L comprende desde el aminoácido 24 (Met) hasta el aminoácido 213 (Lys) de la SEQ ID NO: 2. En una modalidad de la invención, el elk-L soluble se expresa inicialmente como una proteína de fusión que comprende (desde el N hasta el C-terminal) al péptido señal del factor α de la levadura, al péptido FLAG® descrito más adelante en la patente estadounidense No. 5.011.912, y al elk-L soluble que comprende a los aminoácidos 1-213 de la SEQ ID NO: 2. Esta proteína recombinante de fusión se expresa en y se segrega a partir de las células de levadura. El péptido FLAG® facilita la purificación de la proteína, y posteriormente se la puede escindir a partir del elk-L soluble utilizando enteroquinasa de mucosa bovina. Las secuencias de ADN que codifican a las proteínas elk-L solubles son abarcadas por la presente invención.

El elk-L truncado, incluidos los polipéptidos solubles, se pueden preparar por medio de cualquiera de una variedad de técnicas convencionales. Una secuencia deseada de ADN se la puede sintetizar químicamente utilizando técnicas conocidas. Los fragmentos de ADN también pueden ser producidos por medio de digestión con endonucleasas de restricción de una secuencia de ADN clonada de longitud completa, y aislados por medio de electroforésis sobre geles de agarosa. Se pueden emplear los enlazadores que contengan un sitio(s) para escisión por medio de una endonucleasa de restricción, para insertar el fragmento de ADN deseado dentro de un vector de expresión, o se puede digerir el fragmento en los sitios de escisión presentes naturalmente allí dentro. Se puede emplear también el procedimiento bien conocido de la reacción en cadena de la polimerasa para aislar una secuencia de ADN que codifica a un fragmento deseado de proteína. Como alternativa adicional, se pueden emplear técnicas conocidas de mutagénesis para insertar un codón de detención en un punto deseado, por ejemplo, inmediatamente secuencia abajo del codón al menos para el aminoácido del dominio extracelular.

En otra aproximación, se puede emplear un tratamiento enzimático (por ejemplo, utilizando a la exonucleasa Bal31) para suprimir a los nucleótidos terminales de un fragmento de ADN para obtener un fragmento que tenga un terminal particular deseado. Entre los enlazadores comercialmente disponibles se encuentran aquellos que se pueden ligar a extremos romos producidos por medio de la digestión con Bal31 y que contiene al(los) sitio(s) de escisión de la endonucleasa de restricción. Alternativamente, se pueden sintetizar los oligonucleótidos que reconstruyen al N o al C-terminal de un fragmento de ADN en un punto deseado. El oligonucleótido puede contener un sitio de escisión para la endonucleasa de restricción secuencia arriba de la secuencia de codificación deseada y la posición de un codón de iniciación (ATG) en el N-terminal de la secuencia de codificación.

La presente invención provee polipéptidos elk-L purificados, tanto recombinante como no recombinante. Las variantes y derivados de las proteínas elk-L nativas que retienen la actividad biológica deseada (por ejemplo, la habilidad para enlazar a elk) están también dentro del alcance de la presente invención. Las variantes de elk-L se pueden obtener por medio de mutaciones de secuencias de nucleótidos que codifican a los polipéptidos elk-L nativos. Una variante de elk-L, como la mencionada aquí, es un polipéptido sustancialmente homólogo a un elk-L nativo, pero que tiene una secuencia diferente de aminoácidos que aquella de elk-L humano (humano, murino o de otra especie de mamífero) debido a una o más supresiones, inserciones o sustituciones.

La variante de la secuencia de aminoácidos es al menos 80% idéntica a una secuencia de aminoácidos del elk-L nativo, más preferiblemente al menos 90% idéntica. El porcentaje de identidad se puede determinar, por ejemplo, comparando la información de la secuencia utilizando el programa de computador GAP, versión 6.0 descrito por

Devereux y colaboradores (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) y disponible con la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG). El programa GAP utiliza el método de alineación de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:443, 1970), como el revisado por Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math* 2:482, 1981). Los parámetros preferidos por defecto para el programa GAP incluyen: (1) una matriz unitaria de comparación (que contiene un valor de 1 para las identidades y de 0 cuando no hay identidad) para los nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgués, *Nucl. Acids Res.* 14:6745, 1986, como lo describen Schwartz y Dayhoff, eds. *Atlas of Protein Sequence and Structure*, National Biomedical Research Foundation, páginas 353-358, 1979; (2) una penalización de 3,0 por cada vacío y una penalización adicional de 0,10 por cada símbolo en cada vacío; y (3) ninguna penalización por los vacíos de los extremos. Para los fragmentos de elk-L, el porcentaje de identidad se basa en aquella porción de una proteína elk-L nativa que está presente en el fragmento.

Las alteraciones de la secuencia nativa de aminoácidos se pueden llevar a cabo por medio de cualquiera entre un cierto número de técnicas conocidas. Las mutaciones se pueden introducir en loci particulares por medio de oligonucleótidos para síntesis que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten el enlace con los fragmentos de la secuencia nativa. Después del enlace, la secuencia reconstruida resultante codifica a un análogo que tiene a la inserción, sustitución o supresión de aminoácidos deseada.

Alternativamente, se pueden emplear los procedimientos de mutagénesis específicos para el sitio, dirigidos al oligonucleótido para suministrar un gen alterado que tiene codones particulares alterados de acuerdo a la sustitución, supresión o inserción requerida. Los ejemplos de métodos para llevar a cabo las alteraciones expuestas anteriormente son divulgados por Walter y colaboradores (*Gene* 42:133, 1986); Bauer y colaboradores (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, enero de 1985, 12-19); Smith y colaboradores (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); Kunkel (*Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 82:488, 1985); Kunkel y colaboradores (*Methods in Enzymol.* 154:367, 1987); y las patentes estadounidenses Nos. 4.518.584 y 4.737.462.

Las variantes pueden contener secuencias sustituidas en forma conservadora, lo cual significa que un residuo aminoácido dado es reemplazado por un residuo que tiene características fisicoquímicas similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen sustituciones de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala por otro, o sustituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Arg, Glu y Asp, o Gln y Asn. Otras de tales sustituciones conservadoras, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características similares de hidrofobicidad, son bien conocidas.

Elk-L también puede ser modificado para crear derivados de elk-L por medio de la formación de conjugados covalentes o agregativos con otras fracciones químicas, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, acetilo y similares. Los derivados covalentes de elk-L se pueden preparar por medio del enlazamiento de fracciones químicas a grupos funcionales sobre las cadenas laterales de aminoácidos de elk-L o en el N-terminal o el C-terminal de un polipéptido elk-L o el dominio extracelular del mismo. Otros derivados de elk-L dentro del alcance de esta invención incluyen conjugados covalentes o agregativos de elk-L o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tal como por medio de síntesis en un cultivo recombinante como fusiones N-terminal o C-terminal. Por ejemplo, el conjugado puede contener una secuencia señal de polipéptidos o una secuencia líder (por ejemplo, el factor líder α de *Saccharomyices*) en el N-terminal de un polipéptido elk-L. El péptido líder o señal dirige en forma cotraduccional o postraduccional la transferencia del conjugado desde su sitio de síntesis hasta un sitio dentro o fuera de la membrana celular o de la pared celular.

Las fusiones del polipéptido elk-L pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación e identificación de elk-L. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, a poli-His o a los péptidos para identificación antigénica descritos en la patente estadounidense No. 5.011.912 y en Hopp y colaboradores, *Biol Technology* 6:1204, 1988. Uno de tales péptidos es el péptido FLAG®, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK), que es altamente antigénico y provee un epítopo enlazado en forma reversible por medio de un anticuerpo monoclonal específico que permite un rápido análisis y facilita la purificación de la proteína recombinante expresada. Esta secuencia es también escindida en forma específica por medio de la enteroquinasa de la mucosa de bovino en el residuo inmediatamente después del apareamiento de Asp-Lys. Las proteínas de fusión protegidas con este péptido pueden también ser resistentes a la degradación intracelular en *E. coli*. Un hibridoma murino designado como 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que se enlaza al péptido DYKDDDDK en presencia de ciertos cationes de metal divalente (como se describe en la patente estadounidense No. 5.011.912, incorporada como referencia) y ha sido depositado en la American Type Culture Collection bajo el número de acceso HB 9259.

La presente invención incluye además a los polipéptidos elk-L con o sin glicosilación patrón nativa asociada. Elk-L expresado en sistema de expresión de levadura o de mamífero (por ejemplo, células COS-7) puede ser similar a, o significativamente diferente de un polipéptido elk-L nativo en el peso molecular y en el patrón de glicosilación, dependiendo de la escogencia del sistema de expresión. La expresión de los polipéptidos elk-L en sistemas de expresión bacteriana, tales como *E. coli*, proporcionan moléculas no glicosiladas.

Se pueden preparar las construcciones de ADN que codifican diferentes adiciones o sustituciones de residuos o secuencias de aminoácidos, o supresiones de residuos internos o terminales o secuencias no necesarias para la actividad biológica o de enlazamiento. Por ejemplo, se pueden modificar los sitios de N-glicosilación en el dominio extracelular de elk-L para producir glicosilación, permitiendo la expresión de un carbohidrato reducido más homogéneo análogo en sistemas de expresión de mamíferos y de levaduras. Los sitios de N-glicosilación en polipéptidos de eucariotas

se caracterizan por un triplete de aminoácidos Asn-X-Y, en donde X es cualquier aminoácido excepto Pro y Y es Ser o Thr. La proteína elk-L humana contiene una tripleta así, en los aminoácidos 115-117 de la SEQ ID NO: 2. Las modificaciones apropiadas a la secuencia de nucleótidos que codifica a esta tripleta resultará en sustituciones, adiciones o supresiones que evitan la unión de residuos de carbohidratos en la cadena lateral de Asn. La alteración de un solo nucleótido, escogido a fin de que Asn sea reemplazado por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para inactivar un sitio de N-glicosilación. Los procedimientos conocidos para inactivar los sitios de N-glicosilación en proteínas incluyen a aquellas descritas en la patente estadounidense 5.071.972 y EP 276.846.

En otro ejemplo, las secuencias que codifican a los residuos de Cys que no son esenciales para la actividad biológica se pueden alterar para causar que los residuos de Cys sean suprimidos o reemplazados con otros aminoácidos, evitando la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos por renaturalización. Otras variantes se preparan por medio de la modificación de residuos dibásicos de aminoácidos adyacentes para mejorar la expresión en sistemas de levaduras en los cuales está presente la actividad de la proteasa KEX2. EP 212.914 divulga el uso de mutagénesis específica para el sitio para inactivar los sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 en una proteína. Los sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 se inactivan por medio de la supresión, adición o sustitución de los residuos para alterar a las parejas Arg-Arg, Arg-Lys y Lys-Arg, para eliminar la ocurrencia de estos residuos básicos adyacentes. Los apareamientos Lys-Lys son considerablemente menos susceptibles a la escisión por KEX2, y la conversión de Arg-Lys o de Lys-Arg a Lys-Lys representa una aproximación conservadora y preferida para inactivar a los sitios de la KEX2. El elk-L humano contiene tres sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 en los aminoácidos 242-243, 243-244, y 246-247 de la SEQ ID NO: 2.

Las variantes de elk-L de ocurrencia natural también son abarcadas por la presente invención. Los ejemplos de tales variantes son proteínas que resultan de eventos alternativos de empalme de ARNm o de escisión proteolítica de la proteína elk-L, en donde se retiene la propiedad de enlazamiento de elk-L. El empalme alternativo del ARNm puede producir una proteína elk-L truncada pero biológicamente activa, tal como u na forma soluble de la proteína de ocurrencia natural, por ejemplo. Las variaciones atribuibles a la proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los N- o C-terminales por expresión en diferentes tipos de células huésped, debido a la remoción proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína elk-L (generalmente de 1-5 aminoácidos terminales).

Las secuencias de ácido nucleico dentro del alcance de la presente invención incluyen ADN aislado y secuencias de ARN que hidrolizan a las secuencias nativas de nucleótidos de elk-L divulgadas aquí bajo condiciones de rigurosidad moderada o severa, y que codifican al elk-L biológicamente activo. Las condiciones de hibridación de rigurosidad moderada se refieren a las condiciones descritas en, por ejemplo, Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning*, 2 ed. Vol. 1, páginas 1.101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989). Las condiciones de rigurosidad moderada, como las definidas por Sambrook y colaboradores, incluyen el uso de una solución de prelavado de 5 X SSC, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0) y condiciones de hibridación aproximadamente de 55ºC, 5 X SSC, durante la noche. Las condiciones de rigurosidad severa incluyen temperaturas más altas de hibridación y lavado. Una persona entrenada reconocerá que la temperatura y la concentración salina de la solución de lavado se pueden ajustar según sea necesario de acuerdo a factores tales como la longitud de la sonda.

Debido a la degeneración conocida del código genético en donde más de un codón puede codificar al mismo aminoácido, una secuencia de ADN puede variar de aquella presentada en la SEQ ID NO: 1, y aún codificar a una proteína elk-L que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. 1. Tale variante de las secuencias de ADN puede resultar de mutaciones silenciosas (por ejemplo, que ocurren durante la amplificación por PCR), y pueden ser el producto de mutagénesis deliberada de una secuencia nativa.

La presente invención provee por lo tanto secuencias aisladas de ADN que codifican al elk-L biológicamente activado, seleccionado de: (a) ADN derivado de la región de codificación de un gen nativo de elk-L de mamífero (por ejemplo, ADNc que contiene la secuencia de nucleótidos presentada en la SEQ ID NO: 1); (b) ADN capaz de hibridación hasta un ADN de (a) bajo condiciones moderadamente restrictivas y que codifican al elk-L biológicamente activo; y (c) ADN degenerado como resultado del código genético para un ADN definido en (a) o (b) y que codifica a un elk-L biológicamente activo. Las proteínas elk-L codificadas por tales secuencias de ADN son abarcadas por la presente invención.

Los ejemplos de proteínas elk-L codificadas por el ADN que varía desde la secuencia de ADN nativo de la SEQ ID NO. 1, en donde el ADN que varía hibridará a la secuencia nativa de ADN bajo condiciones restrictivas moderadas, incluyen, pero no se limitan a, fragmentos de elk-L (solubles o enlazados a una membrana) y proteínas elk-L que contienen un sitio(s) inactivado(s) de N-glicosilación, un sitio(s) inactivado(s) para procesamiento de la proteasa KEX2, o sustitución(es) conservadora(s) de aminoácidos, como se describió anteriormente. Las proteínas elk-L codificadas por el ADN derivado de otras especies de mamíferos, en donde el ADN hibridará al ADN humano de la SEQ ID NO: 1, también son abarcados.

Las variantes que poseen el requisito de la capacidad para enlazarse a elk se pueden identificar por medio de cualquier ensayo apropiado. La actividad biológica de elk-L se puede determinar, por ejemplo, por medio de competición para enlazarse al dominio de enlazamiento del ligando elk (esto es, ensayos competitivos de enlazamiento).

Un tipo de ensayo competitivo de enlazamiento para el polipéptido elk-L utiliza elk-L humano soluble radiomarcado y células intactas que expresan elk en la superficie de la célula. En vez de células intactas, se podría sustituir elk

soluble (tal como una proteína de fusión elk/Fc) enlazado a una fase sólida a través de la interacción de una Proteína A o de una Proteína G con la región Fc de la proteína de fusión. Otro tipo de ensayo competitivo de enlazamiento utiliza elk soluble radiomarcado tal como una proteína de fusión elk/Fc, y las células intactas que expresan elk-L. Alternativamente, elk-L soluble se podría enlazar a una fase sólida.

Los ensayos competitivos de enlazamiento se pueden llevar a cabo utilizando metodología estándar. Por ejemplo, elk-L radiomarcado puede ser utilizado para competir con un homólogo putativo de elk-L para analizar la actividad de enlazamiento contra el elk enlazado a la superficie. Los resultados cualitativos se pueden obtener por medio de ensayos competitivos autorradiográficos de enlazamiento en placa, o se pueden utilizar representaciones gráficas de Scatchard para generar resultados cuantitativos.

Alternativamente, se puede enlazar el elk soluble a una fase sólida tal como una matriz cromatográfica en columna o a un sustrato similar adecuado para análisis por la presencia de una fracción detectable tal como ^{125}I. El enlazamiento a una fase sólida se puede lograr, por ejemplo, por medio del enlazamiento de una proteína de fusión elk/Fc a una matriz que contiene proteína A o proteína G.

Se pueden determinar también las características de enlazamiento de elk-L (incluidas las variantes) utilizando el elk soluble conjugado (por ejemplo, ^{125}I-elk/Fc) en ensayos de competición similares a aquellos descritos anteriormente. En este caso, sin embargo, las células intactas que expresan elk-L, o elk-L soluble enlazado a un sustrato sólido, son utilizadas para medir el grado en el cual una muestra que contiene una variante putativa de elk compite por el enlazamiento de un elk soluble conjugado a elk-L.

El elk-L de la presente invención puede ser utilizado en un ensayo de enlazamiento para detectar a las células que expresan elk. Por ejemplo, elk-L o un dominio extracelular o un fragmento del mismo se pueden conjugar a una fracción detectable tal como ^{125}I. La radiomarcación con ^{125}I se puede llevar a cabo por medio de cualquiera de las diferentes metodologías estándar que producen una molécula ^{125}I-elk-L funcional marcada para una actividad específica alta. Alternativamente, se puede utilizar otra fracción detectable tal como una enzima que puede catalizar una reacción fluorométrica o colorimétrica, biotina o avidina. Las células que van a ser analizadas por la expresión de elk se pueden poner en contacto con elk-L marcado. Después de la incubación, el elk marcado no enlazado se remueve y se mide el enlazamiento utilizando la fracción detectable.

Las proteínas del ligando elk divulgadas aquí también se las puede emplear para medir la actividad biológica de la proteína elk en términos de la velocidad de enlazamiento para elk-L. Como ilustración, se puede emplear elk-L en un estudio de afinidad de enlazamiento para medir la actividad biológica de una proteína elk que ha sido almacenada a diferentes temperaturas, o producida en diferentes tipos de células. La actividad biológica de una proteína elk se puede determinar entonces, por ejemplo antes de su uso en un estudio de investigación.

Las proteínas elk-L encuentran uso como reactivos que pueden ser empleados por aquellos que conducen estudios de "aseguramiento de calidad", por ejemplo para monitorear la vida en almacenamiento y la estabilidad de la proteína elk bajo diferentes condiciones. Los ligandos de elk se pueden utilizar para determinar si se retiene la actividad biológica después de la modificación de una proteína elk (por ejemplo, modificación química, truncamiento, mutación, etc.). La afinidad de enlazamiento de la proteína elk modificada por un elk-L se compara con aquella de una proteína elk no modificada para detectar cualquier impacto adverso de las modificaciones sobre la actividad biológica de elk.

Un uso diferente de un ligando elk es como reactivo en procedimientos de purificación de proteína. Elk-L o las proteínas de fusión elk-L/Fc se pueden unir a un material de soporte sólido por medio de técnicas convencionales y utilizarlas para purificar elk por medio de cromatografía de afinidad.

Los polipéptidos elk-L pueden existir como oligómeros, tal como dímeros o trímeros. Los oligómeros se enlazan por medio de enlaces disulfuro formados entre residuos de cisteína sobre diferentes polipéptidos elk-L. En una modalidad de la invención, se crea un dímero elk-L por medio de la fusión de elk-L a la región Fc de un anticuerpo (IgG1) en una forma que no interfiere con el enlazamiento de elk-L al dominio de enlazamiento del ligando elk. El polipéptido Fc se fusiona preferiblemente al C-terminal de un elk-L soluble (que contiene únicamente el dominio extracelular). La preparación de las proteínas de fusión contiene polipéptidos heterólogos fusionados a diferentes porciones de polipéptidos derivados de anticuerpo (incluido el dominio Fc) ha sido descrita por ejemplo por Ashkenazi y colaboradores (*PNAS USA* 88:10535, 1991) y Byrn y colaboradores (*Nature* 344:677, 1990). Una fusión del gen que codifica a la proteína de fusión elk-L/Fc se inserta dentro de un vector de expresión apropiado. Se les permite a las proteínas de fusión elk-L/Fc juntarse de manera muy parecida a moléculas de anticuerpo, después de lo cual se forman enlaces disulfuro entre las cadenas entre polipéptidos Fc, produciendo elk-L divalente. Si las proteínas de fusión se elaboran tanto con cadenas livianas como pesadas de un anticuerpo, es posible formar un oligómero elk-L con hasta cuatro regiones extracelulares de elk-L. Alternativamente, se pueden enlazar dos dominios solubles de elk-L con un enlazador de péptido tal como la secuencia del enlazador $Gly_4SerGly_5Ser$ descrita en la patente estadounidense No. 5.073.627.

La presente invención provee oligómeros de dominios extracelulares de elk-L o fragmentos del mismo, enlazados por medio de interacciones disulfuro, o expresados como polímeros de fusión con o sin grupos de enlazamiento de aminoácidos espaciadores. Por ejemplo, un dímero del dominio extracelular de elk-L puede ser enlazado por medio de un grupo de enlazamiento de la región Fc de la IgG.

La presente invención provee vectores de expresión recombinante para la expresión de elk-L, y células huésped transformadas con los vectores de expresión. Se puede emplear cualquier sistema de expresión adecuado. Los vectores incluyen una secuencia de ADN de elk-L operativamente enlazada a secuencias reguladoras adecuadas de nucleótidos transcripcionales o de traducción, tal como aquellas derivadas de un gen de mamífero, de microbio, viral o de insecto. Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen a promotores, operadores o mejoradores transcripcionales, un sitio de enlazamiento ribosomal de ARNm, y secuencias apropiadas que controlan el inicio y la terminación de la transcripción y de la traducción. Las secuencias de nucleótidos se enlazan operativamente cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de ADN de elk-L. Por lo tanto, una secuencia promotora de nucleótidos se enlaza operativamente a una secuencia de ADN de elk-L si la secuencia promotora de nucleótidos controla la transcripción de la secuencia de ADN de elk-L. La capacidad para replicar en las células huésped adecuadas, usualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección por medio del cual se identifican los transformantes, pueden ser adicionalmente incorporados dentro del vector de expresión.

Además, las secuencias que codifican a los péptido señal apropiados que no son nativos del gen de elk-L pueden ser incorporados dentro de los vectores de expresión. Por ejemplo, una secuencia de ADN para un péptido señal (líder secretor) puede ser fusionada en el marco a la secuencia elk-L para que el elk-L sea inicialmente traducido como una proteína de fusión que contiene al péptido señal. Un péptido señal que es funcional en las células huésped deseadas mejora la secreción extracelular del polipéptido elk-L. El péptido señal se escinde del polipéptido elk-L por secreción de elk-L de la célula.

Las células huésped adecuadas para la expresión de los polipéptidos elk-L incluye procariotas, levadura o células eucariotas superiores. La clonación apropiada y los vectores de expresión para el uso con huéspedes celulares bacterianos, de hongos, levadura y de mamífero son descritos, por ejemplo, en Pouwels y colaboradores, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, (1985). Los sistemas de traducción libres de células podrían ser empleados también para producir polipéptidos elk-L utilizando los ARN derivados de las construcciones de ADN divulgadas aquí.

Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacilos*. Las células huésped procariotas adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium*, y varias otras especies dentro del género *Pseudomonas, Streptomyces*, y *Staphylococcus*. En una célula huésped procariota, tal como *E. coli*, un polipéptido elk-L puede incluir un residuo N-terminal de metionina para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula huésped procariota. La Met N-terminal puede ser escindida a partir del polipéptido elk-L recombinante expresado.

Los vectores de expresión para uso en células huésped procariotas comprenden generalmente uno o más genes marcadores seleccionables fenotípicos. Un gen marcador seleccionable fenotípico es, por ejemplo, un gen que codifica a una proteína que confiere resistencia antibiótica o que suple un requerimiento autotrófico. Los ejemplos de vectores de expresión útiles para células huésped procariotas incluyen a aquellos derivados de plásmidos disponibles comercialmente tales como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contiene genes para la resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina y provee por lo tanto un medio sencillo para identificar células transformadas. Un promotor apropiado y una secuencia de ADN elk-L se insertan dentro del vector pBR322. Otros vectores comercialmente disponibles incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, Estados Unidos).

Las secuencias promotoras comúnmente utilizadas para los vectores de expresión de la célula huésped procariota recombinante incluyen β-lactamasa (penicilinasa), un sistema promotor de lactosa (Chang y colaboradores, *Nature* 275:615, 1978; y Goeddel y colaboradores, *Nature* 281:544, 1979), un sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel y colaboradores, *Nucl. Acids Res.* 8:4057, 1980; y EP-A-36776) y al promotor tac (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, página 412, 1982). Un sistema de expresión de célula huésped procariota particularmente útil emplea un promotor λ P_L de fago y una secuencia represora termolábil cl857ts. Los vectores plásmidos disponibles a partir de la American Type Culture Collection que incorporan a los derivados del promotor λ P_L incluyen al plásmido pHUB2 (residente en la cepa de *E. coli* JMB9 (ATCC 37092)) y pPLc28 (residente en *E. coli* RRI (ATCC 53082)).

El elk-L puede alternativamente ser expresado en células huésped de levadura, preferiblemente del genero *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*). También se puede emplear otro género de levadura, tal como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán a menudo un origen de secuencia de replicación a partir de un plásmido de levadura de 2 μ, una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de transcripción, y un gen marcador seleccionable. Las secuencias adecuadas del promotor para vectores de levadura incluyen, entre otros, promotores para metalotioneina, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y colaboradores, *J. Biol. Chem.* 255:2073, 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess y colaboradores, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149, 1968; y Holland y colaboradores, *Biochem* 17:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa. Otros vectores adecuados y promotores para uso en expresión de lavadura son descritos adicionalmente en Hitzeman; EPA-73.657. Otra alternativa es el promotor ADH2 reprimible por glucosa descrito por Russell y colaboradores (*J. Biol. Chem.* 258:2674, 1982) y Beier y colaboradores (*Nature* 300:724, 1982). Los vectores lanzadera replicables tanto en levadura como en *E. coli* se pueden construir por medio de la inserción de secuencias de ADN de pBR322 para se-

lección y replicación en *E. coli* (gen Amp^r y origen de replicación) dentro de los vectores de levadura anteriormente descritos.

La secuencia líder del factor α de levadura puede ser empleada para dirigir la secreción del polipéptido elk-L. La secuencia líder del factor α se inserta a menudo entre la secuencia del promotor y la secuencia del gen estructural. Ver, por ejemplo, Kurjan y colaboradores, *Cell* 30:933, 1982; Bitter y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5330, 1984; la patente estadounidense No. 4.546.082; y EP 324.274. Otras secuencias líder apropiadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes de huéspedes de levadura son conocidas por aquellos capacitados en el arte. Una secuencia líder puede ser modificada cerca de su extremo 3' para contener uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia líder al gen estructural.

Los protocolos de transformación de la levadura son conocidos por aquellos capacitados en el arte. Uno de tales protocolos es descrito por Hinnen y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929, 1978. El protocolo de Hinnen y colaboradores selecciona a los transformantes Trp$^+$ en un medio selectivo, en donde el medio selectivo consiste de base nitrogenada de levadura al 0,67%, ácidos casamino al 0,5%, glucosa al 2%, 10 μg/ml de adenina y 20 μg/ml de uracilo.

Las células huésped de levadura transformada por medio de los vectores que contienen la secuencia ADH2 del promotor se pueden cultivar para inducir la expresión en un medio "rico". Un ejemplo de un medio rico es uno que consiste de extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, y glucosa al 1% suplementada con 80 μg/ml de adenina y 80 μg/ml de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 ocurre cuando la glucosa es extraída del medio.

Los sistemas de cultivo de células huésped de mamífero o de insecto podrían ser empleados también para expresar polipéptidos elk-L recombinantes. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son revisados por Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). Las líneas celulares establecidas de origen mamífero también pueden ser empleadas. Los ejemplos de líneas celulares adecuadas de mamífero incluyen a la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL 1651) (Gluzman y colaboradores, *Cell* 23:175, 1981), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL 163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, y líneas celulares -BHK (ATCC CRL 10), y la línea celular CV-1/EBNA-1 derivada de la línea celular de riñón de mono verde africano CVI (ATCC CCL 70) como lo describen McMahan y colaboradores (*EMBO J.* 10: 2821, 1991).

Las secuencias de control transcripcional y de traducción para vectores de expresión en células huésped de mamífero pueden ser cortados de genomas virales. Las secuencias del promotor y las secuencias reforzadoras comúnmente utilizadas se derivan del virus Polioma, del Adenovirus 2, del Virus Simio 40 (SV40), y de citomegalovirus humano. Las secuencias de AND derivadas del genoma viral SV40, por ejemplo, con origen en SV40, en el promotor temprano y tardío, en el reforzador, en el empalme, y en los sitios de poliadenilación pueden ser utilizados para suministrar otros elementos genéticos para expresión de una secuencia estructural del gen en una célula huésped de mamífero. Los promotores virales temprano y tardío son particularmente útiles debido a que ambos pueden ser obtenidos fácilmente a partir de un genoma viral como un fragmento que también puede contener un origen viral de replicación (Fiers y colaboradores, *Nature* 273:113, 1978). También se pueden utilizar fragmentos más pequeños o más grandes de SV40, con tal de que la secuencia aproximadamente de 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hacia el sitio *Bgl*I localizado en el origen viral SV40 del sitio de replicación esté incluida.

Ejemplos de vectores de expresión para el uso en células huésped de mamífero pueden ser construidos como lo divulgan Okayama y Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983). Un sistema útil para una expresión estable de nivel alto de los ADNc de mamífero en células epiteliales mamarias murinas C127 pueden ser construidas esencialmente como lo describen Cosman y colaboradores (*Mol. Immunol.* 23:935, 1986). Un vector útil de expresión alta, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman y colaboradores, *Nature* 312:768, 1984 ha sido depositado como ATCC 39890. Otros vectores útiles adicionales para expresión en mamíferos son descritos en EP-A-0367566, y en la Publicación PCT WO91/18982. Los vectores se pueden derivar a partir de retrovirus. En lugar de la secuencia nativa de la señal, se puede añadir una secuencia heteróloga de la señal, tal como la secuencia de la señal para la interleuquina-7 (IL-7) descrita en la patente estadounidense No. 4.965.195; la secuencia de la señal para el receptor de la interleuquina-2 descrita en Cosman y colaboradores, *Nature* 312:768 (1984); el péptido señal para la interleuquina-4 descrito en EP 367.566; el péptido señal del receptor de la interleuquina-1 de tipo I descrito en la patente estadounidense No. 4.968.607; y el péptido señal del receptor de la interleuquina-1 de tipo II descrito en EP 460.846.

La presente invención provee una proteína elk-L substancialmente homogénea, que puede ser producida por medio de sistemas de expresión recombinante como el descrito anteriormente o purificado a partir de células de ocurrencia natural. El elk-L se purifica hasta homogeneidad sustancial, como lo indica la banda única de proteína por medio de un análisis de electroforésis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE).

Un proceso para producir a la proteína elk-L comprende el cultivo de una célula huésped transformada con un vector de expresión que contiene una secuencia de ADN que codifica al elk-L bajo condiciones tales que se exprese elk-L. Se recupera entonces la proteína elk-L del medio de cultivo o de extractos celulares, dependiendo del sistema de expresión empleado. Como lo reconocerá un operario entrenado, los procedimientos para purificar al elk-L recombinante variarán de acuerdo a factores tales como el tipo de células huésped empleadas y de si elk-L es secreto o no dentro del medio de cultivo.

Por ejemplo, cuando se emplean los sistemas de expresión que segregan a la proteína recombinante, el medio de cultivo puede ser concentrado primero utilizando un filtro de concentración de proteína comercialmente disponible, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, se puede aplicar el concentrado a una matriz de purificación tal como un medio de filtración por gel. Alternativamente, se puede emplear una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene colgados grupos dietilaminoetilo (DEAE). Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en purificación de proteínas. Alternativamente, se puede emplear una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores catiónicos apropiados incluyen a diferentes matrices insolubles que contienen grupos sulfopropilo o carboximetilo. Los grupos sulfopropilo son los preferidos. Finalmente, se pueden emplear una o más etapas de cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa (RP-HPLC) que emplean medio RP-HPLC hidrófobo, (por ejemplo, gel de sílice que tiene colgados grupos metilo u otros grupos alifáticos), para purificar adicionalmente al elk-L. Algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diferentes combinaciones, pueden ser empleadas para suministrar una proteína recombinante sustancialmente homogénea.

También es posible utilizar una columna de afinidad que contiene al dominio de enlazamiento para el ligando de elk para purificar por afinidad a los polipéptidos elk-L expresados. Los polipéptidos elk-L pueden ser removidos de una columna de afinidad en un amortiguador de elución altamente salino y luego dializados dentro de un amortiguador de baja salinidad para utilizarlos. Alternativamente, la columna de afinidad puede contener un anticuerpo que enlace a elk-L. El Ejemplo 4 describe un procedimiento para emplear la proteína elk-L de la presente invención para generar anticuerpos monoclonales dirigidos contra elk-L.

La proteína recombinante producida en un cultivo bacteriano se aísla usualmente por medio de ruptura inicial de las células huésped, centrifugación, extracción de los precipitados celulares si se trata de un polipéptido insoluble, o a partir del fluido sobrenadante si se trata de un polipéptido soluble, seguido de una o más etapas de concentración, insolubilización por salado, intercambio iónico, purificación por afinidad o cromatografía de exclusión por tamaño. Finalmente, se puede emplear RP-HPLC para las etapas finales de purificación. Las células microbianas se pueden romper por medio de cualquier método conveniente, incluida la congelación-descongelación cíclica, sonicación, ruptura mecánica, o el uso de agentes de lisado celular.

Las células huésped transformadas de levadura se emplean preferiblemente para expresar elk-L como un polipéptido secretado. Esto simplifica la purificación. El polipéptido recombinante secretado a partir de una fermentación de células huésped de levadura se puede purificar por medio de métodos análogos a aquellos divulgados por Urdal y colaboradores (*J. Chromatog.* 296:171, 1984). Urdal y colaboradores describen dos etapas secuenciales de HPLC en fase reversa por purificación de IL-2 humano recombinante sobre una columna preparativa de HPLC.

Fragmento de Ácido Nucleico

Se divulga además el uso de una molécula aislada de ácido nucleico que contiene una secuencia de al menos aproximadamente 14 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o el ADN o el complemento de ARN del mismo para el aislamiento o la detección de un ARN o ADN de elk-L, o por bloqueo de expresión de proteínas elk-L. Tales fragmentos contienen aproximadamente al menos 14 nucleótidos de la secuencia presentada en la SEQ ID NO: 1. Los complementos de ADN y ARN de dichos fragmentos son descritos aquí, junto tanto con formas monocatenarias como bicatenarias del ADN de elk-L.

Entre los usos de tales fragmentos de ácido nucleico de elk-L está el uso como sonda. Tales sondas pueden ser empleadas en procedimientos de hibridación entre especies para aislar ADN de elk-L de especies adicionales de mamíferos. Como ejemplo, se puede emplear una sonda correspondiente al dominio extracelular de elk-L. Las sondas también encuentran uso en la detección de la presencia de ácidos nucleicos de elk-L en ensayos *in vitro* y en procedimientos tales como transferencias de Northern o de Southern. Los tipos de células que expresan elk-L pueden ser identificadas. Tales procedimientos son bien conocidos, y el operario entrenado puede escoger una sonda de longitud adecuada, dependiendo de la aplicación pretendida particular.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de elk-L son los oligonucleótidos sentido y antisentido que contienen una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (ya se ARN o ADN) capaz de enlazarse a secuencias de ARNm (sentido) objetivo de elk-L o de ADN (antisentido) de elk-L. Los oligonucleótidos sentido o antisentido, de acuerdo con la presente invención, contienen un fragmento de la región de codificación del ADNc de elk-L. Tal fragmento generalmente contiene aproximadamente al menos 14 nucleótidos, preferiblemente aproximadamente desde 14 hasta aproximadamente 30 nucleótidos. La habilidad para crear un oligonucleótido sentido o uno antisentido, con base en una secuencia de ADNc para una proteína dada es descrita, por ejemplo, en Stein y Cohen, *Cancer Res.* 48:2659, 1988 y van der Krol y colaboradores, *BioTechniques* 6:958, 1988.

El enlazamiento de oligonucleótidos sentido y antisentido para secuencias objetivo de ácido nucleico resulta en la formación de dobletes que bloquean la traducción (ARN) o la transcripción (ADN) por uno de diferentes medios, incluida la degradación reforzada de los dobletes, la terminación prematura de la transcripción o de la traducción, o por otros medios. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser utilizados por lo tanto para bloquear la expresión de las proteínas elk-L. Los oligonucleótidos sentido y antisentido contienen además oligonucleótidos que tienen columnas vertebrales modificadas de fosfodiéster-azúcar (u otros enlaces de azúcar, tales como aquellos descritos en

WO91/06629 y en donde tales enlaces de azúcar son resistentes a las nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces resistentes de azúcar son estables *in vivo* (esto es, capaces de resistir degradación enzimática) pero retienen la especificidad de la secuencia que sea capaz de enlazarse a secuencias objetivo de nucleótidos. Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido y antisentido incluyen a aquellos oligonucleótidos que están covalentemente enlazados a fracciones orgánicas, tales como aquellos descritos en WO 90/10448, y otras fracciones que incrementan l afinidad del oligonucleótido por una secuencia objetivo de ácido nucleico, tal como poli-(L-lisina). Aún más, pueden unirse agentes de intercalación, tales como elipticina, y agentes de alquilación o complejos metálicos a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar las especificidades de enlazamiento del oligonucleótido sentido o antisentido para la secuencia objetivo de nucleótidos.

Los oligonucleótidos sentido o antisentido se pueden introducir dentro de una célula que contenga la secuencia objetivo de ácido nucleico por medio de cualquier método de transferencia génica, incluido, por ejemplo, la transfección de ADN mediada por $CaPO_4$, electroporación, o por medio del uso de vectores de transferencia génica tal como el virus de Epstein-Barr. Los oligonucleótidos sentido y antisentido se introducen preferiblemente en una célula que contiene a la secuencia objetivo de ácido nucleico por medio de la inserción del oligonucleótido sentido o antisentido en un vector retroviral adecuado, luego poniendo en contacto a la célula con el vector retroviral que contiene a la secuencia insertada, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, pero no se limitan al retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de doble copia designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (ver la solicitud PCT US 90/02656 WO 90/13641).

Los oligonucleótidos sentido o antisentido también pueden ser introducidos en una célula que contiene a la secuencia objetivo de nucleótidos por medio de la formación de un conjugado con una molécula de enlazamiento a un ligando, como se describe en WO 91/04753. Las moléculas adecuadas de enlazamiento a un ligando incluyen, pero no se limitan a, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se enlazan a receptores de la superficie de la célula. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de enlazamiento al ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de enlazamiento al ligando para enlazarse a su correspondiente molécula o receptor, o bloquea la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada dentro de la célula.

Alternativamente, se puede introducir un oligonucleótido sentido o antisentido dentro de una célula que contiene la secuencia objetivo de ácido nucleico por medio de la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, como se describe en WO 90/10448. Se disocia preferiblemente el complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido dentro de la célula por medio de una lipasa endógena.

Se suministran los ejemplos siguientes para ilustrar modalidades particulares y no para limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de una Proteína de Fusión elk/Fc Soluble

Este ejemplo describe la construcción de un vector de expresión que codifica a una proteína de fusión elk/Fc soluble, para uso en la detección de clones de ADNc que codifican a un ligando elk (elk-L). Se presenta un ADN y una secuencia codificada de aminoácidos para el ADNc de elk de rata en Lhotak y colaboradores (*Mol. Cell. Biol.* 11:2496, 1991), incorporado aquí como referencia. La proteína elk de rata tiene un dominio extracelular de 538 aminoácidos, un dominio transmembrana de 25 aminoácidos, y un dominio citoplasmático de 419 aminoácidos.

Se fusionó un fragmento de ADNc de elk de rata al N-terminal del ADNc que codifica a la porción Fc de un anticuerpo IgG1 humano. El ADNc de elk de rata se obtuvo con T. Pawson (Samuel Lunenfeld Research Institute, Mt. Sinai Hospital, Toronto). Se introdujo un sitio de escisión para la endonucleasa de restricción Asp718 secuencia arriba de la región de codificación de elk. Se aisló un fragmento Asp718-BglII de ADNc de elk de rata (que contiene al dominio extracelular completo, a la región transmembrana, y una pequeña porción del dominio citoplasmático).

Se clonó un ADN que codifica a un polipéptido de cadena única que contiene la región Fc de un anticuerpo IgG1 humano dentro del sitio Spel del vector pBLUESCRIPT SK®, que se encuentra comercialmente disponible con Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California. Este vector plásmido se puede replicar en *E. coli* y contiene un segmento polienlazador que incluye 21 sitios únicos de restricción. Se introdujo un sitio único *Bgl*II cerca del extremo 5' de la secuencia de codificación Fc insertada, de tal manera que el sitio *Bgl*II abarca a los codones para los aminoácidos tres y cuatro del polipéptido Fc.

El polipéptido Fc codificado se extiende desde la región de bisagra N-terminal hasta el C-terminal nativo, esto es, es una región Fc del anticuerpo de esencialmente de longitud completa. También se pueden emplear los fragmentos de las regiones Fc, por ejemplo, aquellos que están truncados en el extremo C-terminal. Los fragmentos contienen preferiblemente residuos múltiples de cisteína (al menos los residuos de cisteína en la reacción de bisagra) para permitir que se formen enlaces disulfuro entre cadenas entre las porciones del polipéptido Fc de dos proteínas de fusión elk/Fc separadas, que forman dímeros como se discutió anteriormente.

Se clonó el fragmento de ADNc de elk Asp718-BglII descrito anteriormente dentro del vector pBLUESCRIPT SK® que contiene al ADNc de Fc, de tal forma que el ADNc de elk se posicione secuencia arriba del ADNc de Fc. El ADN monocatenario derivado de la fusión resultante del gen se mutagenizó por medio del método descrito en Kunkel (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488, 1985) y en Kunkel y colaboradores (*Methods in Enzymol.* 154:367, 1987) con el propósito de fusionar perfectamente al dominio extracelular completo de elk a la secuencia de Fc. Se secuenció el ADN mutagenizado para confirmar que los nucleótidos propios habían sido removidos (esto es, se suprimieron el ADN del dominio citoplasmático parcial y de la región transmembrana) y que las secuencias de Fc y de elk se encontraban en el mismo marco de lectura. Se cortó entonces el ADNc de fusión y se lo insertó dentro de un vector de expresión de mamífero designado como pCAV/DHFR. El vector pCAV/DHFR es similar a pCAV/NOT, descrito en la solicitud PCT WO 90/05183, pero adicionalmente contiene un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) como marcador seleccionable. El gen de DHFR confiere una ventaja selectiva sobre otras células de mamífero de DHFR que han recibido al vector, cuando crecen en presencia de metotrexato (MTX).

Las proteínas de fusión elk/Fc se sintetizan preferiblemente en cultivos de células recombinantes de mamífero. Se transfectó al vector de expresión que contiene la fusión elk/Fc dentro de células CV-1 (ATCC CCL 70) y células COS-7 (ATCC CRL 1651), ambas derivadas de riñón de mono. El nivel de expresión de la proteína de fusión elk/Fc fue relativamente bajo tanto en las células CV-1 como en las células COS-7. Por lo tanto, se intentó la expresión en células 293 (células embrionarias primarias transformadas de riñón humano, ATCC CRL 1573).

Se insertó la fusión del gen de elk-Fc en un vector de expresión de mamífero designado como HAV-EO (Dower y colaboradores, *J. Immunol.* 142:4314, 1989). Se cultivaron células 293 transfectadas con el vector HAV-EO/elk/Fc en frascos rotativos para permitir la expresión transitoria de la proteína de fusión, que es secretada dentro del medio de cultivo a través del péptido señal elk. Se purificó la proteína de fusión sobre columnas de sefarosa-proteína A, se eluyó, y se la utilizó para seleccionar células por la capacidad para enlazar a la proteína elk/Fc, como se describe en los ejemplos 2 y 3.

Ejemplo 2

Selección de Células para Enlazamiento de elk/Fc

Se seleccionaron diferentes tipos de células por la habilidad para enlazar elk/Fc, para identificar tipos de células candidatas útiles como fuentes de ácido nucleico en un intento por clonar un ligando elk. La proteína elk/Fc recombinante de rata producida y purificada en el Ejemplo 1 fue radiomarcada utilizando el reactivo para marcación con iodo radiactivo Enzymobead comercialmente disponible (BioRad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La proteína ^{125}I-elk/Fc no mostró enlazamiento específico con ninguna de las diferentes líneas celulares analizadas. Preocupa que la marcación directa de la proteína elk/Fc con Na^{125}I pudiera haber resultado en una perdida de actividad biológica que condujo al desarrollo de un ensayo de enlazamiento en dos etapas.

El ensayo en dos etapas involucró la incubación de células con elk/Fc no marcado en forma radioactiva seguido por un anticuerpo Fc antihumano de ^{125}I-ratón. Este anticuerpo se enlazará a la porción Fc de cualquier proteína de fusión elk/Fc que se haya enlazado a las células.

El anticuerpo Fc antihumano de ratón se obtuvo de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. Este anticuerpo mostró mínimo enlazamiento a las proteínas Fc enlazadas al receptor Fcγ. Se marcó el anticuerpo utilizando el método de la Cloramina T. En resumen, se preparó una columna P6 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En un tubo de microcentrífuga, se disolvieron 10 μg de anticuerpo en μl de PBS. Se añadieron 2000 μCi de Na^{125}I libre de portador y se mezcló bien la solución. Se añadieron entonces 15 μl de una solución recientemente preparada de cloramina T (32 μg/ml en amortiguador de fosfato de sodio 0,05 M (pH 7,2)) y se incubó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se aplicó inmediatamente la mezcla a la columna P6. Se eluyó entonces de la columna el anticuerpo marcado en forma radioactiva recolectando fracciones de 100-150 μl de eluato. Se añadió medio de enlazamiento (RPMI 1640 que contenía 25 mg/ml de albúmina de suero bovino, 2 mg/ml de azida de sodio, Hepes 20 mM pH 7,2) a las fracciones pico para llevar el volumen total de cada fracción hasta 2 ml. La radioiodación produjo actividades específicas en el rango de 5-10 x 10^{15} cpm/mmol de proteína.

El proceso de selección se realizó de la siguiente manera. Se cultivaron aproximadamente 2 x 10^6 células en placas de 96 pozos. Se añadieron 150 μl de medio de enlazamiento a cada pozo y se incubaron entonces las células en presencia o en ausencia de elk/Fc durante 1 hora a 37ºC con agitación suave. Se sedimentaron las células de la mezcla por medio de centrifugación de las placas de 96 pozos, se las lavó con PBS, se centrifugó nuevamente, y se las resuspendió en medio de enlazamiento. Se incubaron entonces las células con el anticuerpo Fc antihumano de ratón con ^{125}I, preparado como se describió anteriormente, durante 1 hora a 37ºC. Las células fueron incubadas también con anticuerpo Fc antihumano de ratón con ^{125}I en presencia de un exceso de anticuerpo Fc antihumano no marcado como control negativo. Después de una hora de incubación con el anticuerpo con ^{125}I, se separaron las células y el anticuerpo con ^{125}I no enlazado por medio el método de separación con aceite de ftalato, esencialmente como lo describen Dower y colaboradores, *J. Immunol.* 132:751, 1984. Se cuantificó el anticuerpo con ^{125}I enlazado a las células y el libre sobre un contador Packard Autogama. No se encontraron tipos de células para enlazar elk/Fc en este ensayo.

Las células, incluidos tipos de células adicionales no seleccionadas previamente, fueron analizadas por el enlazamiento de elk/Fc a través de un tercer procedimiento. Se incubaron la células con elk/Fc, seguido por un anticuerpo Fc antihumano biotinilado, seguido por estreptavidina-ficoeritrina (Becton Dickinson). El anticuerpo biotinilado fue adquirido a Jackson Immunoresearch Laboratories. La estreptavidina se enlaza a la molécula de biotina unida al anticuerpo Fc antihumano, que a su vez se enlaza la porción de Fc de la proteína de fusión elk/Fc. La ficoeritrina es una ficobiliproteína fluorescente que sirve como un marcador detectable. Se midió el nivel de señal fluorescente para cada tipo de célula utilizando un citómetro de flujo FACScan® (Becton Dickinson).

Las células seleccionadas por la habilidad para enlazar elk/Fc al menos por uno de los tres procedimientos descritos anteriormente incluyeron aproximadamente 30 tipos diferentes de células que caen dentro de las siguientes categorías generales: células primarias de cerebro fetal murino, líneas celulares de hígado fetal murino, líneas celulares de cerebro fetal murino, y líneas celulares de carcinoma (fibroblastoide) de pulmón humano. No se identificó ningún tipo de célula que se pudiera considerar positivo para enlazamiento a elk/Fc.

Ejemplo 3

Aislamiento de ADNc del Ligando Elk a partir de una Genoteca de ADNc de Placenta Humana

Ninguno de los tipos de células analizados en el Ejemplo 2 exhibió enlazamiento detectable de elk/Fc. Se escogió una genoteca de ADNc de placenta humana como una posible fuente de ADNc del ligando elk, ya que el tejido placentario es rico en factores de crecimiento y diferenciación. Como se discutió anteriormente, es probable que el ligando elk juegue un papel en el crecimiento, la supervivencia o la diferenciación de las células que expresan elk (el receptor correspondiente): Sin embargo, el hecho de que la placenta sea relativamente rica en receptores Fc planteó un problema potencial para el intento de clonación, ya que se utilizó una fusión elk/Fc para seleccionar los clones.

Se preparó una genoteca de ADNc de placenta humana en el plásmido pDC302 como se describe en Larsen y colaboradores (*J. Exp. Med.*, 172:1559, 1990). pDC302 es un vector de expresión mamífero que también replica en *E. coli* (Mosley y colaboradores, *Cell* 59:335, 1989). En resumen, el ADNc placentario fue clonado dentro del sitio *Bgl*II de pDC302 por medio de un método adaptador similar a aquel descrito por Haymerle y colaboradores (*Nucl. Acids Res.* 14:8615, 1986).

Las células de la cepa DH5α de *E. coli* transfectadas con la genoteca de ADNc placentario en pDC302 fueron sembradas en placa para suministrar aproximadamente 500 colonias por placa. Se rasparon las colonias de cada placa, se las reunió, y se preparó un ADN de plásmido de cada reserva. El ADN reunido que representa aproximadamente 2000 colonias fue utilizado entonces para transfectar una capa subconfluente de células CV-1/EBNA-1 utilizando DEAE-dextrano seguido por tratamiento con cloroquina, similar a aquel descrito por Luthman y colaboradores, *Nucl. Acids Res*. 11: 1295, 1983) y McCutchan y colaboradores, *J. Natl. Cancer Inst.* 41:351, 1986). La línea de células CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL10478) expresa constitutivamente al antígeno-1 nuclear EBV conducido desde el reforzador/promotor temprano inmediato CMV. CV1-EBNA-1 se derivó de la línea celular CV-1 de Riñón de Mono Verde Africano (ATCC CCL 70), como lo describen McMahan y colaboradores (*EMBO J*. 10:2821, 1991).

Con el propósito de transfectar las células CV-1/EBNA-1 con la genoteca de ADNc, se mantuvieron las células en medio completo (medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía suero fetal de ternera al 10% (v/v) (FCS), 50 U/ml de penicilina, 50 U/ml de estreptomicina, L-glutamina 2 mM) y se las sembró en placa con una densidad de 2 x 10^5 células/pozo sobre portaobjetos excavados de un solo pozo (Lab-Tek). Los portaobjetos fueron tratados previamente con 1 ml de fibronectina humana (10 ug/ml en PBS) durante 30 minutos seguido por 1 lavado con PBS. Se removió el medio de la capa adherente de células y se lo reemplazó con 1,5 ml de medio completo que contenía sulfato de cloroquina 66,6 μM. Se añadieron entonces 0,2 ml de solución de ADN (2 μg de ADN, 0,5 mg/ml de DEAE-dextrano en medio completo que contenía cloroquina) a las células y se incubó durante 5 horas. Después de la incubación, se removió el medio y se chocó a las células por medio de la adición de medio completo que contenía DMSO al 10% durante 2,5 a 20 minutos seguido por el reemplazo de la solución con medio completo fresco. Se cultivaron las células durante 2 a 3 días para permitir la expresión transitoria de las secuencias insertadas.

Se evaluaron las monocapas transfectadas de células CV-1/EBNA-1 por la expresión de elk-L por medio de autoradiografía en portaobjetos, esencialmente como lo describen Gearing y colaboradores (*EMBO J.* 8:3667, 1989). Las células transfectadas CV-1/EBNA-1 (adheridas a los portaobjetos excavados) se lavaron una vez con medio de enlazamiento con leche en polvo libre d grasa (BM-NFDM) (medio RPMI 1640 que contenía 25 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA), 2 mg/ml de azida de sodio, HEPES 20 mM, pH 7,2, y 50 mg/ml de leche en polvo libre de grasa). Se incubaron entonces las células con elk/Fc en BM-NFDM (1 μg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la incubación, se lavaron tres veces las monocapas de células en los portaobjetos excavados con BM-NFDM para remover a la proteína de fusión elk/Fc no enlazada y se incubó luego con 40 ng/ml de anticuerpo Fc antihumano de ratón con ^{125}I preparado en el Ejemplo 2 (una dilución 1:50) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron las células tres veces con BM-NFDM, seguido por 2 lavados con suero fisiológico amortiguado con fosfato (PBS) para remover al anticuerpo Fc antihumano no enlazado de ratón con ^{125}I. Se fijaron las células por medio de incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en glutaraldehído al 2,5% en PBS, pH 7,3, lavadas dos veces en PBS y

secadas al aire. Se expusieron los portaobjetos excavados que contenían a las células sobre un Phophorimager (Molecular Dynamics) durante la noche, luego se los sumergió en una emulsión fotográfica GTNB-2 de Kodak (dilución 6x en agua) y se los expuso en la oscuridad durante 3-5 días a 4°C en una caja a prueba de luz. Se desarrollaron entonces los portaobjetos aproximadamente durante 4 minutos en revelador Kodak D19 (40 g/500 ml de agua), se enjuagó en agua y se fijó en un fijador Agfa G433C. Se examinaron individualmente los portaobjetos con un microscopio a una magnificación de 25-40x y se identificaron las células positivas que expresan elk-L por medio de la presencia de granos de plata autorradiográficos contra un fondo de luz.

Utilizando la aproximación autorradiográfica en portaobjetos, se seleccionaron aproximadamente 300.000 ADNc en reservorios aproximadamente de 2.000 ADNc hasta que el ensayo de una reserva de transfección mostró claramente múltiples células claramente positivas para el enlazamiento de elk/Fc. Se dividió entonces este reservorio en reservas menores de 500 y nuevamente se hizo una selección por medio de autoradiografía en portaobjetos y se identificó un reservorio positivo. Se seleccionaron colonias individuales de este reservorio de 500 hasta que se identificó un clon único (clon #E7) que dirigió la síntesis de una proteína de superficie con actividad de enlazamiento a elk/Fc detectable. Se aisló este clon, y se secuenció su inserto de ADNc.

Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos codificados de la región de codificación del ADNc del ligando elk humano del clon E7 se presentan en las SEQ ID NOS: 1 y 2. El inserto de ADNc es de 2.111 pb de longitud. Existen tres marcos de lectura abierta de tamaño razonable dentro de esta secuencia que podrían codificar proteínas de 82, 85, y 346 aminoácidos. De estos tres, los dos marcos de lectura abierta más pequeños carecen tanto de buenos codones de iniciación de traducción así como de una secuencia de señal. Por lo tanto, el ADN y las secuencias codificadas de aminoácidos para el marco de lectura abierta de 346 aminoácidos se presentan en las SEQ ID NOS: 1 y 2. La proteína de la SEQ ID NO: 2 es una proteína transmembrana de tipo I, con un péptido señal N-terminal (aminoácidos -24 a -1, un dominio extracelular (aminoácidos 1-213) un dominio transmembrana (aminoácidos 214-241) y un dominio citoplasmático (aminoácidos 242-322). El peso molecular predicho de la proteína nativa después de la escisión de la secuencia de señal es de 35.180 daltons. La proteína madura tiene pI estimado de 9.006. Existen 307 pb de secuencia no codificadora 5' y 763 pb de secuencia no codificadora 3' flanqueando a la región de codificación.

Se cortó el ADNc de elk-L humano del clon E7 por medio de digestión con Bsu361 (el cual escinde secuencia abajo del codón de detención), seguido por tratamiento con un fragmento Klenow para dar el extremo romo digerido con Bsu361, seguido por digestión con *Sma*I (el cual escinde secuencia arriba del codón de iniciación y genera extremos romos). El ADNc cortado, que incluye la región completa de codificación, fue clonado en el sitio *Sma*I (en el sitio de clonación múltiple) de pBLUESCRIPT® SK(-) (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). El vector resultante (designado tele 7 en pBLUESCRIPT SK(-)) en células DH5α de *E. coli* fue depositado en la American Type Culture Collection, Rockville, MD, Estados Unidos (ATCC) el 9 de octubre de 1992 y con el número de acceso ATCC 69085. El depósito se hizo bajo los términos del Tratado de Budapest.

Ejemplo 4

Anticuerpos Monoclonales para elk-L

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales para elk-L. Elk-L se expresa en células huésped de mamífero tales como células COS-7 o CV-1/EBNA-1 y purificados utilizando cromatografía de afinidad para elk/Fc. Se puede utilizar elk-L purificado (o un fragmento del mismo tal como el dominio extracelular) para generar anticuerpos monoclonales contra elk-L utilizando técnicas convencionales, por ejemplo, aquellas técnicas descritas en la patente estadounidense No. 4.411.993. En resumen, los ratones se inmunizan con elk-L como un inmunógeno emulsionado en adyuvante completo de Freund, e inyectado en cantidades en el rango entre 10-100 μg en forma subcutánea o intraperitoneal. Diez a doce días después, los animales inmunizados recibieron un refuerzo con elk-L emulsionado adicional en adyuvante incompleto de Freund. Los ratones reciben un refuerzo periódicamente después de eso en un esquema de inmunización semanal o de dos veces por semana. Se toman periódicamente muestras de suero por medio de sangrado retro-orbital o por medio de un corte en la punta de la cola para análisis por medio del ensayo de borrón de punto o de ELISA (Ensayo con Sustancias Inmunoabsorbentes Unidas a Enzimas), para anticuerpos elk-L.

Después de la detección de un título de anticuerpo apropiado, se les suministra a los animales positivos una última inyección intravenosa de elk-L en suero fisiológico. Tres a cuatro días después, se sacrifican los animales, se recogen células de bazo, y estas células de bazo se fusionan a una línea de células de mieloma murino, por ejemplo, NS1 o preferiblemente P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Las fusiones generan células de hibridoma, que se siembran en placa en múltiples placas de microtitulación en un medio selectivo HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma, e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridoma se seleccionan por medio de ELISA para la reactividad contra elk-L purificado por medio de adaptaciones de las técnicas divulgadas por Engvall y colaboradores, *Immunochem*. 8:871, 1971 y en la patente estadounidense No. 4.703.004. Una técnica preferida de selección es la técnica de captura del anticuerpo descrita por Beckmann y colaboradores, (*J. Immunol.* 144:4212, 1990). Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones BALB/c singénicos para producir ascites que contienen altas concentraciones de anticuerpos monoclonales antielk-L. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vitro* en frascos o botellas rotativas por medio de diferentes técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en asci-

tes de ratón se pueden purificar por medio de precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, también se puede utilizar cromatográfica de afinidad basada en el enlazamiento del anticuerpo a la proteína A o a la proteína G, así como la cromatografía de afinidad basada en el enlazamiento a elk-L.

Ejemplo 5

Análisis de Transferencias de Northern

Para investigar la expresión de elk-L en diferentes tejidos, se probó un tejido humano por transferencias de Northern que contenía 2 ug de poli A + ARNm de una variedad de tejidos (disponible con Clontech, Palo Alto, CA) con una ribosonda elk-L. Se removieron las secuencias no codificadoras 5' y 3' del ADNc del ligando elk por medio de digestión con SmaI y BsuI e insertando la región de codificación dentro del vector pBluescript SK(-) (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). Se preparó una ribosonda cortando el ADNc de elk-L con SfiI y utilizando al promotor T3 ARN polimerasa para transcribir a la mayoría de los 450 nucleótidos 3' de la secuencia de codificación de elk-L. Se hibridó la transferencia con la ribosonda a 63°C, luego se la lavó, primero con 1XSSC/0,1% SDS durante 1 h a 68°C, luego con 0,1X SSC/0,1% SDS durante 30 min a 68°C. Se expuso la transferencia a una película de rayos X a -70° durante 11 días en sándwich entre dos pantallas de intensificación. Se observó un mensaje mayor de 3,5 kb en corazón, placenta, pulmón, hígado, músculo esqueletal, riñón, y páncreas.

El ARNm de elk-L no estaba presente en niveles detectables en cerebro adulto completo, aunque el cerebro y los testículos son los únicos tejidos reportados que expresan al receptor de elk (Lhotak y colaboradores, *supra*). Es posible que la expresión en cerebro sea en niveles muy bajos, o esté limitada a una región(es) distinta(s), y por lo tanto no fue detectada por la técnica anterior. Para investigar más este tejido, se probaron disecciones de cerebros de ratas de 8 días de edad y de adultos jóvenes con el ADN de elk-L. Elk-L parece expresarse en el cerebro de rata en desarrollo, con el nivel más alto de expresión en el bulbo olfativo. La expresión de elk-L en el bulbo olfativo parece que continúa en la adultez. En forma interesante, el bulbo olfativo se regenera activamente durante toda la vida del animal, en contraste con el resto del cerebro.

Una segunda transferencia de Northern reveló que la expresión del ARNm de elk-L favorece la expresión por medio de TNF en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECS). Se observó que el ARNm de B61 en HUVECS era inducible por medio del tratamiento de las células con IL-1 o TNF (Holzman y colaboradores, *supra*). En vista del grado de homología entre elk-L y B61, se probó una transferencia de Northern del ARNm de HUVEC (ya sea de células en reposo o de células inducidas con TNF) con la ribosonda de elk-L descrita anteriormente. La especie mayor de 3,5 kb observada en otros tejidos fue inducida específicamente después del tratamiento con TNF.

Ejemplo 6

Análisis de Transferencias de Southern

Se investigó la presencia de AND de elk-L en diferentes especies de la siguiente manera. Una transferencia que consiste de los ADN digeridos con EcoRI de una variedad de especies (Clontech, Palo Alto, CA) se hibridó previamente a 63°C en amortiguador para hibridación previa. Se probó entonces la transferencia con una sonda del clon E7 iniciada en forma aleatoria (correspondiente a la región entera de codificación de elk-L) y se la lavó con alta rigurosidad (1XSSC/0,1% SDS durante 60 min a 63°C, luego con 0,1XSSC/0,1% SDS a 63°C durante 30 min). La imagen de la transferencia fue desarrollada sobre un Phosphorimager (Molecular Dynamics). Se encontró que el gen estaba altamente conservado en una gran variedad de especies, incluyendo al mono, rata, ratón, perro, vaca, conejo, pollo, y aún en levadura.

Ejemplo 7

Estudio de Enlazamiento

Para examinar el enlazamiento de elk-L al receptor de elk, se proyectó un análisis indirecto modificado de Scatchard. Este ensayo indirecto fue necesario porque la marcación radioactiva directa de elk/Fc inactivó la especificidad de enlazamiento de esta proteína. El procedimiento del ensayo era de la siguiente manera.

Se transfectaron células CV1-EBNA-1 (descritas en el Ejemplo 3) en placas de 12 pozos (2,5 x 10^5 células/pozo) con un vector de expresión que contenía al ADNc de elk-L del clon E7. Las células transfectadas fueron cultivadas durante dos días para permitir la expresión de la proteína elk-L, luego lavadas con BM-NFDM (el medio de enlazamiento descrito en el Ejemplo 2, que también contenía 50 mg/ml de leche en polvo libre de grasa), y se las cultivó con diferentes concentraciones de la proteína de fusión elk/Fc preparada en el Ejemplo 1, durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, se lavaron las células y se incubó con una concentración constante de saturación del anticuerpo IgG antihumano de ratón marcado con ^{125}I preparado en el Ejemplo 2 (40 ng/ml) en medio de enlazamiento con agitación suave durante 1 hora a 37°C. Se recogieron entonces las células por medio de tripsinización. Se separaron las células y el anticuerpo con ^{125}I no enlazado por medio de un método de separación con aceite de ftalato, esencialmente como lo describen Dower y colaboradores, *J. Immunol.* 132:751, 1984.

Se cuantificaron los anticuerpos con ^{125}I libres y enlazados a la célula sobre un Contador Packard Autogamma. Se graficó nuevamente la curva de enlazamiento en el sistema de coordenadas de Scatchard (Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660, 1949). Se generaron los cálculos de afinidad sobre RS/1 (BBN Software, Boston, MA) corridos sobre un ordenador Microvax. Se identificó un componente único de enlazamiento de alta afinidad. Los sitios de enlazamiento de elk-L expresados sobre los transfectantes CV-1 EBNA-1 tenían una constante de afinidad (K_A) de 1,08 x 10^9 M^{-1} para elk/Fc. Esta constante de afinidad corresponde bien con aquellas observadas para el enlazamiento de elk/Fc al ligando nativo expresado sobre diferentes líneas celulares inactivas de rata.

REIVINDICACIONES

1. Un ADN aislado que codifica a una proteína elk-L capaz de enlazar elk, en donde dicho ADN comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de los nucleótidos 1-1041, 73-1041, 1-711, y 73-711 de la SEQ ID NO: 1.

2. Un ADN aislado de acuerdo a la reivindicación 1, en donde dicho ADN comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de los nucleótidos 1-1041, 73-1041, 1-711, y 73-711 de la SEQ ID NO: 1.

3. Un ADN aislado que codifica a una proteína elk-L capaz de enlazar elk, en donde dicho elk-L comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de los aminoácidos 1-322 y 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

4. Un ADN aislado de acuerdo a la reivindicación 3, en donde dicho elk-L comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de los aminoácidos 1-322, y 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

5. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ADN de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Un proceso para preparar una proteína elk-L, que comprende cultivar una célula huésped transformada con un vector de acuerdo a la reivindicación 5 bajo condiciones que promueven la expresión de elk-L, y recuperar al polipéptido elk-L del cultivo.

7. Una proteína elk-L madura purificada y biológicamente activa **caracterizada** porque la secuencia de aminoácidos N-terminal es Ala-Thr-Pro-Leu-Ala-Lys-Asn-Leu-Glu-Pro-Val-Ser.

8. Un elk-L purificado de acuerdo con la reivindicación 7, en donde dicho elk-L comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de los aminoácidos 1-322 y 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

9. Una proteína elk-L purificada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a una secuencia seleccionada del grupo que consiste de los aminoácidos 1-322 y 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

10. Un anticuerpo que es específicamente inmunoreactivo con una proteína elk-L de acuerdo a la reivindicación 8.

11. Un anticuerpo de acuerdo a la reivindicación 10, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

12. Un oligómero que comprende proteínas elk-L solubles, en donde dichas proteínas elk-L solubles comprenden cada una una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de residuos 1-213 de la SEQ ID NO: 2, en donde dicho oligómero es capaz de enlazar elk.

13. Un oligómero de acuerdo a la reivindicación 12, en donde dicho oligómero comprende dos o tres proteínas elk-L solubles.

14. Un oligómero de acuerdo a la reivindicación 12 ó la 13, en donde la secuencia de aminoácidos de dicha proteína elk-L es de los aminoácidos 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

15. Una proteína de fusión que comprende una proteína elk-L soluble y una proteína Fc, en donde la proteína elk-L soluble comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% idéntica a la secuencia de residuos 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

16. Una proteína de fusión de acuerdo a la reivindicación 15, en donde la secuencia de aminoácidos de dicha proteína elk-L es de los aminoácidos 1-213 de la SEQ ID NO: 2.

17. Un dímero que comprende dos proteínas de fusión de acuerdo a la reivindicación 15 ó 16.

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE: Lyman, Stewart D. Beckmann, M. Patricia Baum, Peter R

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Nueva Citoquina Denominada Ligando elk

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2

(iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:

(A) DIRECCIÓN: Immunex Corporation

(B) CALLE: 51 University Street

(C) CIUDAD: Seattle

(D) ESTADO: Washington

(E) PAÍS: Estados Unidos

(F) ZIP: 98101

(v) FORMA QUE PUEDE LEERSE EN EL COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25

(vi) DATOS DE LA SOLICTUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE LA SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 12 de noviembre de 1993

(C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Seese, Kathryn A.

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.172

(C) REFERENCIA/NÚMERO DEL EXPEDIENTE: 2807-WO

(ix) INFORMACIÓN DE LAS TELECOMUNICACIONES:

(A) TELÉFONO: (206) 587-0430

(B) TELEFAX: (206) 233-0644

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1041 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) ENTRELAZAMIENTO: sencillo

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc hasta ARNm

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..1041

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: mat_péptido

(B) UBICACIÓN: 73..1038

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

```
ATG GCT CGG CCT GGG CAG CGT TGG CTC GGC AAG TGG CTT GTG GCG ATG     48
Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala Met
-24             -20                 -15                 -10

GTC GTG TGG GCG CTG TGC CGG CTC GCC ACA CCG CTG GCC AAG AAC CTG     96
Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys Asn Leu
            -5                  1               5

GAG CCC GTA TCC TGG AGC TCC CTC AAC CCC AAG TTC CTG AGT GGG AAG    144
Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys
     10                  15                  20

GGC TTG GTG ATC TAT CCG AAA ATT GGA GAC AAG CTG GAC ATC ATC TGC    192
Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys
 25                  30                  35                  40

CCC CGA GCA GAA GCA GGG CGG CCC TAT GAG TAC TAC AAG CTG TAC CTG    240
Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu
                45                  50                  55

GTG CGG CCT GAG CAG GCA GCT GCC TGT AGC ACA GTT CTC GAC CCC AAC    288
Val Arg Pro Glu Gln Ala Ala Ala Cys Ser Thr Val Leu Asp Pro Asn
            60                  65                  70

GTG TTG GTC ACC TGC AAT AGG CCA GAG CAG GAA ATA CGC TTT ACC ATC    336
Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile
        75                  80                  85

AAG TTC CAG GAG TTC AGC CCC AAC TAC ATG GGC CTG GAG TTC AAG AAG    384
Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys
     90                  95                  100

CAC CAT GAT TAC TAC ATT ACC TCA ACA TCC AAT GGA AGC CTG GAG GGG    432
His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly
105                 110                 115                 120

CTG GAA AAC CGG GAG GGC GGT GTG TGC CGC ACA CGC ACC ATG AAG ATC    480
Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile
                125                 130                 135

ATC ATG AAG GTT GGG CAA GAT CCC AAT GCT GTG ACG CCT GAG CAG CTG    528
Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu
            140                 145                 150

ACT ACC AGC AGG CCC AGC AAG GAG GCA GAC AAC ACT GTC AAG ATG GCC    576
Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala
        155                 160                 165

ACA CAG GCC CCT GGT AGT CGG GGC TCC CTG GGT GAC TCT GAT GGC AAG    624
Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys
    170                 175                 180
```

```
CAT GAG ACT GTG AAC CAG GAA GAG AAG AGT GGC CCA GGT GCA AGT GGG   672
His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly
185                 190                 195                 200

GGC AGC AGC GGG GAC CCT GAT GGC TTC TTC AAC TCC AAG GTG GCA TTG   720
Gly Ser Ser Gly Asp Pro Asp Gly Phe Phe Asn Ser Lys Val Ala Leu
                205                 210                 215

TTC GCG GCT GTC GGT GCC GGT TGC GTC ATC TTC CTG CTC ATC ATC ATC   768
Phe Ala Ala Val Gly Ala Gly Cys Val Ile Phe Leu Leu Ile Ile Ile
            220                 225                 230

TTC CTG ACG GTC CTA CTA CTG AAG CTA CGC AAG CGG CAC CGC AAG CAC   816
Phe Leu Thr Val Leu Leu Leu Lys Leu Arg Lys Arg His Arg Lys His
        235                 240                 245

ACA CAG CAG CGG GCG GCT GCC CTC TCG CTC AGT ACC CTG GCC AGT CCC   864
Thr Gln Gln Arg Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ala Ser Pro
    250                 255                 260

AAG GGG GGC AGT GGC ACA GCG GGC ACC GAG CCC AGC GAC ATC ATC ATT   912
Lys Gly Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Glu Pro Ser Asp Ile Ile Ile
265                 270                 275                 280

CCC TTA CGG ACT ACA GAG AAC AAC TAC TGC CCC CAC TAT GAG AAG GTG   960
Pro Leu Arg Thr Thr Glu Asn Asn Tyr Cys Pro His Tyr Glu Lys Val
                285                 290                 295

AGT GGG GAC TAC GGG CAC CCT GTC TAC ATC GTC CAA GAG ATG CCG CCC  1008
Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro
            300                 305                 310

CAG AGC CCG GCG AAC ATC TAC TAC AAG GTC TGA                      1041
Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
        315                 320
```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 346 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

```
Met Ala Arg Pro Gly Gln Arg Trp Leu Gly Lys Trp Leu Val Ala Met
-24                 -20                 -15                 -10

Val Val Trp Ala Leu Cys Arg Leu Ala Thr Pro Leu Ala Lys Asn Leu
                -5                  1                   5

Glu Pro Val Ser Trp Ser Ser Leu Asn Pro Lys Phe Leu Ser Gly Lys
     10                  15                  20

Gly Leu Val Ile Tyr Pro Lys Ile Gly Asp Lys Leu Asp Ile Ile Cys
 25                  30                  35                  40
```

```
Pro Arg Ala Glu Ala Gly Arg Pro Tyr Glu Tyr Tyr Lys Leu Tyr Leu
                  45                  50                  55

Val Arg Pro Glu Gln Ala Ala Ala Cys Ser Thr Val Leu Asp Pro Asn
              60                  65                  70

Val Leu Val Thr Cys Asn Arg Pro Glu Gln Glu Ile Arg Phe Thr Ile
          75                  80                  85

Lys Phe Gln Glu Phe Ser Pro Asn Tyr Met Gly Leu Glu Phe Lys Lys
      90                  95                 100

His His Asp Tyr Tyr Ile Thr Ser Thr Ser Asn Gly Ser Leu Glu Gly
 105                 110                 115                 120

Leu Glu Asn Arg Glu Gly Gly Val Cys Arg Thr Arg Thr Met Lys Ile
                 125                 130                 135

Ile Met Lys Val Gly Gln Asp Pro Asn Ala Val Thr Pro Glu Gln Leu
             140                 145                 150

Thr Thr Ser Arg Pro Ser Lys Glu Ala Asp Asn Thr Val Lys Met Ala
         155                 160                 165

Thr Gln Ala Pro Gly Ser Arg Gly Ser Leu Gly Asp Ser Asp Gly Lys
     170                 175                 180

His Glu Thr Val Asn Gln Glu Glu Lys Ser Gly Pro Gly Ala Ser Gly
 185                 190                 195                 200

Gly Ser Ser Gly Asp Pro Asp Gly Phe Phe Asn Ser Lys Val Ala Leu
                 205                 210                 215

Phe Ala Ala Val Gly Ala Gly Cys Val Ile Phe Leu Leu Ile Ile Ile
             220                 225                 230

Phe Leu Thr Val Leu Leu Leu Lys Leu Arg Lys Arg His Arg Lys His
         235                 240                 245

Thr Gln Gln Arg Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ser Thr Leu Ala Ser Pro
     250                 255                 260

Lys Gly Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Glu Pro Ser Asp Ile Ile Ile
 265                 270                 275                 280

Pro Leu Arg Thr Thr Glu Asn Asn Tyr Cys Pro His Tyr Glu Lys Val
                 285                 290                 295

Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro
             300                 305                 310

Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
         315                 320
```