

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 286 843**

⑮ Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

**C07K 14/715** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **98901699 .3**

⑯ Fecha de presentación : **13.01.1998**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1007659**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **14.06.2000**

⑭ Título: **Receptores 6 $\alpha$  y 6 $\beta$  del factor de necrosis tumoral.**

⑯ Prioridad: **14.01.1997 US 35496 P**

⑬ Titular/es: **HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.**  
**14200 Shady Grove Road**  
**Rockville, Maryland 20850, US**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2007**

⑯ Inventor/es: **Gentz, Reiner, L.;**  
**Ni, Jian;**  
**Ebner, Reinhard;**  
**Yu, Guo-Liang;**  
**Ruben, Steven, M. y**  
**Feng, Ping**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2007**

⑯ Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Receptores 6 $\alpha$  y 6 $\beta$  del factor de necrosis tumoral.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos genes humanos que codifican polipéptidos que son miembros de la familia de los receptores de TNF. Más específicamente, se proporcionan moléculas aisladas de ácido nucleico que codifican polipéptidos humanos denominados receptores 6 $\alpha$  y 6 $\beta$  del factor de necrosis tumoral, denominados algunas veces de aquí en adelante “TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ ” o genéricamente “polipéptidos de TNFR”. También se proporcionan polipéptidos de TNFR así como vectores, células hospedadoras y métodos recombinantes para producir los mismos. La invención se refiere adicionalmente a métodos de escrutinio para identificar agonistas y antagonistas de la actividad del polipéptido del TNFR. También se proporcionan métodos diagnósticos y terapéuticos que emplean tales composiciones.

15 **Antecedentes de la invención**

Diversas acciones biológicas, por ejemplo, la respuesta a ciertos estímulos y a procesos naturales biológicos se controlan con factores tales como las citoquinas. Muchas citoquinas actúan a través de receptores, acoplándose al receptor y produciendo una respuesta intracelular.

20 Por ejemplo, los factores de necrosis tumoral (TNF) alfa y beta son citoquinas que actúan a través de los receptores de TNF para regular numerosos procesos biológicos, incluyendo la protección contra la infección y la inducción de choque y la enfermedad inflamatoria. Las moléculas de TNF pertenecen a la superfamilia de los “ligandos de TNF” y actúan junto con sus receptores o contra-ligandos, la superfamilia de “receptores de TNF”. Hasta la fecha se han identificado nueve miembros de la superfamilia de ligandos de TNF y se han caracterizado diez miembros de la superfamilia de receptores de TNF.

25 Entre los ligandos se incluyen el TNF- $\alpha$ , la linfotoxina  $\alpha$  (LT- $\alpha$ , también conocida como TNF- $\beta$ ), LT- $\beta$  (encontrada en el complejo heterotímero LT- $\alpha$ 2- $\beta$ ), FasL, CD40L, CD27L, CD30L, 4-IBBL, OX40L y el factor de crecimiento de los nervios (NGF). La superfamilia de receptores de TNF incluye el receptor p55TNF, el receptor p75TNF, la proteína relacionada con el receptor de TNF, el antígeno FAS o APO-1, CD40, CD27, CD30, 4-IBB, OX40, el receptor p75 de baja afinidad y el receptor de NGF (Meager, A., *Biologicals*, 22:291-295 (1994)).

30 Muchos miembros de la superfamilia de ligandos de TNF se expresan en linfocitos T activados, lo que implica que son necesarios para las interacciones de los linfocitos con otros tipos de células que sostienen la ontogenia y funciones celulares (Meager, A., mencionado anteriormente).

35 Se ha alcanzado a un conocimiento considerable de las funciones esenciales de diversos miembros de la familia de receptores de TNF, a través de la identificación y la creación de mutantes que anulan la expresión de estas proteínas. Por ejemplo, mutaciones presentes en la naturaleza en el antígeno FAS y su ligando provocan una enfermedad linfoproliferativa (Watanabe-Fukunaga, R. y col., *Nature* 356:314 (1992)), reflejando tal vez un fallo de la muerte celular programada. Mutaciones en el ligando CD40 provocan un estado de inmunodeficiencia ligado a X, caracterizado por altos niveles de inmunoglobulina M y bajos niveles de inmunoglobulina G en el plasma, indicando una activación errónea de los linfocitos B dependientes de linfocitos T (Allen, R.C. y col., *Science*, 259:990 (1993)). Las mutaciones dirigidas del receptor de baja afinidad del factor de crecimiento de los nervios, provocan un trastorno caracterizado por una innovación sensorial defectuosa de las estructuras periféricas (Lee, K.F. y col., *Cell*, 69:737 (1992)).

40 El TNF y la LT- $\alpha$  son capaces de unirse a dos receptores de TNF (los receptores de TNF de 55 y 75 kd). Un gran número de efectos biológicos producidos por el TNF y la LT- $\alpha$ , actuando a través de sus receptores, incluyen la necrosis hemorrágica de tumores trasplantados, la citotoxicidad, una función en el choque endotóxico, la inflamación, la inmunorregulación, la proliferación y las respuestas antivíricas, así como la protección contra los efectos perjudiciales de la radiación ionizante. El TNF y la LT- $\alpha$  están implicados en la patogénesis de una amplia gama de enfermedades, que incluyen el choque endotóxico, la malaria cerebral, los tumores, la enfermedad autoinmune, el SIDA y el rechazo del injerto-hospedador (Beutler, B. y Von Huffel, C., *Science*, 264:667-668, (1994)). Las mutaciones en el receptor p55 provocan una susceptibilidad creciente a la infección microbiana.

45 Además, un dominio de alrededor de 80 aminoácidos, cerca del extremo C-terminal de TNFR1 (p55) y de Fas, se ha descrito como el “dominio de muerte” que es responsable de la transducción de señales para la muerte celular programada (Tartaglia y col., *Cell*, 74:845 (1993)),

50 La apoptosis o la muerte celular programada, es un proceso fisiológico esencial en el desarrollo normal y la homeostasis de organismos multicelulares (H. Steller, *Science*, 267:1445-1449 (1995)). Los desarreglos de la apoptosis contribuyen a la patogénesis de diversas enfermedades humanas, que incluyen el cáncer, los trastornos neurodegenerativos y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (C.B. Thompson, *Science*, 267:1456-1462 (1995)). Últimamente se ha dirigido la atención a la transducción de señales y a la función biológica de dos receptores de la muerte celular de la superficie celular, Fas/APO-1 y TNFR-1 (J.L. Cleveland, J.N. Ihle, *Cell* 81, 479-482 (1995); A. Fraser, G. Evan, *Cell* 85, 781-784 (1996); S. Nagata, P. Golstein, *Science* 267, 1449-56 (1995)). Ambos son miembros de la familia de

receptores de TNF que también incluyen a TNFR-2, NGFR de baja afinidad, CD40 y CD30, entre otros (C.A. Smith y col., *Science* 248, 1019-23 (1990); M. Tewari, V.M. Dixit, en "Modular Texts in Molecular and Cell Biology" M. Purton, Heldin, Carl, compiladores (Chapman y Hall, Londres, 1995). Aunque los miembros de la familia se definen por la presencia de repeticiones ricas en cisteína en sus dominios extracelulares, Fas/APO-1 y TNFR-1 también 5 comparten una región de homología intracelular, denominada apropiadamente el "dominio de muerte", la cual está relacionada lejanamente con el gen suicida de la *Drosophila*, "reaper" (P. Golstein, D. Marguet, V. Depraetere, *Cell* 81, 185-6 (1995); K. White y col., *Science* 264, 677-83 (1994)). Este dominio de muerte compartido sugiere que ambos 10 receptores interaccionan con un conjunto relacionado de moléculas transductoras de señal que, hasta la fecha, no han sido identificadas. La activación de Fas/APO-1 capta la molécula adaptadora que contiene el dominio de muerte FADD/MORT1 (A.M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, V.M. Dixit, *Cell* 81, 505-12 (1995); M.P. Boldin y col., *J. Biol. Chem.* 270, 7795-8 (1995); F.C. Kischkel y col., *EMBO* 14, 5579-5588 (1995)) que se une a su vez y activa probablemente FLICE/MACH1, un miembro de la familia ICE/CED-3 de las proteasas pro-apoptóticas (M. Muzio y col., *Cell* 85, 817-827 (1996); M.P. Boldin, T.M. Goncharov, Y.V. Goltsev, D. Wallach, *Cell* 85, 803-815 (1996)). Aunque 15 el papel principal de Fas/APO-1 es desencadenar la muerte celular, el TNFR-1 puede señalar una configuración de diversas actividades biológicas, muchas de las cuales parten de su capacidad para activar el NF- $\kappa$ B (L.A. Tartaglia, D.V. Goeddel, *Immunol. Today* 13, 151-3 (1992)). Por tanto, TNFR-1 capta la molécula adaptadora multivalente TRADD que, como FADD, también contiene un dominio de muerte (H. Hsu, J. Xiong, D.V. Goeddel, *Cell* 81, 495-504 (1995); H. Hsu, H. -B. Shu, M. -P. Pan, D.V. Goeddel, *Cell* 84, 299-308 (1996)). A través de sus asociaciones con una variedad 20 de moléculas de señalización que incluyen FADD, TRAF2 y RIP, TRADD puede señalar tanto la apoptosis como la activación de NF- $\kappa$ B (H. Hsu, H.-B. Shu, M.-P. Pan, D.V. Goeddel, *Cell* 84, 299-308 (1996); H. Hsu, J. Huang, H.-B. Shu V. Baichwal, D.V. Goeddel, *Immunity* 4, 387-396 (1996)). En la base de datos de EMBL, número de registro AA 025673, se describe una secuencia de ADN de 46 nt.

25 Los efectos de los ligandos de la familia de TNF y de los receptores de la familia de TNF son variados e influyen sobre funciones diversas, normales y anormales, en los procesos biológicos del sistema de mamíferos. Por tanto, existe una clara necesidad de identificación y caracterización de tales receptores y ligandos que influyen sobre la actividad biológica normal y en estados de enfermedad. En particular, existe una necesidad de aislamiento y caracterización de 30 nuevos miembros de la familia de receptores de TNF.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que codifica al menos una porción de un polinucleótido de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  que tiene las secuencias completas de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente, o la secuencia completa de aminoácidos codificada 35 por un clon de ADNc depositado como ADN plasmídico con el número de depósito ATCC 97810 y 97809, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos determinadas por la secuenciación de los clones de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  depositados, que se muestran en las Figuras 1 y 2 (SEQ ID NOs: 1 y 3, respectivamente) contienen marcos de lectura 40 abiertos que codifican polipéptidos completos de 300 y 170 residuos de aminoácidos, respectivamente, que incluyen un codón de iniciación que codifica una metionina N-terminal en las posiciones de nucleótidos 25-27 y 73-75 en SEQ ID NOs: 1 y 3 respectivamente.

Las proteínas del TNFR de la presente invención comparten una homología de secuencia con otros receptores de TNF. Variantes por corte y empalme de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  muestran el mayor grado de homología de secuencia 45 con los productos de la traducción de los ARNm humanos de TNFR-I y TNFR-II (Figura 3) (SEQ ID NOs: 5 y 6, respectivamente) incluyendo también múltiples dominios ricos en cisteína conservados.

Los polipéptidos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  tienen secuencias líder predichas de 30 aminoácidos cada una; y la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos predichos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  maduros, también se muestra en las Figuras 1 y 2 como los residuos de aminoácidos 31-300 (SEQ ID NO:2) y 31-170 (SEQ ID NO:4), respectivamente.

50 De este modo, un aspecto de la invención proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo consistente en: (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos completa en SEQ ID NO:2 o 4, o tal y como es codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito nº 97810 o 97809 de la ATCC; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las 55 posiciones 31-300 en SEQ ID NO:2, o 31-170 en SEQ ID NO:4, o tal y como es codificada por el clon de ADNc contenido en la ATCC, nº de depósito 97810 o 97809; (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio soluble extracelular de un polipéptido de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 31 a 283 en SEQ ID NO:2, o 31 a 166 en SEQ ID NO: 4, o tal y como es codificada por el clon de ADNc contenido en la ATCC, nº de depósito 97810 o 97809; y (d) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de los apartados (a), (b) o (c) anteriores.

Otras realizaciones de la invención incluyen moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica al menos en un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de los apartados (a), (b), (c) y (d) anteriores, o un polinucleótido que se híbrida bajo 65 condiciones de hibridación rigurosas, con un polinucleótido de los apartados (a), (b), (c) o (d) anteriores. Este polinucleótido que se híbrida no se híbrida bajo condiciones rigurosas de hibridación con un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos que consista sólo en residuos A o sólo en residuos T. Una realización adicional del ácido

# ES 2 286 843 T3

nucleico de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de una porción portadora de un epítopo de un polipéptido de TNFR, que tiene una secuencia de aminoácidos de los apartados (a), (b) o (c) anteriores.

5 La presente invención también se refiere a vectores recombinantes que incluyen las moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente invención y a células hospedadoras que contienen los vectores recombinantes, así como a métodos para preparar tales vectores y células hospedadoras y para emplearlos en la producción de polipéptidos o péptidos de TNFR por técnicas recombinantes.

10 La invención proporciona adicionalmente un polipéptido de TNFR aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo consistente en: (a) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de TNFR de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos completa mostrada en SEQ ID NO: 2 o 4, o tal y como es codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito nº 97810 o 97809 de la ATCC; (b) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido maduro de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 31-300 en SEQ ID NO:2, 15 o 31-170 en SEQ ID NO:4, o tal y como es codificada por el clon de ADNc contenido en la ATCC, nº de depósito 97810 o 97809; (c) la secuencia de aminoácidos de un dominio soluble extracelular de un polipéptido de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 31 a 283 en SEQ ID NO:2 o 31 a 166 en SEQ ID NO: 4, o tal y como es codificada por el clon de ADNc contenido en la ATCC, nº de depósito 97810 o 97809.

20 Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a las descritas en los apartados (a), (b), (c) y (d) anteriores, así como polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos 95% de similitud con las anteriores.

25 Una realización adicional de este aspecto de la invención, se refiere a un péptido o polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una porción portadora de epítopo de un polipéptido de TNFR que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en los apartados (a), (b) o (c) anteriores. Los péptidos o polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de una porción portadora de epítopo de un polipéptido de TNFR de la invención, incluyen porciones de tales polipéptidos con al menos seis o siete, preferentemente al menos nueve, y más preferentemente al menos 30 aminoácidos, hasta aproximadamente 50 aminoácidos, aunque también están incluidos en la 30 invención los polipéptidos portadores de epítopo de cualquier longitud hasta e incluyendo la secuencia completa de aminoácidos de un polipéptido de la invención descrito anteriormente.

35 En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido de TNFR, que tiene una secuencia de aminoácidos descrita en los apartados (a), (b) o (c) anteriores. La invención proporciona adicionalmente métodos para aislar anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido de TNFR que tiene una secuencia de aminoácidos tal y como se ha descrito en esta memoria. Tales anticuerpos son útiles en el campo del diagnóstico o terapéuticamente, tal y como se describe a continuación.

40 Los ligandos de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) se conocen por ser de las citoquinas más pleiotrópicas, que inducen una gran cantidad de respuestas celulares, que incluyen la citotoxicidad, la actividad antivírica, las actividades inmunorreguladoras y la regulación de la transcripción de diversos genes. La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden polipéptidos de TNFR, particularmente polipéptidos de TNFR humanos que se pueden emplear, por ejemplo, para tratar enfermedades infecciosas, incluyendo la infección con el VIH, choque endotóxico, cáncer, enfermedades autoinmunes, enfermedad del injerto contra el hospedador, rechazo 45 agudo de injertos, rechazo crónico de injertos, trastornos neurodegenerativos, síndromes mielodisplásicos, lesión isquémica, enfermedad hepática inducida por toxinas, choque séptico, caquexia y anorexia. También se proporcionan métodos para tratar personas que requieran polipéptidos de TNFR.

50 La invención proporciona adicionalmente composiciones que comprenden un polinucleótido de TNFR o un polipéptido de TNFR para administrar a células *in vitro*, a células *ex vivo* y a células *in vivo*, o a un organismo multicelular. En ciertas realizaciones particularmente preferidas de este aspecto de la invención, las composiciones comprenden un polinucleótido de TNFR para la expresión de un polipéptido de TNFR en un organismo hospedador para el tratamiento de una enfermedad. En este aspecto se prefiere particularmente la expresión en un paciente humano, para tratar una disfunción asociada con una actividad endógena aberrante de un polipéptido de TNFR.

55 En otro aspecto, se describe un ensayo para escrutar agonistas y antagonistas que implica determinar el efecto que tiene un compuesto candidato sobre la unión del polipéptido de TNFR con un ligando de la familia de TNF. En particular, el método implica poner en contacto el ligando de la familia de TNF con un polipéptido de TNFR y un compuesto candidato y determinar si la unión del polipéptido de TNFR con el ligando de la familia de TNF, aumenta o disminuye debido a la presencia del compuesto candidato. En este ensayo, un incremento de la unión de un polipéptido de TNFR sobre la unión convencional, indica que el compuesto candidato es un agonista de la actividad de unión del polipéptido de TNFR y una disminución de la unión del polipéptido de TNFR comparando con la patrón, indica que el compuesto es un antagonista de la actividad de unión del polipéptido de TNFR.

65 TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  se expresan en células endoteliales, queratinocitos, tejido de próstata normal y de próstata tumoral. En una variedad de trastornos de estos tejidos o células, particularmente del sistema inmune, se pueden encontrar niveles de expresión del gen de TNFR que sean significativamente inferiores o superiores, en ciertos tejidos (p. ej. tejidos cancerosos) o fluidos corporales (p. ej., suero, plasma, orina, líquido sinovial o líquido espinal), tomados

de un individuo que tenga dicho trastorno, en relación con un nivel de expresión del gen de TNFR “convencional”, es decir, el nivel de expresión de TNFR en un tejido sano procedente de un individuo que no tiene el trastorno del sistema inmune. Por ello, la invención proporciona un método de diagnóstico *in vitro*, útil durante la diagnosis de dicho trastorno, que implica (a) someter a ensayo el nivel de expresión del gen de TNFR en células o en fluidos corporales

5 de un individuo; (b) comparar el nivel de expresión del gen de TNFR con un nivel de expresión del gen de TNFR convencional, en donde un incremento o una disminución del nivel de expresión del gen de TNFR sometido a ensayo, comparado con el nivel de expresión convencional, es indicativo de un trastorno en el sistema inmune.

10 La invención describe adicionalmente un método para tratar un individuo que requiere un incremento del nivel de actividad del polinucleótido de TNFR en el cuerpo, que comprende administrar a un individuo tal, una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de TNFR aislado de la invención o un agonista del mismo.

15 La invención también describe un método para tratar un individuo que requiere un nivel inferior de actividad del polipéptido de TNFR en el cuerpo, que comprende administrar a un individuo tal una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de TNFR. Los antagonistas preferidos para uso en la presente invención son los anticuerpos específicos de TNFR.

#### Breve descripción de las Figuras

20 La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO:2) de TNFR-6 $\alpha$ .

25 Las Figuras 2A y B muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO:4) de TNFR-6 $\beta$ .

30 Las Figuras 3A a P muestran una alineación creada con el método de Clustal, empleando el programa Megalign en la serie DNAstar que compara las secuencias de aminoácidos de TNFR-6 $\alpha$  (“TNFR-6 $\alpha$ ”) y TNFR-6 $\beta$  (“TNFR-6 $\beta$ ”) con otros receptores de TNF, tal y como sigue: TNFR1 (SEQ ID NO:5); TNFR2 (SEQ ID NO:6); NGFR (SEQ ID NO:7); LTbR (SEQ ID NO: 8); FAS (SEQ ID NO:9); CD27 (SEQ ID NO:10); CD30 (SEQ ID NO:11); CD40 (SEQ ID NO:12); 4-IBB (SEQ ID NO:13); OX40 (SEQ ID NO:14); VC22 (SEQ ID NO:15); y CRMB (SEQ ID NO:16).

35 Las Figuras 4 y 5 muestran análisis separados de las secuencias de aminoácidos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ , respectivamente. Se muestran las regiones alfa, beta, de giro y espiral; la hidrofilicidad y la hidrofobicidad; las regiones anfípáticas; las regiones flexibles; el índice de antigenicidad y la probabilidad de la localización superficial. En los gráficos de “Índice de antigenicidad - Jameson Wolf”, se puede obtener la ubicación indicada de las regiones altamente antigenicas de las proteínas, es decir, las regiones a partir de las cuales se pueden obtener los péptidos portadores de epitopos de la invención.

40 La Figura 6 muestra las secuencias de nucleótidos de HELDI06R y HCEOW38R que están relacionadas con las SEQ ID NOs: 1 y 3.

#### Descripción detallada

45 La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido que codifica un polipéptido de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$ , en general, “polipéptido(s) de TNFR” que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente, que se determinaron secuenciando los ADNc clonados. Las secuencias de nucleótidos mostradas en las Figuras 1 y 2A y B (SEQ ID NOs: 1 y 3) se obtuvieron secuenciando los clones HPHAE52 y HTPCH84; los cuales fueron depositados el 22 de noviembre de 1996 en la “American Type Culture Collection”, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 y fueron adjudicados los números de orden 97810 y 97809, respectivamente. Los clones depositados están contenidos en el plásmido pBluescript SK(-) (Stratagene, La Jolla, CA).

55 Las proteínas TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  de la presente invención son variantes por corte y empalme que comparten una secuencia idéntica de nucleótidos y de aminoácidos a lo largo de los 142 residuos N-terminales de las proteínas respectivas. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas son similares en aproximadamente 23% y comparten múltiples dominios conservados, ricos en cisteína con el producto de la traducción del ARNm de TNFR-2 humano (Figura 3) (SEQ ID NO:6). De forma singular, estas proteínas comparten una similitud sustancial de la secuencia en sus dominios extracelulares, que incluyen cuatro motivos repetidos ricos en cisteína, con una homología significativa entre las subunidades. Se supone que TNFR-2 media exclusivamente en la proliferación de los linfocitos T humanos mediante TNF (documento PCT WO/94/09137).

#### Moléculas de ácido nucleico

65 A no ser que se indique de otro modo, todas las secuencias de nucleótidos determinadas por la secuenciación de una molécula de ADN de esta memoria, se determinaron empleando un secuenciador automático de ADN (tal como el modelo 373 de Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) y todas las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificadas por las moléculas de ADN determinadas en esta memoria, fueron predichas por la traducción de

una secuencia de ADN determinada tal y como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, tal y como se conoce en la técnica para cualquier secuencia de ADN, determinada por esta vía automática, cualquier secuencia de nucleótidos determinada en esta memoria, puede contener algunos errores. Las secuencias de nucleótidos determinadas automáticamente tienen una identidad típicamente de al menos 90%, más típicamente al menos aproximadamente 95% hasta al 5 menos aproximadamente 99,9%, con la secuencia de nucleótidos real de la molécula de ADN secuenciada. La secuencia real se puede determinar más precisamente mediante otras vías que incluyen métodos de secuenciación manuales del ADN, bien conocidos en la técnica. Tal y como se conoce en la técnica, una inserción o una delección aislada en una secuencia de nucleótidos determinada, comparada con la secuencia real, provocará un desplazamiento del marco en la traducción de la secuencia de nucleótidos, de modo que la secuencia de aminoácidos predicha codificada por 10 una secuencia determinada de nucleótidos será completamente diferente de la secuencia de aminoácidos codificada realmente por la molécula de ADN, comenzando en el lugar de dicha inserción o delección.

Por "secuencia de nucleótidos" de una molécula de ácido nucleico o de un polinucleótido se entiende, para una molécula o un polinucleótido de ADN, una secuencia de desoxirribonucleótidos y para una molécula o un polinucleótido de ARN, la secuencia correspondiente de ribonucleótidos (A, G, C y U), en donde cada desoxirribonucleótido timidina (T) en la secuencia de desoxirribonucleótidos especificada, se sustituye por el ribonucleótido uridina (U).

Empleando la información proporcionada en esta memoria, tal como las secuencias de nucleótidos en las Figuras 20 1 y 2A y B (SEQ ID NOS: 1 y 3), una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica un polipéptido de TNFR se puede obtener empleando una clonación convencional y procedimientos de escrutinio, tales como los de la clonación de ADNc empleando ARNm como material de partida. A modo de ilustración de la invención, los clones de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  (Figuras 1 y 2A y B, respectivamente) se identificaron en genotecas de ADNc procedentes 25 de los siguientes tejidos: células endoteliales, queratinocitos, tejido normal de próstata y tejido tumoral de próstata.

Las secuencias de nucleótidos determinadas de los ADNc de TNFR de las Figuras 1 y 2A y B (SEQ ID NOS: 1 y 3) 30 contienen marcos de lectura abiertos que codifican proteínas de 300 y 170 residuos de aminoácidos, con un codón de iniciación en las posiciones de nucleótidos 25-27 y 73-75 de las secuencias de nucleótidos en las Figuras 1 y 2 (SEQ ID NOS: 1 y 3), respectivamente.

Los marcos de lectura abiertos de los genes de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  comparten una homología de la secuencia con el producto de la traducción del ARNm humano para TNFR-2, que incluye el dominio extracelular soluble de 35 aproximadamente 31-283 residuos de SEQ ID NO: 2 y los residuos 31-166 de SEQ ID NO:4, respectivamente.

Tal y como apreciará un experto en la técnica, debido a las posibilidades de error en la secuenciación descritas anteriormente, los polipéptidos de TNFR completos reales codificados con los ADNc depositados, que comprenden 40 aproximadamente 300 y 170 aminoácidos, pueden ser algo más largos o más cortos. Generalmente, los marcos de lectura abiertos reales pueden estar en cualquier lugar en el intervalo de  $\pm$ 20 aminoácidos, más probablemente en el intervalo de  $\pm$ 10 aminoácidos, del predicho, a partir del primer codón de metionina desde el extremo N-terminal, 45 mostrado en las Figuras 1 y 2A y B (SEQ ID NOS: 1 y 3) que está en fase con las secuencias traducidas mostradas en cada una de las figuras respectivas. También se apreciará que, dependiendo de los criterios analíticos empleados para identificar diversos dominios funcionales, la "dirección" exacta del (de los) dominio(s) extracelular(es) y transmembranal(es) de los polipéptidos de TNFR, puede diferir ligeramente de las posiciones predichas anteriormente. Por ejemplo, la localización exacta del dominio extracelular en SEQ ID NO: 2 puede variar ligeramente (p. ej., la dirección 50 se puede "desplazar" aproximadamente 1 hasta aproximadamente 20 residuos, más probablemente aproximadamente 1 hasta aproximadamente 5 residuos) dependiendo de los criterios utilizados para definir el dominio. En cada caso, tal y como se describe a continuación más ampliamente, la invención proporciona adicionalmente polipéptidos que tienen diversos residuos delecionados del extremo N-terminal del polipéptido completo, incluyendo polipéptidos que carecen de uno o de varios aminoácidos desde el extremo N-terminal del dominio extracelular descrito en esta memoria, lo que constituye formas solubles de los dominios extracelulares de las proteínas de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ .

#### *Secuencias líder y maduras*

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas completas de TNFR incluyen una secuencia líder y una proteína 55 madura, tal y como se muestra en las SEQ ID NOS: 2 y 4. Más particularmente, la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican formas maduras de las proteínas de TNFR. Por lo tanto, de acuerdo con la hipótesis de la señal, una vez iniciada la exportación de la cadena proteica en crecimiento, a través del retículo endoplásmico rugoso, las proteínas secretadas por las células de mamífero tienen una señal o una secuencia líder secretora que se escinde del polipéptido completo para producir una forma "madura" secretada de la proteína. En 60 la mayoría de las células de mamífero e incluso en las células de insecto, se escinden las proteínas secretadas con la misma especificidad. Sin embargo, en algunos casos, la escisión de una proteína secretada no es completamente uniforme, lo que da como resultado dos o varias especies maduras de la proteína. Además, se conoce desde hace tiempo que la especificidad de la escisión de una proteína secretada se determina finalmente por la estructura primaria de la proteína completa, es decir, es inherente a la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Por tanto, la presente invención 65 proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por un clon de ADNc identificado como el depósito nº 97810 o 97809 de la ATCC. Por polipéptidos "maduros" de TNFR que tienen la secuencia de aminoácidos codificada por un clon de ADNc de la ATCC nº de depósito 97810 o 97809" se entiende la(s) forma(s) madura(s) de la proteína producida por la expresión

# ES 2 286 843 T3

en una célula de mamífero (p. ej., las células COS, tal y como se describe a continuación) del marco de lectura abierto completo codificado por la secuencia de ADN humano del clon contenido en el vector depositado.

Además, están disponibles métodos para predecir si una proteína tiene un líder secretor, así como el lugar de la escisión de esa secuencia líder. Por ejemplo, en el método de McGeoch (*Virus Res.*, 3:271-286 (1985)) se emplea la información procedente de una región corta cargada del extremo N-terminal y una región no cargada posterior de la proteína completa (sin escindir). En el método de von Heinje (*Nucleic Acids Res.*, 14:4683-4690 (1986)) se emplea la información procedente de los residuos próximos al sitio de escisión, típicamente los residuos -13 a +2, en donde +1 indica el extremo amino terminal de la proteína madura. La exactitud en el pronóstico de los puntos de escisión de proteínas secretoras conocidas de mamífero para cada uno de estos métodos, se encuentra en el intervalo de 75-80% (von Heinje, mencionado anteriormente). Sin embargo, los dos métodos no producen siempre el(s) mismo(s) punto(s) de escisión predicho(s) para una proteína dada.

En el presente caso, la secuencia de aminoácidos deducida de los polipéptidos de TNFR completos, se analizó con un programa informático "SPORT", puesto a disposición por el Dr. Kenta Nakai del "Institute for Chemical Research", Universidad de Kioto (véase K. Nakai y M. Kanehisa, *Genomics*, 14:897-911 (1992)), que es un sistema especializado para predecir la localización celular de una proteína, basándose en la secuencia de aminoácidos. Como una parte de esta predicción informática de la localización, se incorporan los métodos de McGeoch y de von Heinje. El análisis de las secuencias de aminoácidos de TNFR con este programa, proporciona los siguientes resultados: TNFR-6 $\alpha$  y TNFR- $\beta$  codifican polipéptidos maduros que tienen las secuencias de aminoácidos de los residuos 31-300 y 31-170 de SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente.

Tal y como se ha indicado, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm o en forma de ADN, incluyendo, por ejemplo, el ADNc y el ADN genómico obtenido por clonación o producido de forma sintética. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario. El ADN o ARN monocatenario puede ser la cadena codificadora, también conocida como la cadena complementaria o puede ser la cadena no codificadora, también denominada la cadena anti-complementaria.

Por molécula(s) "aislada(s)" de ácido nucleico se entiende una molécula de ácido nucleico, ADN o ARN, que se ha separado de su entorno natural. Por ejemplo, las moléculas de ADN recombinante contenidas en un vector se consideran aisladas para los fines de la presente invención. Otros ejemplos de moléculas de ADN aisladas, incluyen las moléculas de ADN recombinante mantenidas en células hospedadoras heterólogas o las moléculas de ADN purificadas (parcial o sustancialmente) en solución. Las moléculas de ARN aisladas incluyen transcritos de ARN *in vivo* o *in vitro* de las moléculas de ADN de la presente invención. Las moléculas de ácido nucleico aisladas según la presente invención, incluyen adicionalmente dichas moléculas producidas sintéticamente.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la presente invención incluyen moléculas de ADN que comprenden un marco de lectura abierto (ORF) con un codón de iniciación en las posiciones 25-27 y 73-75 de las secuencias de nucleótidos mostradas en SEQ ID NOs: 1 y 3, respectivamente.

También se incluyen moléculas de ADN que comprenden la secuencia codificadora para los polipéptidos maduros y predichos de TNFR, mostrada en las posiciones 31-300 y 31-170 de SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente.

Además, las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención incluyen moléculas de ADN que comprenden una secuencia sustancialmente diferente a las descritas anteriormente, pero que debido a la degeneración del código genético, todavía codifican una proteína de TNFR. Por supuesto, el código genético y las preferencias de codones específicas de la especie, son conocidos en la técnica. Por lo tanto, para un experto en la técnica sería un trabajo rutinario generar las variantes degeneradas descritas anteriormente, por ejemplo, para mejorar la expresión de codones en un hospedador particular (p. ej., cambiar codones en el ARNm humano por los preferidos por un hospedador bacteriano, tal como *E. coli*).

En otro aspecto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de TNFR que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADNc contenido en el plásmido depositado en la ATCC, nº de depósito 97810 o 97809. Preferentemente, esta molécula de ácido nucleico codificará el polipéptido maduro a través del clon de ADNc depositado, descrito anteriormente.

La invención proporciona adicionalmente una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 o en las Figuras 2A y B (SEQ ID NO: 1 o 3) o la secuencia de nucleótidos de los ADNc de TNFR contenidos en los clones depositados descritos anteriormente, o una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia complementaria a una de las secuencias descritas anteriormente. Tales moléculas aisladas, particularmente las moléculas de ADN, son útiles como sondas para el cartografiado de genes, mediante hibridación *in situ* con cromosomas y para detectar la expresión de los genes de TNFR en tejido humano, por ejemplo, mediante el análisis de transferencia de tipo Northern.

La presente invención se dirige adicionalmente a moléculas de ácido nucleico que codifican porciones de las secuencias de nucleótidos descritas en esta memoria, así como a fragmentos de las moléculas de ácido nucleico aisladas descritas en esta memoria. En particular, la invención proporciona polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que representa la porción de SEQ ID NO: 1 o 3, la cual consiste en las posiciones 25-924 y 73-582 de SEQ

## ES 2 286 843 T3

5 ID NOs: 1 y 3, respectivamente. También se contemplan los polinucleótidos que codifican polipéptidos de TNFR que carecen de una metionina aminoterminal, teniendo tales polinucleótidos una secuencia de nucleótidos que representa la porción de SEQ ID NOs: 1 y 3 que consiste en las posiciones 28-924 y 76-582, respectivamente. Los polipéptidos codificados por tales polinucleótidos también se proporcionan, comprendiendo tales polipéptidos una secuencia de aminoácidos en las posiciones 2-300 y 2-170 de SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente.

10 Además, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias de nucleótidos relacionadas con porciones extensas de las SEQ ID NOs: 1 y 3 del modo siguiente: HELDI06R (SEQ ID NO:17) y HCEOW38R (SEQ ID NO:18) están relacionadas con ambas SEQ ID NOs: 1 y 3. Se prefieren fragmentos de polipéptidos de las SEQ ID NOs: 1 y 3 que no sean SEQ ID NO:19 o 20 o subfragmentos de las mismas. Las secuencias de HELDI06R y HCEOW38R se muestran en la Figura 6.

15 Más generalmente, por un fragmento de una molécula de ácido nucleico aislada que tiene la secuencia de nucleótidos del ADNc depositado o la secuencia de nucleótidos mostrada en las Figuras 1 o 2 (SEQ ID NOs: 1 o 3), se entiende fragmentos de al menos aproximadamente 15 nt, y más preferentemente al menos aproximadamente 20 nt, aún más preferible al menos aproximadamente 30 nt, e incluso más preferido, al menos aproximadamente 40 nt de longitud, que son útiles como sondas para diagnóstico y cebadores, tal y como se describe en esta memoria. Por supuesto, fragmentos mayores de 50-300 nt de longitud también son útiles de acuerdo con la presente invención como los fragmentos que se corresponden con la mayoría o con toda la secuencia de nucleótidos de los ADNc depositados, o tal y como se muestran en las Figuras 1 y 2A y B (SEQ ID NOs: 1 y 3). Se prefieren especialmente los fragmentos que comprenden al menos 500 nucleótidos que tienen una identidad de al menos 95% con los 500 nucleótidos contiguos mostrados en SEQ ID NO:1. Por un fragmento de al menos 20 nt de longitud, por ejemplo, se entienden fragmentos que incluyen 20 o más bases contiguas de la secuencia de nucleótidos de un ADNc depositado o la secuencia de nucleótidos tal y como se muestra en las Figuras 1 y 2A y B (SEQ ID NOs: 1 y 3). Los fragmentos de ácido nucleico preferidos de la presente invención, incluyen moléculas de ácido nucleico que codifican porciones portadoras de epítopo de los polipéptidos de TNFR, tal y como se identifican en las Figuras 4 y 5 y se describen a continuación con más detalle.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que se híbrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con una porción del polinucleótido en una molécula de ácido nucleico de la invención descrita anteriormente, por ejemplo, un clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC n° 97810 o 97809. Por “condiciones de hibridación rigurosas” se entiende una incubación durante una noche a 42°C, en una solución que comprende: 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 0,1x SSC a aproximadamente 65°C.

35 Un polinucleótido que se híbrida con una “porción” de un polinucleótido, significa un polinucleótido (tanto ADN como ARN) que se híbrida con al menos aproximadamente 15 nucleótidos (nt) y más preferentemente al menos aproximadamente 20 nt, aún más preferiblemente aproximadamente 30 nt, e incluso más preferiblemente aproximadamente 30-70 (p. ej., 50) nt del polinucleótido de referencia. Estas son útiles como sondas para diagnóstico y cebadores tal y como se han descrito anteriormente y con más detalle a continuación.

40 Una porción de un polinucleótido de “al menos 20 nt de longitud”, por ejemplo, significa 20 nucleótidos contiguos o más, procedentes de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido de referencia (p. ej., un ADNc depositado o una secuencia de nucleótidos tal y como se muestra en la Figura 1 o en las Figuras 2A y B (SEQ ID NOs: 1 o 3)). Por supuesto, un polinucleótido que se híbrida sólo con una secuencia poli A (tal como el tramo poli(A) 3' terminal de un ADNc de TNFR, o con un segmento complementario de residuos T (o U), no estaría incluido en un polinucleótido de la invención, empleado para hibridarse con una porción de un ácido nucleico de la invención, puesto que un polinucleótido tal, se hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico que contenga un segmento poli(A) o su complemento (p. ej., prácticamente cualquier clon de ADNc bicatenario).

50 50 Tal y como se ha indicado, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican un polipéptido de TNFR pueden incluir, sin estar limitadas a las mismas, las que codifican la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro por sí mismas; y la secuencia codificadora del polipéptido maduro y secuencias adicionales, tales como las que codifican aproximadamente 26-35 aminoácidos de la secuencia líder o secretora, tal como una secuencia preproteica o proproteica o preproproteica; la secuencia codificadora del polipéptido maduro, con o sin las secuencias codificadoras adicionales mencionadas anteriormente.

60 También están codificados por los ácidos nucleicos de la invención, las secuencias proteicas anteriores junto con secuencias adicionales no codificadoras que incluyen, por ejemplo, sin estar limitadas a las mismas, intrones y secuencias 5' y 3' no codificadoras, tales como las secuencias transcritas y no traducidas que tienen una función en la transcripción, el procesamiento del ARNm que incluyen las señales de corte y empalme y de poliadenilación, por ejemplo, la unión al ribosoma y la estabilidad del ARNm; una secuencia codificadora adicional que codifica aminoácidos adicionales, tales como las que proporcionan funcionalidades adicionales.

65 65 Por lo tanto, la secuencia que codifica el polipéptido se puede fusionar con una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la marca proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311) entre

5 otras, muchas de las cuales están a disposición comercial. Tal y como se describe en Gentz y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación adecuada de la proteína de fusión. La marca "HA" es otro péptido útil para la purificación que se corresponde con un epítopo obtenido a partir de la proteína hemoaglutinina de la influenza, que ha sido descrito por Wilson y col., *Cell*, 37:767 (1984). Tal y como se describe a continuación, otras proteínas de fusión tales, incluyen un TNFR-5, TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  fusionado con Fc en el extremo N- o C-terminal.

*Polinucleótidos variantes y mutantes*

10 La presente invención describe adicionalmente variantes de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican porciones, análogos o derivados de un polipéptido de TNFR. Las variantes pueden estar presentes en la naturaleza, tales como una variante alélica natural. Una "variante alélica" describe una de las diversas formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo. *Genes II*, Lewin, B., compilador, John Wiley & Sons, Nueva York (1985).

15 Las variantes que no están presentes en la naturaleza, se pueden producir empleando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica.

20 Tales variantes incluyen las producidas por sustituciones, delecciones o adiciones de nucleótidos. Las sustituciones, delecciones o adiciones pueden implicar uno o varios nucleótidos. Las variantes se pueden alterar en regiones codificadoras, regiones no codificadoras o en ambas. Las alteraciones en las regiones codificadoras pueden producir sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras. Se prefieren especialmente entre éstas las sustituciones, las adiciones y las delecciones silenciosas, que no alteran las propiedades y las actividades del polipéptido de TNFR o de sus porciones. También se prefiere especialmente en este contexto, las sustituciones conservadoras.

25 Se prefieren muy especialmente las moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína madura que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 2 y 4 o las secuencias del polipéptido de TNFR maduro, codificadas por los clones de ADNc depositados.

30 30 Lo más preferido son las moléculas de ácido nucleico que codifican el dominio extracelular de una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID Nos: 2 o 4 o el dominio extracelular de una secuencia de aminoácidos de TNFR codificada por un clon del ADNc depositado.

35 35 Otras realizaciones incluyen una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es al menos idéntica en un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a un polinucleótido seleccionado entre el grupo consistente en: (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos completa en SEQ ID NOS: 2 o 4, o tal y como es codificada por un clon de ADNc contenido en el depósito nº 97810 o 97809 de la ATCC; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de TNFR maduro que tiene una secuencia de aminoácidos en las posiciones 31-300 o 31-170 en SEQ ID NOS: 2 o 4, respectivamente, o tal y como es codificada por un clon de ADNc contenido en la ATCC, nº de depósito 97810 o 97809; (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio soluble extracelular de un polipéptido de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 31-283 y 31-166 en SEQ ID NOS: 2 y 4, respectivamente; y (d) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de los apartados (a), (b) o (c) anteriores.

40 45 Otras realizaciones de la invención incluyen moléculas aisladas de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica al menos en un 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a cualquiera de las secuencias de nucleótidos de los apartados (a), (b), (c) o (d) anteriores, o un polinucleótido que se hibrida bajo condiciones de hibridación rigurosas con un polinucleótido de los apartados (a), (b), (c) o (d) anteriores. Este polinucleótido que se hibrida no se hibrida bajo condiciones rigurosas de hibridación con un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos que consista sólo en residuos A o sólo residuos T. Una realización adicional del ácido nucleico de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de una porción portadora de un epítopo de un polipéptido de TNFR que tiene una secuencia de aminoácidos de los apartados (a), (b), (c) o (d) anteriores.

50 55 La presente invención también se refiere a vectores recombinantes que incluyen las moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente invención y a células hospedadoras que contienen los vectores recombinantes, así como a métodos para preparar tales vectores y células hospedadoras, y para emplearlos en la producción de polipéptidos o péptidos de TNFR, por técnicas recombinantes.

60 Un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que es, al menos, por ejemplo, idéntica en 95% a una secuencia de nucleótidos de referencia que codifica un polipéptido de TNFR, significa que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido es idéntica a la secuencia de referencia, exceptuando que la secuencia de polinucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica el polipéptido de TNFR. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tenga una secuencia de nucleótidos que sea al menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia se pueden delecionar o sustituir con otro nucleótido o una cantidad de nucleótidos de hasta

## ES 2 286 843 T3

5% del total de los nucleótidos en la secuencia de referencia, se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas mutaciones de la secuencia de referencia pueden tener lugar en las posiciones 5' o 3' terminales de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre estas posiciones terminales, intercalando cada uno de forma individual entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o en varios grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

A modo práctico, el que cualquier molécula de ácido nucleico en particular sea idéntica al menos en 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 1 o en las Figuras 2A y B, o a la secuencia de nucleótidos de un clon de ADNc depositado, se puede determinar convencionalmente empleando 10 programas informáticos conocidos, tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit emplea el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, "Advances in Applied Mathematics" 2:482-489 (1981), para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias. Cuando se emplea Bestfit o cualquier otro 15 programa de alineación de secuencias, para determinar si una secuencia en particular es idéntica, por ejemplo, en 95% a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se disponen de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud total de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permitan interrupciones en la homología de hasta 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia.

La presente solicitud describe adicionalmente moléculas de ácido nucleico con una identidad de al menos 95%, 20 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 o las Figuras 2A o B (SEQ ID NOS: 1 y 3) o con la secuencia de ácido nucleico de un ADNc depositado, sin tener en consideración si codifica un polinucleótido que tiene actividad de TNFR. Esto es debido a que incluso si una molécula de ácido nucleico en particular no codifica un polipéptido que tenga actividad de TNFR, un experto en la técnica sabría cómo utilizar la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, como sonda de hibridación o como cebador para la reacción en cadena de 25 la polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácido nucleico descritos en la presente invención que no codifican un polipéptido que tiene actividad de TNFR, incluyen, entre otros, (1) aislar un gen de TNFR o variantes alélicas del mismo en una genoteca de ADNc; (2) hibridación *in situ* (p. ej., "FISH") con extensiones cromosómicas en metafase, para proporcionar la localización cromosómica precisa del gen de TNFR, tal y como describen Verma y col., "Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques", Pergamon Press, Nueva York (1988); y análisis de la transferencia de 30 tipo Northern para detectar la expresión de ARNm de TNFR en tejidos específicos.

Sin embargo, se prefieren las moléculas de ácido nucleico que tienen secuencias con una identidad de al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con una secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 o las Figuras 2A y B (SEQ ID NOS: 1 y 3) o con la secuencia de ácido nucleico de un ADNc depositado que de hecho codifica polipéptidos 35 que tienen actividad proteica de TNFR. Un "polipéptido que tiene actividad de TNFR" significa polipéptidos que muestran actividad similar, pero no necesariamente idéntica, a una actividad de una forma madura o extracelular de una proteína de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  de la invención, tal y como se mide en un ensayo biológico en particular. Los ligandos de la familia de TNFR inducen diversas respuestas celulares al unirse a los receptores de la familia de los 40 TNF, incluyendo el TNFR-6 $\alpha$  y el TNFR-6 $\beta$  de la presente invención. Las células que expresan las proteínas de TNFR se cree que tienen una respuesta celular potente frente a los ligandos del receptor de TNFR-I incluyendo los linfocitos B (CD19+); ambos linfocitos T CD4 y CD8+, los monocitos y las células endoteliales. Una "respuesta celular a un ligando de la familia de TNF" significa cualquier cambio genotípico, fenotípico y/o morfológico en una célula, línea celular, tejido, cultivo de tejido o paciente que se haya inducido con un ligando de la familia de TNF. Tal y como se ha indicado, tales respuestas celulares incluyen no sólo las respuestas fisiológicas normales a los ligandos de la 45 familia de TNF, sino también enfermedades asociadas con una proliferación celular incrementada o la inhibición de una proliferación celular incrementada, tal como mediante la inhibición de la apoptosis.

Los ensayos de rastreo para lo descrito anteriormente, son conocidos en la técnica. Un ensayo tal implica el uso de 50 células que expresan el receptor (por ejemplo, células CHO transfectadas) en un sistema que mide cambios en el pH extracelular causados por activación del receptor, por ejemplo, tal y como se describe en Science 246:181-196 (Octubre de 1989). Por ejemplo, un ligando de la familia de TNF se puede poner en contacto con una célula que expresa la forma madura del polipéptido del receptor de la presente invención y una segunda respuesta del mensajero, p. ej., transducción de la señal o cambios del pH, se pueden medir para determinar si el polipéptido de TNFR está activo.

55 Por supuesto, debido a la degeneración del código genético, un experto en la técnica reconocerá inmediatamente que un gran número de moléculas de ácido nucleico que tienen una secuencia con una identidad de al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la secuencia de ácido nucleico de un ADNc depositado o la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 o en las Figuras 2A y B (SEQ ID NOS: 1 y 3), codificarán un polipéptido "que tiene actividad proteica de TNFR". De hecho, el que las variantes degeneradas de estas secuencias de nucleótidos codifiquen todas ellas el mismo polipéptido, esto lo apreciará el experto en la técnica sin realizar el ensayo comparativo descrito anteriormente. También se reconocerá en la técnica que para las moléculas de ácido nucleico que no sean variantes degeneradas, un 60 número razonable también codificará un polipéptido que tenga la actividad proteica de TNFR. Esto es debido a que el experto en la técnica conoce sustituciones de aminoácidos que efectúan significativamente de forma menos probable o nada probable la función proteica (p. ej., sustituir un aminoácido alifático con un segundo aminoácido alifático), tal y como se describe a continuación.

*Vectores y células hospedadoras*

- La presente invención también se refiere a vectores que incluyen las moléculas de ADN aisladas de la presente invención, a células hospedadoras modificadas genéticamente con los vectores recombinantes y a la producción de polipéptidos de TNFR o fragmentos del mismo por técnicas recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un fago, un plásmido, un vector vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser adecuados o defectuosos para la replicación. En el último caso, la propagación vírica sólo tendrá lugar generalmente en células hospedadoras complementarias.
- 10 Los polinucleótidos se pueden unir a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un hospedador. Generalmente, un vector plasmídico se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato cálcico o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, se puede empaquetar *in vitro* empleando una línea celular adecuada para el empaquetamiento y a continuación transducir en las células hospedadoras.
- 15 El inserto de ADN deberá estar ligado funcionalmente a un promotor adecuado, tal como el promotor del fago lambda PL, los promotores de *E. coli lac*, *trp*, *phoA* y *tac*, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTRs retrovíricos, por mencionar algunos. Otros promotores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica. Las estructuras artificiales para expresión contendrán adicionalmente sitios para la iniciación de la transcripción, para la terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificadora de los 20 transcritos expresados en las estructuras artificiales, incluirá preferentemente un codón de inicio de la traducción en el comienzo y un codón de terminación (UAA, UGA O UAG) situado de forma adecuada, en el extremo del polipéptido que se va a traducir.
- 25 Tal y como se ha indicado, los vectores de expresión incluirán preferentemente al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen la reductasa de dihidrofolato, G418 o la resistencia a neomicina, en cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a la tetraciclina, kanamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* o en otras bacterias. Ejemplos representativos de hospedadores adecuados incluyen, sin estar limitados a los mismos, células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces* y células de *Salmonella typhimurium*; células de hongos, tales como las células de levadura; células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como CHO, COS, 293 y células del melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivo adecuados y las condiciones para las células hospedadoras descritas anteriormente son conocidos en la técnica. Entre los vectores preferidos para uso en bacterias, se incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en QIAGEN, Inc., mencionado anteriormente; los vectores Phagescript, vectores Bluescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia. Entre los vectores eucariotas preferidos se 30 encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG, disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL, disponibles en Pharmacia. Otros vectores adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. La introducción de la estructura artificial en la célula hospedadora se puede efectuar mediante transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Tales métodos están descritos en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis 35 y col., *Basic Methods In Molecular Biology* (1986). El polipéptido se puede expresar en una forma modificada, tal como una proteína de fusión y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, aminoácidos cargados particularmente, se puede añadir al extremo N-terminal del polipéptido para mejorar la estabilidad y la permanencia en la célula hospedadora, durante la purificación o durante la manipulación o el almacenamiento posterior. También los restos peptídicos se 40 pueden añadir al polipéptido para facilitar la purificación. Tales regiones se pueden retirar antes de la preparación final del polipéptido. La adición de restos peptídicos a los polipéptidos para generar la secreción o la excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otras, son técnicas familiares y de rutina en la técnica. Una proteína de fusión preferida comprende una región heteróloga procedente de inmunoglobulina que es útil para estabilizar y 45 purificar proteínas. Por ejemplo, el documento EP-A-0464 533 (duplicado canadiense 2045869) describe proteínas de fusión que comprenden varias porciones de la región constante de moléculas de inmunoglobulina, junto con otra proteína humana o una parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es muy ventajosa para el uso en terapia y diagnosis y esto da como resultado, por ejemplo, unas propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento EP-A-0232 262). Por otro lado, para algunos usos sería deseable poder eleccionar la parte Fc después de 50 que se exprese, se detecte y se purifique la proteína de fusión en la forma ventajosa descrita. Esto es el caso cuando la porción Fc muestra ser un impedimento para el uso en terapia y diagnosis, por ejemplo, cuando la proteína de fusión se va a utilizar como antígeno para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, las proteínas humanas tales como hIL-5, se han fusionado con porciones de Fc para ensayos de escrutinio de alto rendimiento para 55 identificar antagonistas de hIL-5. Véase, D. Bennett y col., *J. Molecular Recognition*, 8:52-58 (1995) y K. Johanson y col., *J. Biol. Chem.* 270:9459-9471 (1995).
- 60 Las proteínas de TNFR se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes por métodos bien conocidos que incluyen la precipitación con sulfato de amonio o con etanol, la extracción con ácidos, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía en fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofoba, la cromatografía de afinidad, la cromatografía con hidroxilapatito y la cromatografía con lectina. Más preferentemente se emplea la cromatografía líquida de alta resolución ("HPLC") para la purificación. Los polipéptidos de la presente invención incluyen: productos purificados procedentes de fuentes naturales que incluyen fluidos corporales, tejidos y células, tanto aislados directamente como cultivados; productos de procedimientos químicos sintéticos; y 65 productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un hospedador eucarionte o procarionte, incluyendo, por

ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o pueden no estar glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención pueden incluir también un residuo de metionina modificada inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el hospedador.

5

#### *Polipéptidos y fragmentos*

La invención proporciona adicionalmente polipéptidos de TNFR aislados que tienen las secuencias de aminoácidos codificadas por los ADNc depositados o las secuencias de aminoácidos en SEQ ID NOS: 2 y 4 o un péptido o un polipéptido que comprende una porción de los polipéptidos anteriores.

10

#### *Polipéptidos variantes y mutantes*

Para mejorar o alterar las características de un polipéptido de TNFR, se puede emplear la modificación genética de proteínas. La tecnología de ADN recombinante conocida por los expertos en la técnica se puede emplear para crear nuevas proteínas mutantes o "múteínas" que incluyen una o varias sustituciones, delecciones, adiciones de aminoácidos o proteínas de fusión. Tales polipéptidos modificados pueden mostrar, p. ej., una actividad mejorada o una estabilidad incrementada. Además, se pueden purificar con alto rendimiento y mostrar una solubilidad mejor que la del polipéptido natural correspondiente, al menos bajo ciertas condiciones de purificación y de almacenamiento.

20

#### *Mutantes por delección N-terminal y C-terminal*

Por ejemplo, para muchas proteínas, incluyendo el dominio extracelular de una proteína asociada a la membrana o la(s) forma(s) madura(s) de una proteína secretada, se conoce en la técnica que uno o varios aminoácidos se pueden delecionar del extremo N-terminal o C-terminal sin una pérdida sustancial de la función biológica. Por ejemplo, Ron y col., *J. Biol. Chem.* 268:2984-2988 (1993) describen proteínas modificadas del KGF que tenían actividad de unión a la heparina, incluso si se habían perdido 3, 8 o 27 de los residuos de aminoácidos amino terminales. En el presente caso, puesto que las proteínas de la invención son miembros de la familia de polipéptidos de TNFR, las delecciones de los aminoácidos del extremo N-terminal hasta la cisteína en la posición 49 de SEQ ID NOS: 2 y 4 (TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ )

30

pueden conservar alguna actividad biológica, tal como la regulación de la proliferación y la apoptosis de las células linfoides. De los polipéptidos que tienen delecciones N-terminales adicionales que incluyen el residuo C49 en SEQ ID NOS: 2 y 4, no se esperaría que conserven tales actividades biológicas, ya que es conocido que estos residuos son necesarios en un polipéptido relacionado con TNFR, para formar un puente disulfuro para proporcionar la estabilidad estructural necesaria para la unión al receptor y la transducción de la señal.

35

Sin embargo, incluso si la delección de uno o de varios aminoácidos procedentes del extremo N-terminal de una proteína, da como resultado la modificación por pérdida de uno o de varias funciones biológicas de la proteína, otras actividades biológicas se pueden seguir conservando. Por lo tanto, la capacidad de la proteína reducida para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen el dominio completo o extracelular de la proteína de TNFR, se conserva generalmente cuando se escinden menos de la mayoría de los residuos de la proteína completa o el dominio extracelular del extremo N-terminal. Si un polipéptido en particular que carece de los residuos N-terminales de una proteína completa, conserva dichas actividades inmunológicas, se puede determinar fácilmente por métodos de rutina descritos en esta memoria o conocidos de otro modo en la técnica.

45

Por consiguiente, la presente invención proporciona adicionalmente polipéptidos que tienen uno o varios residuos delecionados del extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos del TNFR, mostrada en SEQ ID NOS: 2 y 4, hasta el residuo de cisteína en la posición número 49; y los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos. En particular, la presente invención proporciona polipéptidos de TNFR-5 que comprenden la secuencia de aminoácidos de los residuos m-300 y n-170 de SEQ ID NOS: 2 y 4, respectivamente, en donde m y n son números enteros en el intervalo de 1-49, en donde 49 es la posición del primer residuo de cisteína procedente del extremo N-terminal de los polipéptidos completos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  (mostrados en SEQ ID NOS: 2 y 4, respectivamente) que se cree que es necesaria para la actividad de las proteínas de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ .

50

Más particularmente, la invención proporciona polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de los residuos: 1-300, 2-300, 3-300, 4-300, 5-300, 6-300, 7-300, 8-300, 9-300, 10-300, 11-300, 12-300, 13-300, 14-300, 15-300, 16-300, 17-300, 18-300, 19-300, 20-300, 21-300, 22-300, 23-300, 24-300, 25-300, 26-300, 27-300, 28-300, 29-300, 30-300, 31-300, 32-300, 33-300, 34-300, 35-300, 36-300, 37-300, 38-300, 39-300, 40-300, 41-300, 42-300, 43-300, 44-300, 45-300, 46-300, 47-300, 48-300 y 49-300 de SEQ ID NO:2 y 1-170, 2-170, 3-170, 4-170, 5-170, 6-170, 7-170, 8-170, 9-170, 10-170, 11-170, 12-170, 13-170, 14-170, 15-170, 16-170, 17-170, 18-170, 19-170, 20-170, 21-170, 22-170, 23-170, 24-170, 25-170, 26-170, 27-170, 28-170, 29-170, 30-170, 31-170, 32-170, 33-170, 34-170, 35-170, 36-170, 37-170, 38-170, 39-170, 40-170, 41-170, 42-170, 43-170, 44-170, 45-170, 46-170, 47-170, 48-170 y 49-170 de SEQ ID NO:4.

65

Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se proporcionan.

De forma similar, se conocen muchos ejemplos de mutáceas con delección del extremo C-terminal que son biológicamente funcionales. Por ejemplo, el interferón gamma muestra hasta diez veces más actividad delecionando los residuos de los aminoácidos 8-10 del extremo carboxi terminal de la proteína (Döbeli y col., *J. Biotechnology* 7:199-

216 (1988)). En el presente caso, puesto que la proteína de la invención es un miembro de la familia de polipéptidos de TNFR, las delecciones de los aminoácidos C-terminales hasta la cisteína en la posición 193 y 132 de SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente, pueden conservar alguna actividad biológica, tal como la regulación de la proliferación y la apoptosis de células linfoides. De los polipéptidos que tienen delecciones C-terminales adicionales que incluyen las 5 cisteínas en las posiciones 193 y 132 de SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente, no se esperaría que conserven dichas actividades biológicas, ya que es sabido que estos residuos en los polipéptidos relacionados con el receptor de TNF son necesarios para la formación de puentes disulfuro para proporcionar una estabilidad estructural que es necesaria para la unión al receptor.

10 Sin embargo, incluso si la delección de uno o de varios aminoácidos procedentes del extremo C-terminal de una proteína, da como resultado la modificación por pérdida de una o de varias funciones biológicas de la proteína, se pueden conservar todavía otras actividades biológicas. Por lo tanto, la capacidad de la proteína reducida para inducir y/o unirse a anticuerpos que reconocen la forma completa o madura de la proteína, se conservará generalmente cuando menos de la mayoría de los residuos de la proteína en forma completa o madura, se eliminen del extremo C-terminal. 15 Si un polipéptido en particular que carece de los residuos C-terminales de una proteína completa conserva tales actividades inmunológicas, se puede determinar fácilmente por métodos rutinarios descritos en esta memoria o conocidos de otro modo en la técnica.

20 Por consiguiente, la presente invención proporciona adicionalmente polipéptidos que tienen uno o varios residuos procedentes del extremo carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  mostrados en SEQ ID NO: 2 y 4, hasta la cisteína en la posición 193 y 132 de SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente, y los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos. En particular, la presente invención proporciona polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-y y 1-z de la secuencia de aminoácidos en SEQ ID NOs: 2 y 4, respectivamente, en donde y es cualquier número entero en el intervalo de 193-300 y z es cualquier número entero en el intervalo de 132- 25 170. Los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos también se proporcionan.

30 La invención también proporciona polipéptidos que tienen uno o varios aminoácidos delecionados de ambos extremos terminales carboxi y amino, que se pueden describir en general como los que tienen los residuos m-y de SEQ ID NO:2 y n-z de SEQ ID NO:4, en donde m, n y z son números enteros, tal y como se ha descrito anteriormente.

35 También se incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que consiste en una porción de una secuencia de aminoácidos completa de TNFR, codificada por un clon de ADNc contenido en el depósito ATCC nº 97810 o 97809, en donde en esta porción se excluyen los aminoácidos 1 hasta aproximadamente 49 desde el extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos completa, codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de ATCC nº 97810 o 97809, respectivamente, o desde el aminoácido 1 hasta aproximadamente 107 o 58 desde el extremo carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos completa, codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de ATCC nº 97810 o 97809, respectivamente, o cualquier combinación de las delecciones carboxi y amino terminales anteriores de la secuencia de aminoácidos completa, codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809. Los polinucleótidos que codifican todas las formas anteriores de polipéptidos mutantes por 40 delección, también se proporcionan.

#### *Otros mutantes*

45 Además de las formas de delección terminal de la proteína descritas anteriormente, un experto en la técnica también reconocerá que algunas secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de TNFR se pueden variar sin que haya un efecto significativo sobre la estructura o la función de las proteínas. Si se observan tales diferencias en la secuencia, se debe recordar que hay áreas decisivas en la proteína que determinan la actividad.

50 Por lo tanto, la invención incluye adicionalmente variaciones de los polipéptidos de TNFR que muestran una actividad polipeptídica sustancial de TNFR o que incluyen regiones de la proteína de TNFR, tales como las porciones de la proteína descritas anteriormente. Tales mutantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones tipo selecciónadas de acuerdo con normas generales, conocidas en la técnica, por tener poco efecto sobre la actividad. Por ejemplo, instrucciones de cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas, las ofrece Bowie, J. U. y col., "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions", 55 *Science* 247:1306-1310 (1990), en donde los autores indican que hay dos vías principales para estudiar la tolerancia al cambio de una secuencia de aminoácidos. El primer método se basa en el proceso de evolución, en el que las mutaciones se aceptan o se rechazan por selección natural. La segunda vía emplea modificaciones genéticas para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado y selecciones o escrutinios para identificar secuencias que mantienen la funcionalidad. Tal y como indican los autores, estos estudios han revelado que las proteínas 60 son sorprendentemente tolerantes a las sustituciones de aminoácidos. Los autores indican adicionalmente cuáles de los cambios de los aminoácidos están probablemente tolerados en una posición determinada de la proteína. Por ejemplo, la mayoría de los residuos de aminoácidos insertados requieren cadenas laterales no polares, mientras que se conservan algunas características de las cadenas laterales superficiales. Otras sustituciones fenotípicamente silenciosas tales, 65 están descritas por Bowie, J. U. y col., mencionado anteriormente, y las referencias citadas en la misma. Se consideran típicamente como conservadoras las sustituciones, uno por otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile; el intercambio de los residuos de hidroxilo Ser y Thr, el cambio de los residuos ácidos Asp y Glu, la sustitución entre los residuos de amida Asn y Gln, el cambio de los residuos básicos Lys y Arg y las sustituciones entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. Por lo tanto, el fragmento derivado o análogo del polipéptido de SEQ ID NOs: 2, 4 o 6, o el

codificado por un ADNc depositado, puede ser (i) uno en el que uno o varios de los residuos de aminoácidos están sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede estar o no codificado por el código genético, o (ii) uno en el que uno o varios de los residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente, o (iii) uno en el que el polipéptido maduro o soluble extracelular se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto que incrementa la semi-vida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionan con la forma anterior del polipéptido, tal como un péptido de la región de fusión Fc de IgG o una secuencia líder o secretora, o una secuencia que se emplea para la purificación de la forma anterior del polipéptido o una secuencia de pro-proteína. Tales fragmentos, derivados y análogos se consideran dentro del alcance de la técnica a partir de las enseñanzas de esta memoria.

Por lo tanto, el TNFR de la presente invención puede incluir una o varias sustituciones, delecciones o adiciones de aminoácidos, tanto a partir de mutaciones naturales como mediante manipulación humana. Tal y como se indica, los cambios se prefieren que sean de una naturaleza menor, tales como sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegamiento o a la actividad de la proteína (véase Tabla 1).

TABLA 1  
*Sustituciones de aminoácidos conservadoras*

Aromático	Fenilalanina Triptófano Tirosina
25	Hidrófobo
30	Leucina Isoleucina Valina
35	Polar
40	Glutamina Asparagina
45	Básico
50	Arginina Lisina Histidina
55	Ácido
60	Ácido aspártico Ácido glutámico
65	Pequeño
70	Alanina Serina Treonina Metionina Glicina

Los aminoácidos en las proteínas de TNFR de la presente invención que son esenciales para el funcionamiento, se pueden identificar por métodos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis con rastreo y sustitución por alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989)). El último procedimiento introduce mutaciones aisladas de alanina en cada residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se someten a continuación a un ensayo de la actividad biológica, tal como unión al receptor o actividad proliferativa *in vitro* o *in vivo*.

Son de especial interés las sustituciones de aminoácidos cargados por otros aminoácidos cargados o neutros que pueden producir proteínas con características mejoradas muy deseables, tales como una menor agregación. La agregación puede no sólo reducir la actividad, sino también ser problemática cuando se preparan formulaciones farmacéuticas, ya que los agregados pueden ser inmunógenos (Pinckard y col., *Clin. Exp. Immunol.* 2:331-340 (1967); Robbins y col., *Diabetes* 36:838-845 (1987); Cleland y col., *Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems* 10:307-377 (1993).

La sustitución de los aminoácidos también puede cambiar la selectividad de la unión de un ligando con los receptores de la superficie celular. Por ejemplo, Ostade y col., *Nature* 361:266-268 (1993) describen ciertas mutaciones que dan como resultado una unión selectiva del TNF- $\alpha$  sólo a uno de los dos tipos de receptores de TNF conocidos. Los sitios que son decisivos para la unión del ligando-receptor también se pueden determinar por análisis estructural, tal como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcación por fotoafinidad (Smith y col., *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992) y de Vos y col., *Science* 255:306-312 (1992)).

Puesto que TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  son miembros de la familia de proteínas relacionadas con el receptor de TNF, para modular más que para eliminar completamente las actividades biológicas se realizan mutaciones preferentemente en secuencias que codifican aminoácidos, en el dominio extracelular conservado de TNFR, más preferentemente en residuos dentro de esta región que no están conservados entre los miembros de la familia de receptores de TNF. También se describe en la presente invención polinucleótidos aislados que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los mutantes de TNFR anteriores.

Los polipéptidos de la presente invención se proporcionan preferentemente en forma aislada y preferentemente están sustancialmente purificadas. Una versión de los polipéptidos de TNFR producida recombinantemente se puede purificar sustancialmente por el método de una etapa, descrito por Smith y Johnson, *Gene* 67:31-40 (1988). Los polipéptidos de la invención también se pueden purificar a partir de fuentes naturales o recombinantes, empleando anticuerpos anti-TNFR-6 $\alpha$  y anti-TNFR-6 $\beta$  de la invención en métodos que son bien conocidos en la técnica de purificación de proteínas.

La invención proporciona adicionalmente polipéptidos de TNFR aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo consistente en: (a) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de TNFR de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos completa mostrada en SEQ ID NOS: 2 o 4 o tal y como es codificada por un clón de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809; (b) la secuencia de aminoácidos de un polipéptido maduro de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 31-300 en SEQ ID NO:2 o 31-170 en SEQ ID NO:4, o tal y como es codificado por un ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809; o (c) la secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular soluble de un polipéptido de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 31 a 283 en SEQ ID Nos: 2 o 31 a 166 en SEQ ID NO:4, o tal y como es codificado por el clón de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809.

Otros polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos que tienen una similitud de al menos 95% y aún más preferentemente una similitud de al menos 96%, 97%, 98% o 99% con los descritos anteriormente. Los polipéptidos de la invención también comprenden aquellos que son idénticos en al menos 95%, aún más preferentemente al menos 96%, 97%, 98% o 99% al polipéptido codificado por el ADNc depositado o al polipéptido de SEQ ID NOS: 2 o 4, y también se incluyen porciones de tales polipéptidos con al menos 30 aminoácidos y más preferentemente con al menos 50 aminoácidos.

Por “% de similitud” entre dos polipéptidos se entiende una puntuación de la similitud obtenida al comparar las secuencias de aminoácidos de los dos polipéptidos empleando el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) y el ajuste por defecto para determinar la similitud. Bestfit emplea el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Advances in Applied Mathematics* 2:482-489, 1981) para encontrar el segmento con la mejor similitud entre dos secuencias.

Un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos, por ejemplo, una “identidad” del 95% con una secuencia de aminoácidos de referencia de un polipéptido de TNFR, significa que la secuencia de aminoácidos del polipéptido es idéntica a la secuencia de referencia, exceptuando que la secuencia de polipéptidos puede incluir hasta 5 alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia del polipéptido de TNFR. Con otras palabras, para obtener un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 95% con una secuencia de aminoácidos de referencia, se puede delecionar o sustituir por otro aminoácido hasta un 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia, o un número de aminoácidos hasta el 5% del número total de residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia, se puede insertar en la secuencia de referencia. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden tener lugar en las posiciones del amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier otro lugar entre las posiciones terminales, intercalados de forma individual entre los residuos en la secuencia de referencia o en uno o en varios grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

De forma práctica, el que cualquier polipéptido en particular sea idéntico en al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99% a, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NOS: 2 o 4, o a una secuencia de aminoácidos codificada por un clón de ADNc depositado, se puede determinar convencionalmente empleando programas informáticos conocidos, tales como el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Cuando se emplea el programa Bestfit o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia en particular es, por ejemplo, idéntica en 95% a una secuencia de referencia de acuerdo con la presente invención, los parámetros se determinan, por supuesto, de modo que el porcentaje de identidad se calcule sobre la longitud total de la secuencia de aminoácidos de referencia y se permitan las interrupciones en la homología de hasta 5% del número total de residuos de aminoácidos en la secuencia de referencia.

El polipéptido de la presente invención se podría utilizar como marcador del peso molecular en geles de SDS-PAGE o en columnas de filtración del gel con tamices moleculares empleando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 Tal y como se describe detalladamente más adelante, los polipéptidos de la presente invención también se pueden utilizar para obtener anticuerpos policlonales y monoclonales que son útiles en ensayos para detectar la expresión de la proteína TNFR, tal y como se describe a continuación, o como agonistas y antagonistas capaces de potenciar o de inhibir la función de la proteína de TNFR. Además, tales polipéptidos se pueden utilizar en el sistema de dos híbridos de levadura para “capturar” proteínas que se unen a la proteína de TNFR, que también son agonistas y antagonistas candidatos según la presente invención. El sistema de dos híbridos de levadura se describe en Fields y Song, *Nature* 340:245-246 (1989).

*Porciones portadoras de epítopos*

15 En otro aspecto, la invención proporciona un péptido o un polipéptido que comprende una porción portadora de epítopo de un polipéptido de la invención. El epítopo de esta porción de polipéptido es un epítopo inmunógeno o antigenólico de un polipéptido de la invención. Un “epítopo inmunógeno” se define como una parte de una proteína que produce una respuesta del anticuerpo, cuando la proteína completa es el inmunógeno. Por otro lado, una región de una molécula proteica a la que se puede unir un anticuerpo, se define con un “epítopo antigenólico”. El número de epítopos 20 inmunógenos de una proteína, generalmente es menor que el número de epítopos antigenólicos. Véase, por ejemplo, Geysen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002 (1983).

25 Tal y como se conoce para la selección de péptidos o polipéptidos portadores de un epítopo antigenólico (es decir, que contienen una región de una molécula de proteína a la que se puede unir un anticuerpo), se conoce bien en la técnica que péptidos sintéticos relativamente cortos que mimetizan parte de una secuencia proteica, son capaces de producir de forma rutinaria un antisero que reacciona con la proteína parcialmente mimetizada. Véase, por ejemplo, Sutcliffe, J. G., Shinnick, T.M. Green, N. y Learner, R.A. (1983) “Antibodies that react with predetermined sites on proteins”, *Science*, 219:660-666. Los péptidos capaces de producir sueros reactivos con la proteína representados frecuentemente en la secuencia primaria de una proteína, se pueden caracterizar por un conjunto de normas 30 químicas sencillas y no están confinados a regiones inmunodominantes de las proteínas intactas (es decir, epítopos inmunógenos) ni a extremos carboxilo o amino terminales. Los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos antigenólicos de la invención son por tanto útiles para obtener anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales, que se unen específicamente a un polipéptido de la invención. Véase, por ejemplo, Wilson y col., *Cell* 37:767-778 (1984) en 777.

35 Los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos antigenólicos de la invención contienen preferentemente una secuencia de al menos nueve y más preferentemente entre aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 aminoácidos contenidos dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención, seleccionados entre el grupo consistente en: desde Ala-31 hasta Thr-46, desde Phe-57 hasta Thr-117, desde Cys-132 hasta Thr-175, desde Gly-185 40 hasta Thr-194, desde Val-205 hasta Asp-217, desde Pro-239 hasta Leu-264 y desde Ala-283 hasta Pro 298 en SEQ ID NO:2; y desde Ala-31 hasta Thr-46, desde Phe-57 hasta Gln-80, desde Glu-86 hasta His-106, desde Thr-108 hasta Phe-119, desde His-129 hasta Val-138 y desde Gly-142 hasta Pro-166 en SEQ ID NO:4. Estos fragmentos polipeptídicos se han determinado para que sean portadores de los epítopos antigenólicos de los polipéptidos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ , respectivamente, mediante el análisis del índice de antigenicidad de Jameson-Wolf, tal y como se muestra en las 45 Figuras 4 y 5 a continuación.

50 Los péptidos y polipéptidos portadores de epítopos de la invención se pueden producir por cualquier medio convencional. Véase, p. ej., Houghten, R.A. (1985) “General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:5131-5135; este procedimiento de síntesis simultánea de péptidos múltiples (SMPS, del inglés “Simultaneous Multiple Peptide Synthesis”) se describe adicionalmente en la Patente de EE.UU. nº 4.631.211 de Houghten y col. (1986).

55 Los péptidos y los polipéptidos portadores de epítopos de la invención se emplean para inducir anticuerpos según métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sutcliffe y col., mencionado anteriormente; Wilson y col., mencionado anteriormente; Chow, M. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:910-914; y Bittle, F.J. y col., *J. Gen. Virol.* 66:2347-2354 (1985). Los péptidos inmunógenos portadores de epítopos de la invención, es decir, las partes de una proteína que producen una respuesta del anticuerpo cuando la proteína completa es el inmunógeno, se han identificado de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Véase, p. ej., Geysen y col., mencionado anteriormente. 60 Además, la Patente de EE.UU. nº 5.194.392 de Geysen (1990) describe un método general para detectar o determinar la secuencia de monómeros (aminoácidos u otros compuestos) que sea un equivalente topológico del epítopo (es decir, un “mimótopo”), el cual es complementario a un parátopo en particular (sitio de unión al antígeno) de un anticuerpo de interés. Más generalmente, la Patente de EE.UU. nº 4.433.092 de Geysen (1989) describe un método para detectar o determinar una secuencia de monómeros que es topográficamente equivalente a un ligando que es complementario 65 al sitio de unión del ligando de un receptor de interés particular. De forma similar, la Patente de EE.UU. nº 5.480.971 de Houghten, R.A. y col. (1996) sobre mezclas de oligopéptidos perialquilados, describe oligopéptidos perialquilados de alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> y conjuntos y bibliotecas de tales péptidos, así como métodos para usar tales conjuntos y bibliotecas de oligopéptidos para determinar la secuencia de un oligopéptido perialquilado que se une preferentemente a una

molécula aceptora de interés. Por lo tanto, los análogos no peptídicos de los péptidos portadores de epítopo de la invención, también se pueden preparar de forma rutinaria por estos métodos.

*Proteínas de fusión*

5 Tal y como podrá apreciar un experto en la técnica, los polipéptidos de TNFR de la presente invención y sus fragmentos portadores de epítopo, descritos anteriormente, se pueden combinar con partes del dominio constante de inmunoglobulinas (IgG) dando como resultado polipéptidos quimeras. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran una semi-vida *in vivo* incrementada. Esto se ha observado, p. ej., para proteínas quiméricas que  
10 consisten en los dos primeros dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera de inmunoglobulinas de mamífero (documento EP A 394.827; Traunecker y col., *Nature* 331:84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen una estructura dímera ligada a disulfuro debido a la parte de la IgG, pueden ser más eficaces para unirse y neutralizar otras moléculas que la proteína TNFR monomérica o el fragmento proteico aislado (Fountoulakis y col., *J. Biochem.* 270:3958-3964 (1995)).

15 *Anticuerpos*

Los anticuerpos específicos de la proteína TNFR para emplear en la presente invención, se pueden obtener contra las proteínas intactas de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  o contra un fragmento polipeptídico antigénico de las mismas, el cual  
20 se puede presentar con una proteína vehículo, tal como albúmina, a un sistema animal (tal como conejo o ratón) o, si es suficiente largo (al menos aproximadamente 25 aminoácidos) sin vehículo.

Tal y como se emplea en esta memoria, el término “anticuerpo” (Ab) o “anticuerpo monoclonal” (Mab), significa  
25 que incluye moléculas intactas así como fragmentos de anticuerpo (tales como por ejemplo, fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>) que son capaces de unirse específicamente a una proteína de TNFR. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> carecen de fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente en la circulación y pueden tener menos unión no específica al tejido que un anticuerpo intacto (Wahl y col., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)). Por lo tanto, se prefieren estos fragmentos.

30 Los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquiera de una variedad de métodos. Por ejemplo, las células que expresan la proteína de TNFR o un fragmento antigénico de la misma, se pueden administrar a un animal para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales. En un método preferido, se realiza una preparación de proteína del TNFR y se purifica para que esté sustancialmente exenta de contaminantes naturales. Una preparación tal se introduce a continuación en un animal para producir antisueros policlonales con una  
35 actividad específica superior.

En el método más preferido, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales. Tales anticuerpos monoclonales se pueden preparar empleando tecnología de hibridomas (Köhler y col., *Nature* 256:495 (1975); Köhler y col., *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976); Köhler y col., *Eur. J. Immunol.* 6:292 (1976); Hammerling y col., en: 40 “Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas”, Elsevier, N.Y. (1981) págs. 563-681). En general, tales procedimientos implican la inmunización de un animal (preferentemente ratón) con un antígeno de la proteína de TNFR o, más preferentemente, con una célula que expresa la proteína de TNFR. Las células adecuadas se pueden reconocer por su capacidad para unirse al anticuerpo de la proteína anti-TNFR-6 $\alpha$  o anti-TNFR-6 $\beta$ . Tales células se pueden cultivar en cualquier medio de cultivo de tejidos adecuado; sin embargo, se prefiere el cultivo de células en medio Eagle modificado de Earle suplementado con suero de ternera fetal al 10% (inactivado a aproximadamente 56°C) y suplementado con aproximadamente 10 g/l de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 1000 U/ml de penicilina y aproximadamente 45 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina. Los esplenocitos de tales ratones se extraen y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Cualquier línea celular de mieloma adecuada se puede emplear de acuerdo con la presente invención; sin embargo, es preferible emplear la línea celular parental de mieloma (SP20), disponible en la American  
50 Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Después de la fusión, las células de hibridoma resultantes se mantienen selectivamente en medio HAT y a continuación se clonian limitando la dilución, tal y como describen Wands y col. (*Gastroenterology* 80:225-232 (1981)). Las células de hibridoma obtenidas con esta selección, se someten a ensayo a continuación para identificar los clones que secretan anticuerpos capaces de unirse al antígeno de TNFR deseado.

55 Alternativamente, los anticuerpos adicionales capaces de unirse al antígeno de TNFR, se pueden producir en un procedimiento en dos etapas, empleando anticuerpos anti-idiotípicos. Dicho método utiliza el hecho de que los anticuerpos son antígenos por si mismos y que, por tanto, es posible obtener un anticuerpo que se une a un segundo anticuerpo. De acuerdo con este método, los anticuerpos específicos de la proteína de TNFR se emplean para inmunizar un animal, preferentemente un ratón. Los esplenocitos de dicho animal se emplean a continuación para producir células de hibridoma y las células del hibridoma se someten a escrutinio para identificar los clones que producen un anticuerpo, cuya capacidad para unirse a un anticuerpo específico de la proteína de TNFR se pueda bloquear con el antígeno de la proteína de TNFR. Tales anticuerpos comprenden anticuerpos anti-idiotípicos para el anticuerpo específico de la proteína de TNFR y se pueden emplear para inmunizar un animal para inducir la formación de anticuerpos específicos de la proteína de TNFR adicionales.

60 65 Se apreciará que Fab y F(ab')<sub>2</sub> y otros fragmentos de los anticuerpos de la presente invención se pueden emplear según los métodos descritos en esta memoria. Tales fragmentos se producen típicamente por escisión proteolítica empleando enzimas tales como papáfina (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>).

Alternativamente, los fragmentos que se unen a la proteína TNFR se pueden producir mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante o mediante química sintética.

Para el uso *in vivo* de anti-TNFR en humanos, puede ser preferible emplear anticuerpos monoclonales químéricos

- 5 "humanizados". Tales anticuerpos se pueden producir empleando estructuras artificiales genéticas, obtenidas a partir de células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. Los métodos para producir anticuerpos químéricos son conocidos en la técnica. Véase, para una revisión, Morrison, *Science* 229:1202 (1985); Oi y col., *BioTechniques* 4:214 (1986); Cabilly y col., Patente de EE.UU. nº 4.816.567; Taniguchi y col., documento EP 171496; Morrison y col., documento EP 173494; Neuberger y col., documento WO 8601533; Robinson y col., documento WO 8702671; Boulian y col., *Nature* 312:643 (1984); Neuberger y col., *Nature* 314:268 (1985).
- 10

#### *Enfermedades relacionadas con el sistema inmune*

##### *Diagnosis*

- 15 Los presentes inventores han descubierto que TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  se expresan en tejidos hematopoyéticos y transformados. En una variedad de enfermedades relacionadas con el sistema inmune, se pueden detectar niveles sustancialmente alterados (incrementados o disminuidos) de expresión génica de TNFR, en el tejido del sistema inmune o en otras células o fluidos corporales (p. ej., suero y plasma), tomados de un individuo que tiene tal enfermedad, 20 en relación con un nivel "convencional" de expresión génica de TNFR, es decir, el nivel de expresión de TNFR en tejidos del sistema inmune o en fluidos corporales procedentes de un individuo que no tiene la enfermedad del sistema inmune. Por tanto, la invención proporciona un método de diagnóstico útil durante la diagnosis de una enfermedad del sistema inmune que implica medir el nivel de expresión del gen que codifica la proteína de TNFR en el tejido del sistema inmune o en otras células o en el fluido corporal de un individuo y comparar el nivel de expresión génica 25 medido con un nivel de expresión génica de TNFR convencional, siendo un incremento o una disminución del nivel de expresión génica, comparado con el convencional, indicativo de una enfermedad del sistema inmune.

En particular, se cree que ciertos tejidos de mamíferos con cáncer, expresan niveles significativamente reducidos de la proteína de TNFR y del ARNm que codifica el TNFR, cuando se comparan con un nivel "convencional" correspondiente. Además, se cree que estos niveles reducidos de la proteína de TNFR se pueden detectar en ciertos fluidos corporales (p. ej., suero y plasma) procedentes de mamíferos con dicho cáncer, cuando se comparan con el suero de mamíferos de la misma especie que no tienen cáncer.

Por lo tanto, la invención proporciona un método de diagnóstico *in vitro*, útil durante la diagnosis de una enfermedad del sistema inmune, que incluye cánceres lo cual implica medir el nivel de expresión de los genes que codifican la proteína de TNFR en el tejido del sistema inmune o en otras células o en fluidos corporales, procedentes de un individuo y comparar el nivel de expresión génica medido con un nivel de expresión génica de TNFR convencional, siendo un incremento o una disminución del nivel de expresión génica, comparado con el convencional, indicativo de una enfermedad del sistema inmune.

40 Cuando una diagnosis de una enfermedad en el sistema inmune que incluye la diagnosis de un tumor, se ha realizado de acuerdo con los métodos convencionales, la presente invención es útil como indicador del pronóstico, de modo que los pacientes que muestran una expresión génica desfavorecida, obtendrán un resultado clínico peor en comparación con pacientes que expresan el gen con un nivel cercano al nivel convencional.

45 "Someter a ensayo el nivel de expresión del gen que codifica una proteína de TNFR" significa medir de forma cualitativa o cuantitativa o estimar, el nivel de la proteína de TNFR-6 $\alpha$  y/o TNFR-6 $\beta$  o el nivel del ARNm que codifica la proteína de TNFR-6 $\alpha$  y/o TNFR-6 $\beta$  en una primera muestra biológica, tanto de forma directa (p. ej., determinando o estimando el nivel proteico absoluto o el nivel de ARNm) o relativa (p. ej., comparando el nivel proteico de TNFR 50 o el nivel de ARNm en una segunda muestra biológica). Preferentemente, el nivel proteico de TNFR o el nivel de ARNm en la primera muestra biológica se mide o se estima y se compara con un nivel proteico de TNFR o un nivel de ARNm convencional, tomándose el valor convencional a partir de una segunda muestra biológica obtenida a partir de un individuo que no tiene la enfermedad o determinándolo a través de niveles promedio de una población de individuos que no tienen una enfermedad del sistema inmune. Tal y como se apreciará en la técnica, una vez que se conocen los 55 niveles convencionales de proteína de TNFR o los niveles de ARNm, se pueden utilizar repetidamente como patrón para comparaciones.

Una "muestra biológica" significa cualquier muestra biológica obtenida a partir de un individuo, fluido corporal, línea celular, cultivo de tejidos u otras fuentes que contiene la proteína de TNFR o el ARNm. Tal y como se ha indicado, 60 las muestras biológicas incluyen fluidos corporales (tales como suero, plasma, orina, líquido sinovial y fluido espinal) que contienen un(os) dominio(s) extracelular(es) libre(s) (o forma(s) soluble(s)) de una proteína de TNFR, un tejido del sistema inmune y otras fuentes de tejidos que expresan un dominio completo o extracelular de un TNFR. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y fluidos corporales de mamíferos, son conocidos en la técnica. Cuando la muestra biológica incluye ARNm, la fuente preferida es una biopsia de tejido.

65 La invención también contempla el uso de un gen de la presente invención para la diagnosis de mutaciones en un gen de TNFR. Por ejemplo, si está presente una mutación en uno de los genes de la presente invención, se producirán estados debidos a una falta de producción de los polipéptidos del receptor de la presente invención. Además, las

mutaciones que favorecen la actividad del polipéptido del receptor, conducirán a enfermedades asociadas con una expresión en exceso del polipéptido del receptor, p. ej., choque endotóxico. Las mutaciones en los genes se pueden detectar comparando la secuencia del gen defectuoso con la del gen normal. A continuación, se puede verificar si un gen mutante está asociado con un estado de enfermedad o con la susceptibilidad de contraer un estado de enfermedad.

- 5 Es decir, un gen mutante que conduce a la expresión reducida de los polipéptidos del receptor de la presente invención estaría asociado con una incapacidad del TNF para inhibir el crecimiento tumoral.

Otras enfermedades del sistema inmune que se pueden diagnosticar con los ensayos anteriores incluyen la hipersensibilidad, la alergia, la enfermedad infecciosa, la enfermedad del injerto contra el hospedador, la inmunodeficiencia, 10 las enfermedades autoinmunes y similares.

En los individuos portadores de mutaciones en los genes de la presente invención, se pueden detectar las mutaciones a nivel de ADN por una variedad de técnicas. Los ácidos nucleicos empleados para la diagnosis se pueden obtener a partir de células de pacientes, tales como las de la sangre, la orina, la saliva y la biopsia de tejidos, entre otros tejidos. 15 El ADN genómico se puede utilizar directamente para la detección o se puede amplificar enzimáticamente empleando la PCR (Saiki y col., *Nature*, 324:163-166 (1986)) antes del análisis. El ARN o el ADNc también se puede utilizar con el mismo fin. A modo de ejemplo, los cebadores de la PCR complementarios al ácido nucleico de la presente invención, se pueden utilizar para identificar y analizar mutaciones en los genes humanos de la presente invención. Por ejemplo, delecciones e inserciones se pueden detectar por un cambio en el tamaño del producto amplificado, en 20 comparación con el genotipo normal. Las mutaciones puntuales se pueden identificar hibridando el ADN amplificado con ARN radiomarcado o, alternativamente, las secuencias de ADN complementarias radiomarcadas de la presente invención. Las secuencias perfectamente emparejadas se pueden distinguir de los dúplex desemparejados mediante digestión con ARNasa A o por diferencias en la temperatura de fusión. Un diagnóstico tal sería particularmente útil para los ensayos prenatales o incluso neonatales.

25 Las diferencias en la secuencia entre el gen de referencia y los "mutantes" se pueden revelar por el método de secuenciación directa del ADN. Además, los segmentos de ADN clonados se pueden utilizar como sondas para detectar segmentos específicos de ADN. La sensibilidad de este método mejora sustancialmente cuando se combina con la PCR. Por ejemplo, una secuenciación primaria empleada con un producto bicatenario de la PCR o una molécula monocatenaria molde, generada mediante un producto modificado de la PCR. La determinación de la secuencia se realiza por procedimientos convencionales con nucleótidos radiomarcados o con procedimientos de secuenciación automática con marcas fluorescentes.

30 Los cambios de la secuencia en las posiciones específicas se pueden revelar con los ensayos de protección contra nucleasas, tales como la protección contra ARNasa y S1 o el método de escisión química (por ejemplo, Cotton y col., *PNAS*, 85:4397-4401 (1985)).

35 El ensayo de los niveles de proteína de TNFR en una muestra biológica se puede realizar empleando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, la expresión de proteínas de TNFR en tejidos, se puede estudiar con métodos inmunohistológicos clásicos (Jalkanen, M., y col., *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., y col., *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos, útiles para detectar la expresión génica de TNFR, incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). Los marcadores adecuados para el ensayo del anticuerpo son conocidos en la técnica e incluyen marcadores enzimáticos, tales como la oxidasa de glucosa y los radioisótopos, tales como yodo (<sup>125</sup>I, <sup>121</sup>I), carbono (<sup>14</sup>C), azufre (<sup>35</sup>S), tritio (<sup>3</sup>H), indio (<sup>112</sup>In) y tecnecio (<sup>99m</sup>Tc) y marcadores fluorescentes, tales como la fluoresceína, la rodamina, y la biotina.

40 Además de someter a ensayo los niveles de proteína de TNFR en una muestra biológica obtenida a partir de un individuo, las proteínas de TNFR también se pueden detectar *in vivo* mediante la formación de imágenes. Los marcadores de anticuerpos o los marcadores para la formación de imágenes *in vivo* de las proteínas de TNFR, incluyen los que se pueden detectar por rayos X, RMN o ESR. Para los rayos X, los marcadores adecuados incluyen radioisótopos tales como bario o cesio que emiten una radiación detectable pero que no son manifiestamente nocivos para la persona. Los marcadores adecuados para la RMN y ESR incluyen aquellos con un espín característico detectable, tal como deuterio, que se puede incorporar en el anticuerpo mediante marcación de los nutrientes del hibridoma en 45 consideración.

45 Un anticuerpo específico de TNFR o un fragmento de anticuerpo que se ha marcado con un resto adecuado, detectable mediante la formación de imágenes, tal como un radioisótopo (por ejemplo, <sup>131</sup>I, <sup>112</sup>In, <sup>99m</sup>Tc) o una sustancia radio-opaca o un material detectable por resonancia magnética nuclear, se introduce (por ejemplo, por vía parenteral, subcutánea o intraperitoneal) en el mamífero en el que se va a examinar la enfermedad del sistema inmune. Se entenderá que el tamaño del individuo y el sistema de formación de imágenes empleado, determinarán la cantidad de restos de formación de imágenes que son necesarios para producir las imágenes del diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un ser humano, la cantidad de radiactividad inyectada estará normalmente en el intervalo desde aproximadamente 5 a 20 milicuries de <sup>99m</sup>Tc. El anticuerpo marcado o el fragmento de anticuerpo se acumulará 50 entonces preferentemente en el lugar donde se encuentran las células que contienen proteínas de TNFR. La formación de imágenes de un tumor *in vivo* está descrita por S.W. Burchiel y col., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" (capítulo 13 en "Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer", S.W. Burchiel y B.A. Rhodes, compiladores, Masson Publishing Inc. (1982)).

*Tratamiento*

Los ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) son conocidos por estar entre las citoquinas más pleyotrópicas, que inducen un gran número de respuestas celulares, incluyendo la citotoxicidad, la actividad antivírica, 5 las actividades immunorreguladoras y la regulación transcripcional de numerosos genes (Goeddel, D.V. y col., "Tumor Necrosis Factors: Gene Structure and Biological Activities", *Symp. Quant. Biol.* 51:597-609 (1986), Cold Spring Harbor; Beutler, B. y Cerami, A., *Annu. Rev. Biochem.* 57:505-518 (1988); Old, L.J., *Sci. Am.* 258:59-75 (1988); Fiers, W., *FEBS Lett.* 285:199-224 (1991)). Los ligandos de la familia de TNF inducen diversas respuestas celulares 10 al unirse a los receptores de la familia de TNF. Las células que expresan un polipéptido de TNFR y que tienen una respuesta celular potente frente a los ligandos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ , incluyen los linfocitos, las células endoteliales, los queratinocitos y el tejido de la próstata. Una "respuesta celular frente a un ligando de la familia de TNF" significa 15 cualquier cambio genotípico, fenotípico y/o morfológico de una célula, línea celular, tejido, cultivo de tejido o paciente, que se induce con un ligando de la familia de TNF. Tal y como se ha indicado, tales respuestas celulares incluyen no sólo las respuestas fisiológicas normales a los ligandos de la familia de TNF, sino también enfermedades asociadas con una apoptosis incrementada o la inhibición de la apoptosis.

Las enfermedades asociadas con una supervivencia incrementada de las células o la inhibición de la apoptosis, 20 incluyen los cánceres (tales como linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53 y tumores dependientes de hormonas, tales como el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el sarcoma de Kaposi y el cáncer de ovarios); las enfermedades autoinmunes (tales como lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide con glomerulonefritis 25 relacionada con el sistema inmune) y las infecciones víricas (tales como herpesvirus, poxvirus y adenovirus), la enfermedad del injerto contra el hospedador, el rechazo agudo de injertos y el rechazo crónico de injertos. Las enfermedades relacionadas con una apoptosis incrementada incluyen el SIDA; las enfermedades neurodegenerativas (tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la retinitis pigmentosa, 30 la degeneración cerebelar); los síndromes mielodisplásicos (tales como la anemia aplásica), las lesiones isquémicas (tales como las causadas por infarto de miocardio, ictus y lesión por reperfusión), la enfermedad hepática inducida por toxinas (tal como la causada por el alcohol), el choque séptico, la caquexia y la anorexia.

Por lo tanto, la presente invención describe un método para mejorar la apoptosis inducida por un ligando de la 35 familia de TNF que implica administrar a una célula que expresa el polipéptido de TNFR, una cantidad eficaz de polipéptido de TNFR, un análogo o un agonista capaz de incrementar la señal mediada por TNFR. Preferentemente, la señal mediada por TNFR se incrementa para tratar una enfermedad en la que se muestra una disminución de la apoptosis. El antagonista puede incluir formas solubles de TNFR y anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido de TNFR.

Por "agonista" se entienden compuestos presentes en la naturaleza y sintéticos capaces de mejorar o potenciar 40 la apoptosis. Por "antagonista" se entienden compuestos presentes en la naturaleza y sintéticos capaces de inhibir la apoptosis. El que cualquier candidato "agonista" o "antagonista" de la presente invención pueda potenciar o inhibir la apoptosis, se puede determinar empleando ensayos conocidos en la técnica de la respuesta celular del ligando/receptor de la familia de TNF, que incluyen los descritos con más detalle a continuación.

Un procedimiento de rastreo de este tipo, implica el uso de melanóforos que se transfecstan para expresar el receptor de la presente invención. Una técnica de rastreo de este tipo se describe en el documento PCT WO 92/01810, 45 publicado el 6 de Febrero de 1992. Un ensayo tal se puede emplear, por ejemplo, para rastrear un compuesto que inhibe (o potencia) la activación del polipéptido receptor de la presente invención, poniendo en contacto las células del melanóforo que codifican el receptor, con un ligando de la familia de TNF y el antagonista candidato (o agonista). La inhibición o la potenciación de la señal generada por el ligando, indica que el compuesto es un antagonista o un 50 agonista de la ruta de la señal del ligando/receptor.

Otras técnicas de rastreo incluyen el uso de células que expresan el receptor (por ejemplo, células CHO transfectadas) en un sistema que mide los cambios en el pH extracelular, causados por la activación del receptor, por ejemplo, tal y como se describe en *Science* 246:181-296 (Octubre de 1989). Por ejemplo, los compuestos se pueden poner en contacto con una célula que exprese el polipéptido del receptor de la presente invención y se puede medir una segunda respuesta del mensajero, p. ej., transducción de la señal o cambios del pH, para determinar si el compuesto potencial activa o inhibe al receptor.

Otra técnica de rastreo implica introducir ARN que codifica el receptor en oocitos de *Xenopus*, para expresar de forma transitoria el receptor. Los oocitos del receptor se pueden poner entonces en contacto con el ligando del receptor y un compuesto que se va a rastrear, seguido de la detección de la inhibición o la activación de una señal de calcio en el caso del rastreo de compuestos que se cree que inhiben la activación del receptor.

Otra técnica de rastreo implica expresar en células una estructura artificial en la que el receptor está ligado a una fosfolipasa C o D. Tales células incluyen células endoteliales, células del músculo liso, células de riñón embrionarias, etc. El rastreo se puede realizar tal y como se ha descrito anteriormente, detectando la activación del receptor o la 65 inhibición de la activación del receptor a partir de la señal fosfolipasa.

Otro método implica el rastreo en busca de compuestos que inhiben la activación del polipéptido del receptor de los antagonistas de la presente invención, determinando la inhibición de la unión del ligando marcado a las células que

tienen el receptor en su superficie. Un método tal implica transfectar una célula eucariota con ADN que codifica el receptor, de modo que la célula exprese el receptor en su superficie y poner en contacto la célula con un compuesto en presencia de una forma marcada de un ligando conocido. El ligando se puede marcar, p. ej., mediante radiactividad. La cantidad de ligando marcado unido a los receptores se mide, por ejemplo, midiendo la radiactividad de los receptores.

- 5 Si el compuesto se une al receptor, tal y como se determina por una reducción del ligando marcado que se une a los receptores, se inhibe la unión del ligando marcado al receptor.

Otros ensayos de rastreo de agonistas y antagonistas de la presente invención se describen en Tartaglia, L.A. y Goeddel, D.V., *J. Biol. Chem.* 267(7):4304-4307 (1992).

10 Por tanto, en un aspecto adicional, un método de rastreo se describe para determinar si un agonista o un antagonista candidato es capaz de potenciar o inhibir una respuesta celular frente a un ligando de la familia de TNF. El método implica poner en contacto células que expresan el polipéptido de TNFR con un compuesto candidato y un ligando de la familia de TNF, sometiendo a ensayo la respuesta celular, y comparando la respuesta celular con una respuesta celular convencional, sometiendo a ensayo la respuesta convencional cuando se pone en contacto con el ligando en ausencia del compuesto candidato, por lo que una respuesta celular incrementada frente a la convencional, indica que el compuesto candidato es un agonista de la vía de la señal ligando/receptor y una disminución de la respuesta celular comparada con la convencional, indica que el compuesto candidato es un antagonista de la vía de la señal ligando/receptor. "Someter a ensayo una respuesta celular" significa medir cualitativa o cuantitativamente una respuesta celular frente a un compuesto candidato y/o un ligando de la familia de TNF (p. ej., determinando o estimando un incremento o una disminución de la proliferación de linfocitos T o de la marcación de timidina tritiatada). A través de la invención, una célula que expresa el polipéptido de TNFR se puede poner en contacto con un ligando de la familia de TNF, administrado de forma endógena o exógena.

20 25 El agonista tal y como se describe en la presente invención incluye compuestos presentes en la naturaleza y compuestos sintéticos tales como, por ejemplo, fragmentos peptídicos del ligando de la familia de TNF; el factor de crecimiento transformante, neurotransmisores (tales como glutamato, dopamina, N-metil-D-aspartato), supresores tumorales (p53), linfocitos T citolíticos y antimetabolitos. Los agonistas preferidos incluyen fármacos quimioterapéuticos tales como, por ejemplo, cisplatina, dioxorubicina, bleomicina, arabinósido de citosina, mostaza nitrogenada, 30 metotrexato y vincristina. Otros incluyen etanol y péptido amiloide (*Science* 267:1457-1458 (1995)). Otros agonistas preferidos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales obtenidos contra el polipéptido de TNFR o un fragmento del mismo. Tales anticuerpos agonistas obtenidos contra un receptor de la familia de TNF se describen en Tartaglia, L.A. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9292-9296 (1991); y Tartaglia, L.A. y Goeddel, D.V., *J. Biol. Chem.* 267 (7):4304-4307 (1992). Véase también el documento de solicitud de patente PCT nº WO 94/09137.

35 40 Los antagonistas tal y como se describen en la presente invención incluyen compuestos presentes en la naturaleza y sintéticos, tales como, por ejemplo, el ligando de CD40, aminoácidos neutros, zinc, estrógeno, andrógenos, genes víricos (tales como *E1B* de Adenovirus, *p35* y *IAP* de Baculovirus, *crmA* del virus Cowpox, *BHRF1.LMP-1* del virus Epstein-Barr, *LMW5-HL* del virus de la fiebre porcina africana e *y 34.5* del Herpesvirus), inhibidores de calpaína, proteasa de cisteína y promotores tumorales (tales como PMA, fenobarbital y hexaclorociclohexano). Otros antagonistas incluyen anticuerpos antagonistas policlonales y monoclonales obtenidos contra los polipéptidos de TNFR o un fragmento de los mismos. Tales anticuerpos antagonistas obtenidos contra un receptor de la familia de TNF se describen en Tartaglia, L.A. y Goeddel, D.V., *J. Biol. Chem.* 267(7):4304-4307 (1992) y Tartaglia, L.A. y col., *Cell* 73:213-216 (1993). Véase también la Solicitud de Patente PCT WO 94/09137.

45 Otros antagonistas potenciales descritos en la presente invención incluyen moléculas complementarias. La tecnología complementaria se puede emplear para controlar la expresión génica mediante ADN o ARN complementario o la formación de una triple hélice. Las técnicas complementarias se describen, por ejemplo, en Okano, *J. Neurochem.* 56:560 (1991); "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression" CRC Press, Boca Raton, FL (1988). La formación de la triple hélice se describe, por ejemplo, en Lee y col., *Nucleic Acids Research* 6:3073 (1979); Cooney y col., *Science* 241:456 (1988); y Dervan y col., *Science* 251:1360 (1991). Los métodos se basan en la unión de un polinucleótido a un ADN o ARN complementario.

55 60 Por ejemplo, la porción 5' codificante de un polinucleótido que codifica el polipéptido maduro de la presente invención, se puede utilizar para diseñar un oligonucleótido de ARN complementario de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN se diseña para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción, evitando de este modo la transcripción y la producción del receptor. El oligonucleótido de ARN complementario se híbrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido receptor. Los oligonucleótidos descritos anteriormente también se pueden entregar a células de modo que el ARN o el ADN complementario se pueda expresar *in vivo* para inhibir la producción del receptor.

65 Otros antagonistas descritos en la presente invención incluyen formas solubles de TNFR, es decir, fragmentos de TNFR que incluyen el dominio de unión al ligando procedente de la región extracelular del receptor de longitud completa. Tales formas solubles del receptor, que pueden estar presentes en la naturaleza o ser sintéticas, son antagonistas de la señalización de TNFR, compitiendo con el TNFR de la superficie celular para unirse con los ligandos de la familia de TNF. Por lo tanto, las formas solubles del receptor que incluyen el dominio de unión al ligando son nuevas citoquinas capaces de inhibir la necrosis tumoral inducida por los ligandos de la familia de TNF. Otras citoquinas tales son conocidas en la técnica e incluyen Fas B (una forma soluble del receptor de Fas de ratón) que actúa fisiológicamente.

mente limitando la apoptosis inducida por el ligando de Fas (Hughes, D.P. y Crispe, I.N., *J. Exp. Med.* 182:1395-1401 (1995)).

Tal y como se ha indicado, los agonistas o antagonistas del anticuerpo policlonal o monoclonal de acuerdo con la presente invención, se pueden obtener de acuerdo con los métodos descritos por Tartaglia, L.A. y Goeddel, D.V., *J. Biol. Chem.* 267(7):4304-4307 (1992); Tartaglia, L.A. y col., *Cell* 73:213-216 (1993); y la Solicitud de Patente PCT WO 94/09137. El término “anticuerpo” (Ab) o “anticuerpo monoclonal” (mAb) tal y como se emplea en esta memoria, incluye moléculas intactas así como fragmentos de las mismas (tales como, por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub>) que son capaces de unirse a un antígeno. Los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> carecen del fragmento Fc del anticuerpo intacto, se aclaran más rápidamente de la circulación y pueden tener menos unión no específica al tejido, con un anticuerpo intacto (Wahl y col., *J. Nucl. Med.* 24:316-325 (1983)).

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden preparar según una variedad de métodos descritos anteriormente y conocidos en la técnica.

Las proteínas y otros compuestos que se unen a los dominios extracelulares también se describen como agonistas o antagonistas según la presente invención. Tales compuestos de unión se pueden “capturar” empleando el sistema de dos híbridos de la levadura (Fields y Song, *Nature* 340:245-246 (1989)). Una versión modificada del sistema de dos híbridos de la levadura ha sido descrito por Roger Brent y sus colaboradores (Gyuris, J. y col., *Cell* 75:791-803 (1993); Zervos, A.S. y col., *Cell* 72:223-232 (1993)).

Por “ligando de la familia de TNF” se entienden los ligandos presentes en la naturaleza, y recombinantes sintéticos que son capaces de unirse a un miembro de la familia de receptores de TNF e inducir la vía de la señal del ligando/receptor. Los miembros de la familia de ligandos de TNF incluyen, sin estar limitados a los mismos, los ligandos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , linfotoxina- $\alpha$  (LT- $\alpha$ , también conocida como TNF- $\beta$ , LT- $\beta$ , FasL, CD40, CD27, CD30, 4-IBB, OX40, TRAIL y el factor de crecimiento de los nervios (NGF).

Las aplicaciones terapéuticas representativas de la presente invención se describen con más detalle a continuación. El estado de inmunodeficiencia que define al SIDA es secundario a una disminución del número y de la función de los linfocitos T CD4 $^{+}$ . Estudios recientes estiman la pérdida diaria de linfocitos T CD4 $^{+}$  entre 3,5 x 10<sup>7</sup> y 2 x 10<sup>9</sup> células (Wei X., y col., *Nature* 373:117-122 (1995)). Una causa del agotamiento de los linfocitos T CD4 $^{+}$  al establecerse la infección con el VIH, se cree que es la apoptosis inducida por el VIH. Además, la muerte celular por apoptosis inducida por el VIH se ha mostrado no sólo *in vitro* sino también, con mayor importancia, en individuos infectados (Ameisen, J.C., *AIDS* 8:1197-1213 (1994); Finkel, T.H., y Banda, N.K., *Curr. Opin. Immunol.* 6:605-615 (1995); Muro-Cacho, C.A. y col., *J. Immunol.* 154:5555-5566 (1995)). Adicionalmente, la apoptosis y el agotamiento de los linfocitos T CD4 $^{+}$  están estrechamente relacionados en diferentes modelos animales del SIDA (Brunner, T., y col., *Nature* 373:441-444 (1995); Gougeon, M.L. y col., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9:553-563 (1993)) y, la apoptosis no se observa en los modelos animales en los que la replicación vírica no da como resultado el SIDA (Gougeon, M.L. y col., *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 9:553-563 (1993)). Los datos adicionales indican que los linfocitos T no infectados pero sensibilizados o activados, procedentes de individuos infectados con el VIH, sufren apoptosis después de encontrarse con el ligando de la familia de TNF, FasL. Empleando líneas celulares monocíticas que producen la muerte después de la infección con VIH, se ha mostrado que la infección de las células U937 con VIH da como resultado la expresión de nuevo de FasL y que FasL media en la apoptosis inducida por VIH (Badley, A.D. y col., *J. Virol.* 70:199-206 (1996)). Además, el ligando de la familia de TNF era detectable en macrófagos no infectados y su expresión aumentaba después de la infección con VIH, dando como resultado la destrucción selectiva de los linfocitos T CD4 no infectados (Badley, A.D., y col., *J. Virol.* 70:199-206 (1996)). Por lo tanto, se proporciona con la invención un método para tratar individuos VIH $^{+}$  que implica administrar un antagonista de la presente invención para reducir la destrucción selectiva de los linfocitos T CD4. Los modos de administración y las dosificaciones se exponen con más detalle a continuación.

En el rechazo de un aloinjerto, el sistema inmune del animal receptor no se ha sensibilizado previamente para responder, porque el sistema inmune para la mayor parte sólo se sensibiliza con los antígenos del entorno. Los tejidos procedentes de otros miembros de la misma especie no se han presentado del mismo modo que como se han presentado por ejemplo, los virus y las bacterias. En el caso de rechazo de un aloinjerto, los regímenes de inmunosupresión se diseñan para evitar que el sistema inmune alcance el estado efector. Sin embargo, el perfil inmune del rechazo de xenoinjertos se puede parecer más a una recaída en la enfermedad más que a un rechazo de aloinjerto. En el caso de una recaída en la enfermedad, el sistema inmune ya se ha activado, tal y como se observa por la destrucción de las células de los islotes naturales. Por lo tanto, en la recaída de una enfermedad el sistema inmune ya está en estado efector. Un agonista de la presente invención es capaz de suprimir la respuesta inmune frente a los aloinjertos y los xenoinjertos porque los linfocitos activados y diferenciados en células efectoras, expresarán el polipéptido de TNFR y, de este modo, son susceptibles a los compuestos que mejoran la actividad del TNFR. Por tanto, la presente invención describe adicionalmente un método para crear tejidos inmunes privilegiados. Un antagonista de la invención se describe como utilizable en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria de Bowel.

#### 65 Formulaciones

La composición del polipéptido de TNFR se formulará y se dosificará en una forma compatible con la práctica médica adecuada, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual (especialmente los efectos secundarios

del tratamiento con el polipéptido de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  aislado), el sitio de administración de la composición del polipéptido de TNFR, el método de administración, el esquema de administración y otros factores conocidos en la práctica. La "cantidad eficaz" de polipéptido de TNFR para los fines de esta memoria, se determina por tanto según dichas consideraciones.

5 A modo de propuesta general, la cantidad total farmacéuticamente eficaz del polipéptido de TNFR administrada por vía parenteral por dosis, estará en el intervalo de aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  hasta 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  de peso corporal del paciente, aunque, tal y como se ha indicado anteriormente, esto se someterá a discreción terapéutica. Más preferentemente, esta dosis es de al menos 0,01  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  y lo más preferible para humanos entre aproximadamente 10 0,01 y 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  para la hormona. Si se suministra continuamente, el polipéptido de TNFR se administra típicamente con una tasa de dosis de aproximadamente 1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hora}$  hasta aproximadamente 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{hora}$ , con 1-4 inyecciones al día o con infusiones subcutáneas continuas, por ejemplo, empleando una mini-bomba o también se puede emplear una solución en bolsa intravenosa. La duración del tratamiento necesario para observar cambios y el tratamiento siguiente en intervalos, para que tengan lugar las respuestas, parece variar dependiendo del efecto deseado.

15 10 Las composiciones farmacéuticas que contienen el TNFR de la invención se pueden administrar por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (tal como con polvos, pomadas, gotas o parche transdérmico) bucal, o como una pulverización oral o nasal. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una 20 carga sólida, semisólida o líquida no tóxica, diluyente, material encapsulado o una formulación auxiliar de cualquier tipo. El término "parenteral" tal y como se emplea en esta memoria se refiere a modos de administración que incluyen la inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea e intraarticular y la infusión.

25 30 El polipéptido de TNFR también se administra de forma adecuada mediante sistemas de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos con forma; p. ej.,, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen poliacetidas (documento de patente de EE.UU. nº 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gama-etil-L-glutamato (Sidman, U. y col., *Biopolymers* 22:547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (R. Langer y col., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 (1981) y R. Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105 (1982)), vinilacetato de etileno (R. Langer y col., Id.) o poli(ácido D-(-)3-hidroxibutírico) (documento EP 133.988). Las composiciones de polipéptido de TNFR de liberación sostenida también incluyen polipéptidos de TNFR inmovilizados en un liposoma. Los liposomas que contienen los polipéptidos de TNFR se preparan por métodos conocidos por sí mismos: documento DE 3.218.121; Epstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030-4034 (1980); documento EP 52.322; documento EP 36.676; documento EP 88.046; documento EP 143.949; documento EP 142.641; Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patentes de EE.UU. N°s 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. De forma ordinaria, los liposomas son de tipo unilamellar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstroms) en los que el contenido en líquido es superior a aproximadamente 30 mol. porcentaje de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia óptima con el polipéptido de TNFR.

40 45 Para la administración por vía parenteral, en una realización, el polipéptido de TNFR se formula generalmente mezclándolo con el grado deseado de pureza, en una forma inyectable de dosificación unitaria (solución, suspensión o emulsión) con un vehículo farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que no sea tóxico para los receptores en las dosificaciones y las concentraciones empleadas y que sea compatible con otros ingredientes de la formulación. Por ejemplo, la formulación no incluye preferentemente agentes oxidantes y otros compuestos que sean conocidos por ser perjudiciales para los polipéptidos.

50 55 Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo en contacto el polipéptido de TNFR de forma uniforme e íntima con vehículos líquidos o sólidos finamente divididos, o ambos. A continuación, si es necesario, el producto toma la forma de la formulación deseada. Preferentemente, el vehículo es un vehículo parenteral, más preferentemente una solución que es isotónica con la sangre del receptor. Ejemplos de tales vehículos portadores incluyen el agua, la solución salina, la solución de Ringer y la solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como aceites fijados y oleato de etilo, también son útiles en esta memoria, así como los liposomas.

60 65 El vehículo adecuado contiene cantidades menores de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), p. ej., poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcar-alcoholes tales como manitol o sorbitol; iones contrarios tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxameros o PEG.

70 75 El polipéptido de TNFR se formula típicamente en tales vehículos con una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml hasta 100 mg/ml, preferentemente, 1-10 mg/ml, a un pH de aproximadamente 3 a 8. Se entenderá que con el uso de algunos de los anteriores excipientes, vehículos o estabilizantes, se formarán sales de polipéptidos de TNFR.

80 Los polipéptidos de TNFR que se van a emplear para la administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración a través de unas membranas de filtración estériles (p. ej., membranas

de 0,2 micras). Las composiciones de polipéptido de TNFR terapéuticas se colocan generalmente en un recipiente que tiene una lumbreña de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o frasco para solución intravenosa que tenga una pieza de cierre perforable mediante una aguja para inyección hipodérmica.

5 Los polipéptidos de TNFR se almacenarán generalmente en un recipiente para una dosis o multidosis, por ejemplo, ampollas selladas o frascos, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para reconstitución. A modo de ejemplo de formulación liofilizada, los frascos de 10 ml se llenan con 5 ml de solución acuosa al 1% (p/v) filtrada de forma estéril del polipéptido de TNFR y la mezcla resultante se liofiliza. La solución de la infusión se prepara mediante reconstitución del polipéptido de TNFR liofilizado empleando agua-para-inyección bacteriostática.

10 La invención también proporciona un paquete o equipo de reactivos farmacéuticos que comprenden uno o varios recipientes llenados con uno o varios de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Junto con dicho recipiente puede haber una nota en la forma prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o productos biológicos, reflejando dicha nota que la agencia ha aprobado 15 la fabricación, el uso o la venta para la administración en seres humanos. Además, los polipéptidos de la presente invención se pueden emplear junto con otros compuestos terapéuticos.

#### *Ensayos en cromosomas*

20 Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también son adecuadas para la identificación de cromosomas. La secuencia se convierte específicamente en diana y puede hibridarse con una posición particular sobre un cromosoma humano individual. Además, actualmente es necesario identificar sitios particulares sobre el cromosoma. Pocos reactivos marcadores de cromosomas que se basen en los datos de la secuencia real (polimorfismos repetidos) 25 están disponibles actualmente para marcar la posición en el cromosoma. El cartografiado de los ADN en cromosomas según la presente invención, es una primera etapa importante en la correlación de las secuencias con genes asociados con la enfermedad.

En ciertas realizaciones preferidas a respecto, los ADNc descritos en esta memoria se emplean para clonar ADN genómico de un gen de la proteína de TNFR. Esto se puede realizar empleando una variedad de técnicas bien conocidas 30 y de genotecas que están generalmente a disposición comercial. El ADN genómico se emplea a continuación para el cartografiado *in situ* del cromosoma, empleando técnicas bien conocidas para este fin.

Además, en algunos casos, las secuencias se pueden cartografiar en cromosomas preparando cebadores para la 35 PCR (preferentemente 15-25 pb) procedentes del ADNc. El análisis informático de la región 3' no traducida del gen, se emplea para seleccionar rápidamente los cebadores que no abarcan más de un exón en el ADN genómico, complicando de este modo el proceso de amplificación. Estos cebadores se emplean a continuación para el escrutinio con la PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. La hibridación *in situ* con fluorescencia ("FISH") de un clon de ADNc con una extensión cromosómica en metafase, se puede utilizar para 40 proporcionar una posición cromosómica precisa en una etapa. Esta técnica se puede utilizar con sondas procedentes del ADNc que tengan una longitud tan corta como 50 o 60 pb. Para una revisión de esta técnica, véase Verma y col., "Human Chromosomes: A Manual Of Basic Techniques", Pergamon Press, Nueva York (1988).

Una vez que se ha cartografiado la secuencia en una posición precisa del cromosoma, la posición física de la secuencia sobre el cromosoma se puede correlacionar con datos del mapa genético. Tales datos se encuentran, por 45 ejemplo, en V. McKusick, "Mendelian Inheritance In Man", disponible en línea a través de la Universidad Johns Hopkins, Biblioteca Médica Welch. La relación entre los genes y las enfermedades que se han cartografiado en la misma región cromosómica, se identifican a continuación a través de un análisis del enlace (herencia conjunta de los genes físicamente adyacentes).

50 Después, es necesario determinar las diferencias en el ADNc o la secuencia genómica entre los individuos afectados y no afectados. Si se observa una mutación en alguno o en todos los individuos afectados, pero no se observa en ninguno de los individuos normales, entonces la mutación debe ser probablemente el agente causante de la enfermedad.

55 Habiendo descrito en general la invención, se describirá lo mismo haciendo referencia a los siguientes Ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes.

#### **Ejemplos**

##### 60 Ejemplo 1

###### *Expresión y purificación de TNFR-6α y TNFR-6β en *E. coli**

El vector de expresión bacteriana pQE60 se emplea para la expresión bacteriana en este Ejemplo (QIAGEN, Inc. 65 9259 Elton Avenue, Chatsworth, CA, 91311). pQE60 codifica la resistencia al antibiótico ampicilina ("Ampr") y contiene un origen bacteriano de replicación ("ori"), un promotor inducible con IPTG, un sitio de unión al ribosoma ("RBS"), seis codones que codifican residuos de histidina que permiten la purificación por afinidad empleando una resina de afinidad ácido nitrilo-triacético de níquel ("Ni-NTA") vendida por QIAGEN Inc., mencionado anteriormente,

5 y sitios adecuados para escisión con enzimas de restricción aisladas. Estos elementos se disponen de modo que un fragmento de ADN que codifica un polipéptido se pueda insertar de modo que se produzca ese polipéptido con los seis residuos de histidina (es decir, "6 X marcas de His") unidas covalentemente al extremo carboxilo-terminal de ese polipéptido. Sin embargo, en este ejemplo, la secuencia codificadora del polipéptido se inserta de modo que se evite la traducción de los seis codones de His y, por tanto, el polipéptido se produce sin las 6 X marcas de His.

10 Las secuencias de ADN que codifican las porciones deseadas de las proteínas de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  que comprenden las formas maduras de las secuencias de aminoácidos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ , se amplifican a partir de los clones de ADNc depositados, empleando cebadores de oligonucleótidos de la PCR que se reasocian con las secuencias aminoterminales de las porciones deseadas de las proteínas de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  y con las secuencias en las estructuras artificiales depositadas, 3' de la secuencia codificadora del ADNc. Nucleótidos adicionales que contienen los sitios de restricción para facilitar la clonación en el vector pQE60, se añaden a las secuencias 5' y 3', respectivamente.

15 Para clonar la forma madura de la proteína TNFR-6 $\alpha$ , el cebador 5' tiene la secuencia 5' CGCCCATGGCAGAAA CACCCACCTAC 3' (SEQ ID NO:19) que contiene el sitio de restricción de NcoI subrayado. Un experto en la técnica apreciará, por supuesto, que el punto en la secuencia codificadora de la proteína en donde comienza el cebador 5', se puede variar para amplificar una porción deseada de la proteína completa, de longitud mayor o menor que la forma madura. El cebador 3' tiene la secuencia 5' CGCAAGCTTCTCTTCAGTGCAAGTG 3' (SEQ ID NO:20) que contiene el sitio de restricción de HindIII subrayado. Para clonar la forma madura de la proteína 20 TNFR-6 $\beta$ , el cebador 5' tiene la secuencia de SEQ ID NO:19 anterior y el cebador 3' tiene la secuencia 5' CGCAAGCTTCTCAGCTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO:21) que contiene el sitio de restricción de HindIII subrayado.

25 Los fragmentos de ADN de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  amplificados y el vector pQE60 se digieren con NcoI y HindIII y los ADNs digeridos se ligan a continuación entre sí. La inserción del ADN de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  en los puntos del vector pQE60 restringido, coloca la región codificadora de la proteína TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  que incluye su codón de detención asociado, aguas abajo del promotor inducible con IPTG y en marco con un AUG de iniciación. El codón de detención asociado evita la traducción de los seis codones de histidina aguas abajo del punto de inserción.

30 La mezcla de ligación se transforma en células de *E. coli* competentes, empleando procedimientos convencionales, tales como los descritos por Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2<sup>a</sup> ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). La cepa de *E. coli* M15/rep4 que contiene copias múltiples del plásmido pREP4, que expresa el represor lac y que confiere la resistencia a la kanamicina ("Kanr"), se emplea para realizar el ejemplo ilustrativo, descrito en esta memoria. Esta cepa, que sólo es una de las muchas que están disponibles 35 para expresar la proteína de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$ , está disponible comercialmente en QIAGEN, Inc., mencionado anteriormente. Los transformantes se identifican por su capacidad de crecer en placas de LB, en presencia de ampicilina y kanamicina. El ADN plasmídico se aísla a partir de las colonias restantes y la identidad del ADN clonado se confirma con análisis de restricción, PCR y secuenciación del ADN.

40 Los clones que contienen las estructuras artificiales deseadas se dejan crecer durante una noche ("O/N") en cultivo líquido en medio LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y kanamicina (25  $\mu$ g/ml). El cultivo O/N se emplea para inocular un cultivo mayor, con una dilución de aproximadamente 1:25 hasta 1:250. Las células se dejan crecer hasta obtener una densidad óptica a 600 nm ("DO<sub>600</sub>") entre 0,4 y 0,6. A continuación se añade isopropil-b-D-tiogalactopiranosido ("IPTG") hasta tener una concentración final de 1 mM para inducir la transcripción desde el promotor sensible 45 al represor lac, inactivando el represor lacI. Las células se incuban posteriormente durante 3 o 4 horas adicionales. A continuación las células se recogen por centrifugación.

50 Para purificar el polipéptido de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ , las células se agitan después durante 3-4 horas a 4°C en guanidina-HCl 6 M, pH 8. Los residuos celulares se retiran por centrifugación y el material sobrenadante que contiene el TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  se dializa frente a tampón Na-acetato 50 mM, pH 6, suplementado con NaCl 200 mM. Alternativamente, la proteína se puede replegar con éxito, dializándola de nuevo frente a NaCl 500 mM, 20% de glicerol, Tris/HCl 25 mM pH 7,4, que contiene inhibidores de la proteasa. Después de renaturalizar la proteína, se puede purificar mediante cromatografía de intercambio iónico, de interacción hidrófoba y de exclusión por tamaño. Alternativamente, se puede utilizar una etapa de la cromatografía de afinidad, tal como una columna con anticuerpo 55 para obtener la proteína TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  pura. La proteína purificada se almacena a 4°C o se congela a -80°C.

60 El siguiente método alternativo se puede utilizar para purificar TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  expresada en *E. coli*, cuando está presente en forma de cuerpos de inclusión. A no ser que se indique de otro modo, todas las etapas siguientes se realizan de 4-10°C.

65 Después de completar la fase de producción de la fermentación en *E. coli*, el cultivo celular se enfriá a 4-10°C y las células se recogen mediante centrifugación continua a 15.000 rpm (Heraeus Sepatech). Basándose en el rendimiento esperado de proteína por unidad de peso de la pasta celular y la cantidad de proteína purificada necesaria, se suspende una cantidad adecuada de la pasta celular, en peso, en una solución tampón que contiene Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4. Las células se dispersan en una suspensión homogénea empleando un mezclador por cizallado superior.

Las células se lisaron a continuación haciendo pasar la solución a través de un microfluidizador (Microfluidics, Corp. o APV Gaulin, Inc.) dos veces a 4000-6000 psi. El material homogeneizado se mezcla a continuación con

solución de NaCl hasta tener una concentración final de NaCl 0,5 M, seguido de centrifugación a 7000 x g durante 15 minutos. El sedimento resultante se lavó de nuevo empleando NaCl 0,5 M, Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4.

5 Los cuerpos de inclusión resultantes lavados se solubilizan con hidrocloruro de guanidina 1,5 M (GuHCl) durante 2-4 horas. Después de una centrifugación a 7000 x g, durante 15 minutos, se retiró el sedimento y el material sobrenadante que contenía el polipéptido de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  se incubó a 4°C durante una noche para permitir la extracción posterior del GuHCl.

10 10 Después de una centrifugación a alta velocidad (30.000 x g) para retirar las partículas insolubles, la proteína solubilizada de GuHCl se repliega mezclando rápidamente el extracto de GuHCl con 20 volúmenes de tampón que contiene sodio 50 mM, pH 4,5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, mediante agitación vigorosa. La solución con la proteína diluida y replegada, se mantiene a 4°C sin mezclar durante 12 horas antes de las etapas de purificación posteriores.

15 15 Para aclarar la solución de polipéptido del receptor de TNF replegado, se emplea una unidad de filtración tangencial preparada previamente, equipada con un filtro de membrana de 0,16  $\mu$ m con una superficie adecuada (p. ej., Filtron), equilibrado con acetato sódico 40 mM, pH 6,0. La muestra filtrada se carga sobre una resina de intercambio catiónico (p. ej., Poros HS-50, Perseptive Biosystems). La columna se lava con acetato sódico 40 mM, pH 6,0 y se eluye con NaCl 250 mM, 500 mM, 1000 mM y 1500 mM en el mismo tampón, por etapas. La absorbancia a 280 nm del efluente se vigila continuamente. Se recogen las fracciones y se analizan adicionalmente con SDS-PAGE.

20 20 Las fracciones que contienen el polipéptido del receptor de TNF se reúnen a continuación y se mezclan con 4 volúmenes de agua. La muestra diluida se carga a continuación sobre un equipo, preparado previamente, de columnas en tandem de resinas de intercambio aniónico fuerte (Poros, HQ-50, Perseptive Biosystems) y aniónico débil (Poros CM-20, Perseptive Biosystems). Las columnas se equilibran con acetato sódico 40 mM, pH 6,0. Ambas columnas se lavan con acetato sódico 40 mM, pH 6,0, NaCl 200 mM. La columna CM-20 se eluye a continuación empleando un gradiente lineal de volumen en 10 columnas, en el intervalo desde NaCl 0,2 M, acetato sódico 50 mM, pH 6,0 hasta NaCl 1,0 M, acetato sódico 50 mM, pH 6,5. Las fracciones se recogen bajo vigilancia continua de la A<sub>280</sub> del efluente. Las fracciones que contienen el polipéptido de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  (determinado, por ejemplo, mediante SDS-PAGE al 16%) se reúnen a continuación.

30 30 El polipéptido del receptor de TNF resultante, muestra una pureza superior al 95% después de las etapas anteriores de replegamiento y purificación. No se observan bandas contaminantes importantes en el gel de SDS-PAGE al 16% teñido con azul de Coomassie, cuando se cargan 5  $\mu$ g de la proteína purificada. La proteína purificada también se somete a ensayo en busca de contaminación con endotoxina/LPS, y típicamente, el contenido en LPS es menor de 0,1 ng/ml según los ensayos de LAL.

## Ejemplo 2

### *Clonación y expresión de las proteínas de TNFR-6 $\alpha$ y TNFR-6 $\beta$ en un sistema de expresión de Baculovirus*

40 En este Ejemplo ilustrativo, el vector transportador plasmídico pA2 se emplea para insertar el ADN clonado que codifica la proteína completa, incluyendo su secuencia señal secretora asociada (líder), en un baculovirus para expresar la proteína madura de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  empleando métodos convencionales, tales como los descritos por Summers y col., "A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures", Texas Agricultural Experimental Station Bulletin nº 1555 (1987). Este vector de expresión contiene el promotor fuerte de la polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV) seguido de sitios de restricción convenientes, tales como BamHI, XbaI y Asp718. El sitio de poliadenilación del virus de simio 40 ("SV40") se emplea para la poliadenilación correcta. Para poder seleccionar más fácilmente el virus recombinante, el plásmido contiene el gen de la beta-galactosidasa de *E. coli* bajo control de un promotor débil de la Drosófila, en la misma orientación, seguido de la señal de poliadenilación del gen de polihedrina. Los genes insertados están flanqueados en ambos lados por secuencias víricas para la recombinación homóloga mediada por células, con ADN vírico de tipo silvestre, para generar un virus viable que exprese el polinucleótido clonado.

55 Muchos otros vectores de baculovirus se podrían utilizar en lugar del vector anterior, tales como pAc373, pVL941 y pAcIM1, tal y como apreciará un experto en la técnica, mientras que la estructura artificial proporcione señales localizadas adecuadamente para la transcripción, traducción, secreción y similares, incluyendo un péptido señal y un AUG en marco, tal y como se requiere. Tales vectores se describen, por ejemplo, en Luckow y col., *Virology* 170:31-39 (1989).

60 60 La secuencia de ADNc que codifica la proteína de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  de longitud completa en un clon depositado, que incluye el codón de iniciación AUG y la secuencia líder asociada de forma natural, mostrada en SEQ ID NOs: 2 o 4, se amplifica empleando cebadores oligonucleótidos de la PCR que se corresponden con las secuencias 5' y 3' del gen. El cebador 5' para TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  tiene la secuencia: 5' CGCGGATCCGCCATCATGAGGGCGTGGAG GGGCCAG 3' (SEQ ID NO:22) que contiene el sitio de restricción de la enzima BamHI subrayado. Todos los cebadores descritos anteriormente codifican una señal eficaz para la iniciación de la traducción en las células eucariotas, tal y como describen Kozak, M., *J. Mol. Biol.* 196:947-950 (1987). El cebador 3' para TNFR-6 $\alpha$  tiene la secuencia:

## ES 2 286 843 T3

5' CGCGGTACCCTTTCAAGTG 3' (SEQ ID NO:23) que contiene el sitio de restricción de Asp718 subrayado. El cebador 3' para TNFR-6 $\beta$  tiene la secuencia 5' CGCGGTACCCTCAGCTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO:24) que contiene el sitio de restricción de Asp718 subrayado.

- 5 El fragmento amplificado se aísla a partir de un gel de agarosa al 1%, empleando un equipo de reactivos disponible comercialmente (“Geneclean”, BIO 101 Inc. La Jolla, CA). El fragmento se digiere a continuación con una enzima de restricción adecuada para cada uno de los cebadores empleados, tal y como se ha descrito anteriormente, y se purifica de nuevo sobre un gel de agarosa al 1%.
- 10 El plásmido se digiere con las mismas enzimas de restricción y, opcionalmente, se puede desfosforilar empleando fosfatasa intestinal de ternera, empleando procedimientos rutinarios conocidos en la técnica. El ADN se aísla a continuación a partir del gel de agarosa al 1%, empleando un equipo de reactivos disponible comercialmente (“Geneclean”, BIO 101 Inc. La Jolla, CA).
- 15 El fragmento y el plásmido desfosforilado se ligan entre sí con la ligasa de ADN de T4. Las células hospedadoras de *E. coli* HB101 u otros hospedadores de *E. coli*, tales como XL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) se transforman con la mezcla de ligación y se extienden sobre placas de cultivo. Se identifican las bacterias que contienen el plásmido con el gen del receptor de TNF humano mediante digestión del ADN procedente de colonias individuales, empleando las enzimas empleadas justo antes y a continuación se analiza el producto de la digestión
- 20 mediante electroforesis del gel. La secuencia del fragmento clonado se confirma mediante secuenciación del ADN. Este plásmido se denomina en esta memoria pA2-TNFR-6 $\alpha$  o pA2 TNFR-6 $\beta$  (colectivamente, pA2-TNFR).

25 Cinco  $\mu$ g del plásmido pA2-TNFR se cotransfectan con 1,0  $\mu$ g de un ADN de baculovirus linealizado disponible comercialmente (ADN del virus “BaculoGold®”, Pharmingen, San Diego, CA) empleando el método de lipofección descrito por Felgner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 84:7413-7417 (1987). Un  $\mu$ g del ADN del virus “BaculoGold®”, y 5  $\mu$ g del plásmido pA2-TNFR se mezclan en un pocillo estéril de una placa de microtitulación que contiene 50  $\mu$ l de medio de Grace exento de suero (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). A continuación, se añaden 10  $\mu$ l de Lipofectina más 90  $\mu$ l de medio de Grace, se mezclan y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de la transfección se añade gota a gota a células de insecto Sf9 (ATCC CRL 1711) sembradas en una placa para cultivo de tejidos de 35 mm con 1 ml de medio Grace sin suero. La placa se incuba a continuación durante 5 horas a 27°C. La solución de la transfección se retira después de la placa y se añade 1 ml de medio de insecto de Grace suplementado con 10% de suero de ternera fetal. El cultivo continúa a 27°C durante cuatro días.

30 35 Despues de cuatro días, se recoge el material sobrenadante y se realiza un ensayo de placa, tal y como describen Summers y Smith, mencionado anteriormente. Un gel de agarosa con “Blue Gal” (Life Technologies Inc., Gaithersburg) se emplea para permitir una fácil identificación y aislamiento de los clones que expresan gal, lo que produce placas teñidas de azul. (Una descripción detallada de un “ensayo en placa” de este tipo, también se puede encontrar en la guía del usuario para cultivo de células de insecto y baculovirología, distribuida por Life Technologies Inc., Gaithersburg, páginas 9-10). Despues de una incubación adecuada, las placas teñidas de azul se recogen con la punta de la micropipeta (p. ej., Eppendorf). El agar que contiene los virus recombinantes se resuspende a continuación en un tubo de microcentrifuga que contiene 200  $\mu$ l de medio de Grace y la suspensión que contiene el baculovirus recombinante se emplea para infectar células Sf9, sembradas en placas de 35 mm. Cuatro días despues, se recoge el material sobrenadante de estas placas de cultivo y a continuación se almacenan a 4°C.

40 45 Para verificar la expresión del gen del receptor de TNF, se dejan crecer células Sf9 en medio Grace suplementado con 10% de FBS termoinactivado. Las células se infectan con el baculovirus recombinante con una multiplicidad de la infección (“MOI”) de aproximadamente 2. Si se desean proteínas radiomarcadas, se retira el medio 6 horas despues y se sustituye con medio SF900 II sin metionina ni cisteína (disponible en Life Technologies Inc., Rockville, MD). Despues de 42 horas, se añaden 5  $\mu$ Ci de  $^{35}$ S-metionina y 5  $\mu$ Ci de  $^{35}$ S-cisteína (disponibles en Amersham). Las células se incuban adicionalmente durante 16 horas y a continuación se recogen por centrifugación. Las proteínas en el material sobrenadante así como las proteínas intracelulares se analizan mediante SDS-PAGE, seguido de autoradiografía (si están radiomarcadas).

50 55 La microsecuenciación de la secuencia de aminoácidos del extremo amino terminal de la proteína purificada, se puede utilizar para determinar la secuencia amino terminal de la forma madura de la proteína del receptor de TNF.

### Ejemplo 3

#### Clonación y expresión de TNFR-6 $\alpha$ y TNFR-6 $\beta$ en células de mamífero

60 Un vector de expresión de mamífero típico contiene el elemento promotor, que media en la iniciación de la transcripción del ARNm, la secuencia codificadora de la proteína y las señales necesarias para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcripto. Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intercaladas flanqueadas con sitios donantes y aceptores para el corte y empalme del ARN. La transcripción de alta eficacia se puede conseguir con los promotores tempranos y tardíos de SV40, las repeticiones terminales largas (LTRs) de los retrovirus, p. ej., RSV, HTLV1, HIV1 y el promotor temprano de citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden emplear elementos celulares (p. ej., el promotor de la actina humana). Los vectores de expresión adecuados para uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG

## ES 2 286 843 T3

(Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109). Las células hospedadoras de mamífero que se podrían emplear incluyen las células Hela humanas, 293, H9 y Jurkat, las células de ratón NIH373 y C127, las células Cos 1, Cos 7 y CV1, las células QC1-3 de codorniz, las células L de ratón y las células de ovario de hámster chino (CHO).

5 Alternativamente, el gen se puede expresar en líneas celulares estables que contienen el gen integrado en un cromosoma. La cotransfección con un marcador seleccionable tal como dhfr, gpt, neomicina, higromicina, permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas.

10 El gen transfectado también se puede amplificar para expresar grandes cantidades de la proteína codificada. El marcador DHFR (reductasa de dihidrofolato) es útil para desarrollar líneas celulares que son portadoras de cientos o incluso de miles de copias del gen de interés. Otro marcador útil para la selección es la enzima sintetasa de glutamina (GS) (Murphy y col., *Biochem. J.* 227:279 (1991); Bebbington y col., *Bio/Technology* 10:169-175 (1992)). Empleando estos marcadores, las células de mamífero crecen en medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen el(s) gen(es) amplificado(s) integrado(s) en un cromosoma. Las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células NSO se emplean frecuentemente para la producción de proteínas.

15 Los vectores de expresión pC1 y pC4 contienen el promotor fuerte (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen y col., *Molecular and Cellular Biology*, 438-447 (marzo de 1985)) más un fragmento del potenciador de CMV (Boshart y col., *Cell* 41:521-530 (1985)). Los sitios de clonación múltiple, p. ej., con los sitios de corte de las enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen además el intrón 3', la señal de poliadenilación y de terminación del gen de la preproinsulina de rata.

### Ejemplo 3(a)

#### 25 Clonación y expresión en células COS

El plásmido de expresión pTNFR- $\alpha$ -HA y TNFR- $6\beta$ -HA, se prepara clonando de una porción del ADNc que codifica la forma madura de la proteína del receptor de TNF en el vector de expresión pcDNAI/Amp o pcDNAIII (que 30 se puede obtener en Invitrogen, Inc.).

35 El vector de expresión pcDNAI/amp contiene (1): un origen de replicación de *E. coli* eficaz para la propagación en *E. coli* y en otras células procariotas; (2) un gen de resistencia a la ampicilina para seleccionar las células procariotas que contienen el plásmido; (3) un origen de replicación de SV40 para la propagación en células eucariotas, (4) un promotor de CMV, un polienlazador, un intrón de SV40; (5) varios codones que codifican un fragmento de la hemoaglutinina (es decir, una marca "HA" para facilitar la purificación) seguida de un codón de terminación y una señal de poliadenilación dispuesta de modo que un ADNc se pueda colocar adecuadamente bajo el control de la expresión del promotor de CMV y ligado funcionalmente al intrón de SV40 y la señal de poliadenilación, mediante los sitios de restricción en el polienlazador. La marca HA se corresponde con un epítopo obtenido a partir de la proteína hemoaglutinina de la gripe, descrita por Wilson y col., *Cell* 37:767 (1984). La fusión de la marca HA con la proteína diana permite una fácil detección y recuperación de la proteína recombinante con un anticuerpo que reconoce el epítopo HA. El pcDNAIII contiene, además, el marcador seleccionable de la neomicina.

45 Un fragmento de ADN que codifica el polipéptido completo del receptor de TNF se clona en la región polienlazadora del vector, de modo que la expresión de la proteína recombinante esté dirigida por el promotor de CMV. La estrategia de construcción del plásmido es la siguiente. El ADNc del receptor de TNF de un clon depositado, se amplifica empleando cebadores que contienen los sitios de restricción convenientes, tal y como se ha descrito anteriormente, para la construcción de vectores para la expresión de un receptor de TNF en *E. coli*. Los cebadores adecuados pueden ser diseñados fácilmente por los expertos en la técnica.

50 El fragmento de ADN amplificado con PCR y el vector pcDNAI/Amp se digieren con XbaI y EcoRI y a continuación se ligan. La mezcla de ligación se transforma en la cepa de *E. coli* SURE (disponible en Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037) y el cultivo transformado se extiende en placas con medio con ampicilina, las cuales se incuban a continuación para permitir el crecimiento de las colonias resistentes a la ampicilina. El ADN plasmídico se aísla de las colonias resistentes y se examina por análisis de restricción u otros medios, en busca de la presencia del fragmento que codifica los polipéptidos de TNFR- $\alpha$  y TNFR- $6\beta$ .

60 Para la expresión de TNFR- $\alpha$  y TNFR- $6\beta$  recombinante, las células COS se transfectan con un vector de expresión, tal y como se ha descrito anteriormente, empleando DEAE-dextrano, tal y como se describe, por ejemplo en Sambrook y col., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Las células se incuban bajo condiciones que faciliten la expresión de TNFR en el vector.

65 La expresión de la proteína de fusión pTNFR- $\alpha$ -HA y pTNFR- $6\beta$ -HA se detecta por radiomarcación e inmunoprecipitación, empleando métodos descritos en, por ejemplo, Harlow y col., "Antibodies: A Laboratory Manual", 2A ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1988). Para ello, dos días después de la transfección, las células se marcan mediante incubación en medios que contienen  $^{35}$ S-cisteína, durante 8 horas. Las células y los medios se recogen, y las células se lavan y se lisán con tampón RIPA que contiene detergente: NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0,1% de SDS, 0,5% de DOC, Tris 50 mM, pH 7,5, tal y como describen Wilson y col., citado

# ES 2 286 843 T3

anteriormente. Las proteínas se precipitan a partir del material lisado celular y del medio de cultivo empleando un anticuerpo monoclonal específico de HA. Las proteínas precipitadas se analizan a continuación mediante SDS-PAGE y se autorradiografían. Un producto de expresión del tamaño deseado se observa en el material lisado celular, el cual no se observa en los testigos negativos.

5

## Ejemplo 3(b)

### *Clonación y expresión en células CHO*

10 El vector pC4 se emplea para la expresión de los polipéptidos de TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$ . El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (ATCC nº de orden 37146). El plásmido contiene el gen DHFR de ratón, bajo el control del promotor temprano de SV40. Las células de ovario de hámster chino u otras células que carecen de la actividad dihidrofolato, que están transfectadas con estos plásmidos, se pueden seleccionar dejando crecer las células en un medio selectivo (alfa-MEM, Life Technologies) suplementado con el agente quimioterapéutico metotrexato.

15 La amplificación de los genes de DHFR en células resistentes al metotrexato (MTX) está bien documentada (véase, p. ej., Alt, F.W., Kellems, R.M., Bertino, J.R. y Schimke, R.T., 1978, *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370, Hamlin, J.L. y Ma, C. 1990, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1097:107-143, Page, M.J. y Sydenham, M.A., 1991, *Biotechnology* 9:64-68). Las células que crecen en concentraciones crecientes de MTX, desarrollan una resistencia al fármaco mediante la producción en exceso de la enzima diana, DHFR, como resultado de la amplificación del gen de DHFR. Si se liga

20 un segundo gen al gen de DHFR, generalmente se coamplifica y se expresa en exceso. Se conoce en la técnica que este planteamiento se puede utilizar para desarrollar líneas celulares portadoras de más de 1000 copias del(de los) gen(es) amplificado(s). A continuación, cuando se retira el metotrexato, se obtienen líneas celulares que contienen el gen amplificado integrado en uno o en varios cromosomas de la célula hospedadora.

25 El plásmido pC4 contiene para expresar el gen de interés, el promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Roux (Cullen y col., "Molecular and Cellular Biology", Marzo de 1985; 438-447), más un fragmento aislado a partir del potenciador del gen temprano inmediato del citomegalovirus humano (CMV) (Boshart y col., *Cell* 41:521-530 (1985)). Aguas abajo del promotor están los siguientes sitios de corte aislados para enzimas de restricción que permiten la integración de los genes: BamHI, XbaI y Asp718. Detrás de estos sitios de clonación, 30 el plásmido contiene el intrón 3' y el sitio de poliadenilación del gen de la preproinsulina de rata. Otros promotores muy eficaces también se pueden utilizar para la expresión, p. ej., el promotor de la  $\beta$ -actina humana, los promotores temprano o tardío de SV40 o las repeticiones largas terminales de otros retrovirus, p. ej., VIH y HTLV1. Los sistemas de expresión génica de Clontech, Tet-Off y Tet-On y sistemas similares se pueden utilizar para expresar el polipéptido del receptor de TNF de modo regulado, en células de mamífero (Gossen, M., & Bujard, H. 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551). Para la poliadenilación del ARNm, se pueden emplear otras señales, p. ej., procedentes de la hormona de crecimiento humana o los genes de la globina se pueden utilizar también. Las líneas celulares estables que son portadoras de un gen de interés integrado en los cromosomas, también se pueden seleccionar después de la cotransfección con un marcador seleccionable tal como gpt, G418 o higromicina. Es conveniente emplear más de un marcador seleccionable al principio, p. ej., G418 y metotrexato.

40

El plásmido pC4 se digiere con las enzimas de restricción adecuadas para los cebadores específicos empleados para amplificar el receptor de TNF elegido, tal y como se describe a continuación y desfosforilar después empleando fosfatos de intestino de ternera mediante procedimientos conocidos en la técnica. El vector se aísla a continuación a partir del gel de agarosa al 1%.

45

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido del receptor de TNF se amplifica empleando cebadores de oligonucleótidos para PCR que se corresponden con las secuencias 5' y 3' de la porción deseada del gen. El cebador 5' para TNFR-6 $\alpha$  y TNFR-6 $\beta$  que contiene el sitio de BamHI subrayado, tiene la siguiente secuencia: 5' CGCGGATCCGCCATCATGAGGGCGTGGAGGGGCCAG 3' (SEQ ID NO:22). El cebador 3' para TNFR-6 $\alpha$  tiene 50 la secuencia

5' CGCGGGTACCCTTTCAGTGCAAGTG 3' (SEQ ID NO:23) que contiene el sitio de restricción de Asp718 subrayado. El cebador 3' para TNFR-6 $\beta$  tiene la secuencia 5' CGCGGGTACCCTCCTCAGCTCCTGCAGTG 3' (SEQ ID NO:24) que contiene el sitio de restricción de Asp718 subrayado.

55

El fragmento amplificado se digiere con las endonucleasas que cortarán en los sitios de restricción modificados y a continuación se purifica de nuevo sobre un gel de agarosa al 1%. El fragmento aislado y el vector desfosforilado se ligan a continuación con la ligasa de ADN de T4. Las células de *E. coli* HB101 o XL-1 Blue se transforman a continuación y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC4 empleando, por ejemplo, un análisis con enzimas de restricción.

60

Las células de ovario de hámster chino que carecen de un gen DHFR activo, se emplean para la transfección. Cinco  $\mu$ g del plásmido de expresión pC4 se cotransfectan con 0,5  $\mu$ g del plásmido pSVneo, empleando lipofectina (Felgner y col., mencionado anteriormente). El plásmido pSV2-neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen *neo* procedente de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos que incluyen G418. Las células se siembran en alfa-MEM suplementado con 1 mg/ml de G418. Dos días después, las células se trituran y se siembran en placas de clonación de hibridomas (Greiner, Alemania) en alfa-MEM suplementado con 10, 25 o 50 ng/ml de metotrexato más 1 mg/ml de G418. Después de aproximadamente 10-14 días, los clones aislados se trituran y

## ES 2 286 843 T3

se siembran a continuación en placas petri de 6 pocillos o en frascos de 10 ml, empleando concentraciones diferentes de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen con las mayores concentraciones de metotrexato se transfieren a continuación a nuevas placas con 6 pocillos, incluso con concentraciones superiores de metotrexato (1  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10 mM, 20 mM). El mismo procedimiento se repite hasta que se obtienen los clones 5 que crecen a una concentración de 100 -200  $\mu$ M. La expresión del producto génico deseado se analiza, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia de tipo Western o mediante análisis con HPLC de fase inversa.

### Ejemplo 4

#### 10 *Distribución en el tejido de la expresión del ARNm del receptor de TNF*

El análisis de la transferencia de tipo Northern se realiza para examinar la expresión génica de TNFR-6 $\alpha$  o TNFR-6 $\beta$  en tejidos humanos, empleando métodos descritos, entre otros, por Sambrook y col., citado anteriormente. Una sonda de ADNc que contiene la secuencia completa de nucleótidos de una proteína del receptor de TNF (SEQ ID 15 NOS:1 o 3) se marca con  $^{32}$ P, empleando el sistema de marcación de ADN rediprime $^{\circledR}$  (Amersham Life Science), según las instrucciones del fabricante. Después de marcarla, la sonda se purifica empleando una columna CHROMA SPIN-100 $^{\circledR}$  (Clontech Laboratories Inc.) según el protocolo del fabricante nº PT1200-1. La sonda purificada y marcada se emplea a continuación para examinar diversos tejidos humanos en busca de ARNm del receptor de TNF.

20 Transferencias de tipo Northern de tejido múltiple (MTN) que contienen diversos tejidos humanos (H) o tejidos del sistema inmune humano (IM), se obtienen de Clontech y se examinan con la sonda marcada, empleando la solución de hibridación ExpressHyb $^{\circledR}$  (Clontech), según el protocolo del fabricante nº PT 1190-1. Después de hibridar y lavar, las transferencias se montan y se exponen a una película a -70°C durante una noche y las películas se revelan según procedimientos convencionales.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido seleccionado entre el grupo consistente en

- 5 (a) polinucleótidos que codifican al menos la forma madura del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida, tal y como se muestra en la Figura 1 o en las Figuras 2A y B;
- 10 (b) polinucleótidos que tienen la secuencia codificadora tal y como se muestra en la Figura 1 o en las Figuras 2A y B, que codifican al menos la forma madura del polipéptido;
- 15 (c) polinucleótidos que codifican el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos la forma madura del polipéptido codificada por el ADNc contenido en la ATCC 97810 o 97809;
- 20 (d) polinucleótidos que tienen la secuencia codificadora del ADNc contenido en ATCC 97810 o 97809 que codifican al menos la forma madura del polipéptido;
- (e) polinucleótidos que codifican un fragmento que tiene al menos 30 aminoácidos de longitud o una porción portadora del epítopo de un polipéptido codificado por un polinucleótido de uno cualquiera de los apartados (a) a (d);
- 25 (f) polinucleótidos que codifican una porción portadora del epítopo de un polipéptido de TNFR que comprende los residuos de aminoácidos seleccionados entre el grupo consistente en: desde Ala-31 hasta Thr-46 en la Figura 1, desde Phe-57 hasta Thr-117 en la Figura 1, desde Cys-132 hasta Thr-175 en la Figura 1, desde Gly-185 hasta Thr-194 en la Figura 1, desde Val-205 hasta Asp-217 en la Figura 1, desde Pro-239 hasta Leu-264 en la Figura 1 y desde Ala-283 hasta Pro 298 en la Figura 1; desde Ala-31 hasta Thr-46 en las Figuras 2A y B, desde Phe-57 hasta Gln-80 en las Figuras 2A y B, desde Glu-86 hasta His-106 en las Figuras 2A y B, desde Thr-108 hasta Phe-119 en las Figuras 2A y B, desde His-129 hasta Val-138 en las Figuras 2A y B y desde Gly-142 hasta Pro-166 en las Figuras 2A y B;
- 30 (g) polinucleótidos que codifican un polipéptido capaz de unirse a un ligando de Fas y que es idéntico al menos en 95% a una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en:
  - 35 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende los residuos de la secuencia de aminoácidos m-300 de la Figura 1, en donde m es un número entero en el intervalo de 1-49;
  - (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos n-170 de las Figuras 2A y B, en donde n es un número entero en el intervalo de 1-49;
  - 40 (iii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-y de la Figura 1, en donde y es un número entero en el intervalo de 193-300;
  - (iv) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 1-z de las Figuras 2A y B, en donde z es un número entero en el intervalo de 132-170; y
  - 45 (v) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos m-y de la Figura 1 o n-z de las Figuras 2A y B, estando definidos m, n, y z en los apartados (i), (ii), (iii) y (iv) anteriores.
- 50 (h) polinucleótidos que codifican un polipéptido capaz de unirse al ligando de Fas y que comprende una secuencia de nucleótidos que es idéntica al menos en 95% a una secuencia seleccionada entre el grupo consistente en:
  - 55 (i) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido consistente en una porción de una secuencia completa de aminoácidos de TNFR, codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809, en donde dicha porción excluye desde 1 hasta aproximadamente 48 aminoácidos desde el extremo amino terminal de dicha secuencia completa de aminoácidos codificada por el clon de ADNc, contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809;
  - 60 (ii) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido consistente en una porción de una secuencia completa de aminoácidos de TNFR, codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809, en donde dicha porción excluye desde 1 hasta aproximadamente 107 aminoácidos y desde 1 hasta aproximadamente 38 aminoácidos desde el extremo carboxi terminal de dicha secuencia completa de aminoácidos codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809, respectivamente; y

# ES 2 286 843 T3

5 (iii) un nucleótido que codifica un polipéptido consistente en una porción de una secuencia completa de aminoácidos de TNFR, codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809, en donde dicha porción incluye una combinación de cualquiera de las delecciones amino y carboxi terminales para los clones respectivos en los apartados (i) y (ii), anteriores.

10 (i) polinucleótidos que codifican un polipéptido capaz de unirse al ligando de Fas que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad de 95% con

15 (i) un polipéptido codificado por un polinucleótido de uno cualquiera de los apartados (a) hasta (e); o

(ii) la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 31-300 en la Figura 1 o 31-170 en las Figuras 2A y B, o tal y como es codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809; o

20 (iii) la secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular soluble de un polipéptido de TNFR que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones 31 a 283 en la Figura 1 o 31 a 166 en las Figuras 2A y B, o tal y como es codificada por el clon de ADNc contenido en el depósito de la ATCC nº 97810 o 97809;

25 (j) polinucleótidos que comprenden al menos 15 nucleótidos de un polinucleótido de uno cualquiera de los apartados (a) hasta (i) y que codifican un polipéptido de TNFR;

30 (k) polinucleótidos de la cadena complementaria de la que se híbrida, bajo condiciones rigurosa de hibridación, con un polinucleótido de uno cualquiera de los apartados (a) hasta (j) y que no se híbrida bajo condiciones rigurosas de hibridación con un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos consistente sólo en residuos A o sólo en residuos T; y

35 (l) polinucleótidos que codifican el dominio extracelular soluble de un polipéptido codificado por un polinucleótido de uno cualquiera de los apartados (a) hasta (j);

30 o la cadena complementaria de dicho polinucleótido.

2. El polinucleótido según la reivindicación 1, que es ADN.

35 3. El polinucleótido según la reivindicación 1, que es ARN.

40 4. El polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente una secuencia heteróloga de polinucleótido.

45 5. El polinucleótido según la reivindicación 4, en donde dicha secuencia heteróloga de polinucleótido codifica un polipéptido.

6. El polinucleótido según la reivindicación 5, en donde dicho polipéptido es un dominio constante de inmunoglobulina o una porción del mismo.

45 7. El polinucleótido según la reivindicación 6, en donde dicho dominio es un dominio de Fc.

50 8. Un método para preparar un vector recombinante que comprende insertar un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en un vector.

9. Un vector que contiene el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un vector preparado por el método de la reivindicación 8.

55 10. El vector según la reivindicación 9, en el que el polinucleótido está ligado funcionalmente a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células hospedadoras procariotas o eucariotas.

11. Un método para preparar una célula hospedadora recombinante que comprende introducir el vector según la reivindicación 9 o 10, en una célula hospedadora.

60 12. Una célula hospedadora modificada genéticamente con el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o el vector según la reivindicación 9 o 10, o producida según el método de la reivindicación 11.

13. Un procedimiento para producir un polipéptido de TNFR que comprende: cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 12 y recuperar el polipéptido codificado por dicho polinucleótido a partir del cultivo.

65 14. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

## ES 2 286 843 T3

15. Un anticuerpo ligado específicamente al polipéptido según la reivindicación 14.
16. El anticuerpo según la reivindicación 15, que es policlonal, monoclonal o está humanizado.
- 5 17. Un fragmento de anticuerpo ligado específicamente al polipéptido según la reivindicación 14, que es un fragmento Fab o F(ab')<sub>2</sub>.
18. El fragmento de anticuerpo según la reivindicación 17, que está humanizado.
- 10 19. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, el polipéptido según la reivindicación 14 o un ADN que codifica y es capaz de expresar dicho polipéptido *in vivo*.
- 15 20. La composición farmacéutica según la reivindicación 19, que comprende opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
21. Una composición para diagnóstico que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18.
- 20 22. Un método *in vitro* para detectar una enfermedad o un cáncer relacionado con el sistema inmune que comprende: medir la concentración del polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o del polipéptido según la reivindicación 14, en tejido del sistema inmune o en otras células o en fluido corporal procedente de un individuo; y comparar esta concentración medida con una concentración patrón observada en tejido del sistema inmune o en otras células o fluidos corporales obtenidos a partir de individuos que no padecen dicha enfermedad; en donde un incremento o una disminución de la concentración de polinucleótido o de polipéptido, comparada con la concentración patrón, es indicativo de una enfermedad o de cáncer del sistema inmune.
- 25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 286 843 T3

GCTCTCCCTGCTCCAGCAAGGACCATGAGGGCGCTGGAGGGGCCAGGCCTGTCGCTGCTG  
M R A L E G P G L S L  
 TGCCCTGGTGTGGCGCTGCCTGCCCTGCTGCCGGTGCCGGCTGTACGCGGAGTGGCAGAA  
C L V I A L P A L L P V P A V R G V A E  
 ACACCCACCTACCCCTGGCGGGACGCAGAGACAGGGGAGCAGCTGGTGTGCCGCCAGTGC  
 T P T Y P W R D A E T G E R L V C A Q C  
 CCCCCAGGCACCTTGTGCAGCGGCCGTGCCGCCAGACAGCCCCACGACGTGTGGCCCG  
 P P G T F V Q R P C R R D S P T T C G P  
 TGTCCACCGCGCCACTACACGCAGTTCTGAACTACCTGGAGCGCTGCCGCTACTGCAAC  
 C P P R H Y T Q F W N Y L E R C R Y C N  
 GTCCCTCTGGGGAGCGTGGAGGAGGCACGGGCTTGCCACGCCACCCACAACCGTGCC  
 V L C G E R E E E A R A C H A T H N R A  
 TGCCGCTGCCGCACCGCCTTCCTGCCACGCTGGTTCTGCTGGAGCACCGATCGTGT  
 C R C R T G F F A H A G F C L E H A S C  
 CCACCTGGTGCCGGCGTGATTGCCCGGGCACCCCCAGCCAGAACACGCAGTGCCAGCCG  
 P P G A G V I A P G T P S Q N T Q C Q P  
 TGCCCCCAGGCACCTCTCAGCCAGCAGCTCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCCCACCGC  
 C P P G T F S A S S S S S E Q C Q P H R  
 AACTGCACGGCCCTGGGCCTGGCCCTCAATGTGCCAGGCTTCCCTCCATGACACCCCTG  
 N C T A L G L A L N V P G S S S H D T L  
 TGCACCAAGCTGCACTGGCTTCCCCCTCAGCACCAAGGGTACCAAGGAGCTGAGGAGTGTGAG  
 C T S C T G F P L S T R V P G A E E C E  
 CGTGCCTCATCGACTTGTGGCTTCCAGGACATCTCCATCAAGAGGCTGCAGCGGCTG  
 R A V I D F V A F Q D I S I K R L Q R L  
 CTGCAGGCCCTCGAGGCCCGGAGGGCTGGCTCCGACACCAAGGGCGGCCGCC  
 L Q A L E A P E G W G P T P R A G R A A  
 TTGCAGCTCAAGCTGCCTGGCGCTCACGGAGCTCCTGGGGCGCAGGACGGGCGCTG  
 L Q L K L R R R L T E L L G A Q D G A L  
 CTGGTGCCTGCAGGCCGCTGGAGGCTGGCCAGGATGCCGGCTGGAGCGGAGCGTC  
 L V R L L Q A L R V A R M P G L E R S V  
 CGTGAGCGCTTCCCTGTGCACTGATCCTGGCCCCCTTTATTATCTACATCCTTG  
 R E R F L P V H \*  
 GCACCCACCTGCACTGAAAGAGGCTTTTTAAATAGAAGAAATGAGGTTCTTAAAG  
 CTTATTTTATAAAGCTTTTCTAAAAA  
**FIG.1**

ES 2 286 843 T3

TGGCATGTCGGTCAGGCACAGCAGGGTCTGTGTCCGCGCTGAGCCGCGCTCTCCCTGCT  
CCAGCAAGGACCATGAGGGCGCTGGAGGGGCAAGGCCTGTGCGCTGCTGTGCCTGGTGTG  
M R A L E G P G I S I L C L V I  
GCGCTGCCCTGCCCTGCTGCCGGTGCCTGCTACGGGGAGTGGCAGAAACACCCACCTAC  
A L P A L L P V P A V R G V A E T P T Y  
CCCTGGCGGGACGCAGAGACAGGGAGCGGCTGGTGTGCGCCAGTGCACCCAGGCACC  
P W R D A E T G E R L V C A Q C P P G T  
TTTGTGCAGCGGCCGTGCCGCCAGACAGCCCCACGACGTGTGGCCCGTGTCCACCGCGC  
F V Q R P C R R D S P T T C G P C P P R  
CACTACACGCACTCTGGAACCTACCTGGAGCGCTGCCCTACTGCAACGTCCCTGCCGGG  
H Y T Q F W N Y L E R C R Y C N V L C G  
GAGCCTGAGGGAGGAGGCACGGGCTGCCACGCCACCCACAACCGTGCCTGCCGCTGCCGC  
E R E E E A R A C H A T H N R A C R S R  
ACCGGCTTCTCGCGCACGCTGGTTCTGCTGGAGCACGCATCGTGTCCACCTGGTGCC  
T G F F A H A G F C L E H A S C P P G A  
GGCGTGATTGCCCGGGTGAGAGCTGGCGAGGGGAGGGGCCCCAGGAGTGGTGCCCGG  
G V I A P G E S W A R G G A P R S G G R  
AGGTGTGGCAGGGGTCAAGTTGCTGGTCCCAGCCTGCACCCCTGAGCTAGGACACCAAGTT  
R C G R G Q V A G P S L A P \*  
CCCCCTGACCCCTGTTCTCCCTCCTGGCTGCAGGCACCCCCAGCCAGAACACGCAGTGCC  
CCCGTCCCCCAGGCACCTCTCAGCCAGCAGCTCAGAGCAGTGCCAGCCCC  
CCGCAACTGCACGGCCCTGGCCTGCCCTCAATGTGCCAGGCTTCCCTCCATGACAC  
CCTGTGCACCAGCTGCACTGGCTCCCCCTCAGCACCAGGGTACCAAGGTGAGCCAGAGG  
CTGAGGGGGCAGCACACTGCAGGCCAGGCCACTTGTGCCCTCACTCCTGCCCTGCACG  
TGCATCTAGCCTGAGGCATGCCAGCTGGCTCTGGAAAGGGGCAACAGTGGATTGAGGGG  
TCAGGGGTCCCTCACTAGATCCCCACCAAGTCTGCCCTCTCAGGGGTGGCTGAGAATT  
GGATCTGAGCCAGGGCACAGCCTCCCTGGAGAGCTCTGGAAAGTGGCAGCAATCTCC

FIG.2A

TAACTGCCCGAGGGGAAGGTGGCTGGCTCCCTGACACGGGAAACCGAGGCCTGATGGT  
AACTCTCCTAACTGCCTGAGAGGAAGGTGGCTGCCTCCCTGACATGGGAAACCGAGGC  
CCAATGTTAACCACTGTTGAGAAGTCACAGGGGAAGTGACCCCCCTAACATCAAGTCAG  
GTCCGGTCCATCTGCAGGTCCCAACTCGCCCCCTCCGATGGCCCAGGAGCCCCAAGCCCT  
TGCCCTGGGCCCCCTGCCTTGCAGCCAAGGTCCGAGTGGCCGCTCTGCCCCCTAGGC  
CTTGCTCCAGCTCTGACCGAAGGCTCTGCCCCCTCCAGTCCCCATCGTTGCACT  
GCCCTCTCCAGCACGGCTCACTGCACAGGGATTTCTCTCTGCAAACCCCCGAGTGG  
GGCCCAGAAAGCAGGGTACCTGGCAGCCCCGCCAGTGTGTGGGTGAAATGATCGGAC  
CGCTGCCTCCCCACCCCACTGCAGGAGCTGAGGAGTGTGAGCGTGCCGTACACTTG  
TGGCTTCCAGGACATCTCCATCAAGAGGAGCGGCTGCTGCAGGCC

## FIG.2B

M - G	L	S	T	V	P	D	L	L	P	L	V	L	E	L	L	P	V	G	I	G	L	V	P	H	L	G	D	R	E	-	INFR1					
M - P	Y	A	V	W	A	A	H	A	H	A	H	A	A	H	A	H	A	H	A	G	A	K	E	-	A	C	P	-	F	T	P	-	TNFR2			
M - G	A	G	A	T	G	R	A	M	D	-	G	P	R	L	L	L	L	L	L	G	V	S	L	G	A	K	E	-	NGFR							
M - R	L	P	R	-	A	S	S	P	C	G	L	A	W	G	P	L	L	G	L	S	G	L	V	A	S	Q	P	Q	L	V	P	-	LTBR			
M - G	T	W	I	-	L	P	L	V	L	I	S	V	-	A	R	L	S	S	K	S	V	N	A	Q	V	T	D	I	N	S	K	G	L	FAS		
M - L	G	T	W	I	-	A	R	P	H	P	-	W	W	L	C	V	L	G	I	L	V	G	L	S	-	A	T	P	A	P	K	S	C	P	-	CD27
M - M	R	Y	R	L	P	L	-	Q	-	-	-	-	-	-	L	A	A	L	G	L	L	F	G	A	L	R	A	-	-	F	P	Q	-	CD30		
M - M	Y	R	L	P	L	-	Q	-	-	-	-	-	-	-	C	V	L	-	Y	G	L	L	-	T	A	V	H	P	E	-	CD40					
M - M	G	N	-	-	S	C	Y	N	I	V	A	T	L	L	V	T	N	-	-	-	-	-	T	V	T	G	L	H	C	V	-	4-1BB				
M - M	C	V	G	A	-	R	R	L	G	-	-	R	G	P	C	A	A	L	L	G	L	G	L	S	T	V	T	G	AP	-	OX40					
M - M	K	S	V	-	L	Y	L	Y	I	I	L	L	F	L	S	C	I	I	N	G	R	D	A	A	P	-	VC22									
M - M	K	S	-	-	Y	I	L	L	L	-	-	L	L	S	C	I	I	I	N	S	D	I	T	P	-	CRM8										
M - M	R	A	L	E	-	-	-	-	-	-	-	G	P	G	L	S	L	C	L	V	L	A	L	P	A	L	P	-	INFR-6a							
M - M	R	A	L	E	-	-	-	-	-	-	-	G	P	G	L	S	L	C	L	V	L	A	L	P	A	L	P	-	INFR-6b							

FIG. 3A

39	- K R D S Y C P Q G K Y I H -	- P Q N N S I C C I K C H K G T Y L Y N D C P G	INFRI
32	- Y - A P E P G S T C R L R E Y Y D Q T A Q M	- C C S K C S P G Q H A K V F C -	TNFR2
34	- I - - - -	- C C S K C S P G Q H A K V F C -	NGFR
36	- Y R I E N Q T C W D Q D K E Y Y E P M H D Y C C S R C P P G E F V F A V C -	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	LNFR
36	- E L R K T V T I V E T Q N L E G L H D G Q F C H K P C P P G E R K A R D C I V FAS	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	LNFR
29	- D R P F E D T C H G N P S H Y Y D K A V R R C C Y R C P M G L F P T Q Q C P Q	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	CD27
22	- - - - -	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	CD30
24	- - - - -	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	CD40
21	- I R S L Q D P - - -	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	CD N 4-IBB
33	- G - - - -	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	CD N 4-IBB
28	- P N G K C K D T E Y K R H N - - -	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	CD N 4-IBB
26	- S N G K C K D N E Y K R H H - - -	- C C K A C N L G E G Y A Q P C G A	CD N 4-IBB
27	- V R G Y A E T P T Y P W R D A - E T G E R L V C A Q C P P G I F V Q R P C -	- V R G Y A E T P T Y P W R D A - E T G E R L V C A Q C P P G I F V Q R P C -	TNFR-6a
27	- V R G Y A E T P T Y P W R D A - E T G E R L V C A Q C P P G I F V Q R P C -	- V R G Y A E T P T Y P W R D A - E T G E R L V C A Q C P P G I F V Q R P C -	TNFR-6b

FIG.3B

FIG. 3C

111	- Q V E I	S C T V D R D I	Y C G C R K N Q Y R H Y V S E N L F Q C F N C S L -	INFR1
106	- E T Q A -	C T R E Q N R I C T Q A D	P G Y Y C A L S K O E -	INFR2
95	W S A P -	C V E A D	P G Y Y C A Y G Y D E T I G -	NGFR
110	F E E V A P -	C T S D R K A E C R C Q P G M S C V Y L D N E -	R C E A C R V -	LTbR
113	L E V E I N -	C T R T Q N T K C R C K P N -	- C V H C E E	E
74	-	-	-	F F C N -
92	L V E K T P -	C A W N S S R V C E C R P G M F C S T S A V N -	H C E S C R H -	FAS
89	L R V Q Q K -	G I S E T D T I C I C E E G W H C T -	S C A R C F H -	CD27
71	V F R T R K E	C S S T S H A E C D C T P G F H C L -	- C C S C V L H	CD30
92	G S E R K Q L	C T A T Q D T V C R C -	- G A -	GC S M C E O D 4-1BB
96	- E T R S -	C N T I H H R I C E C S P G Y Y C L L K G S S -	- G C K A C V S Q	OX40
96	- E T R S -	C N T I H N R I C D C A P G Y Y C F L K G S S -	- G C K A C V S Q	VC22
101	- E A R A -	C H A T H N R A C R C R I G F F -	G C K A C V S Q	CRMB
101	- E A R A -	C H A T H N R A C R C R I G F F -	- A H A -	INFR-6a
			- G -	F C L E H
			- G -	F C L E H

FIG.3D

FIG. 3E

FIG. 3F

FIG. 3G

FIG. 3H

FIG. 31

FIG. 3 J

三六

FIG. 3K

ES 2 286 843 T3

FIG. 3L

FIG. 3M

ES 2 286 843 T3

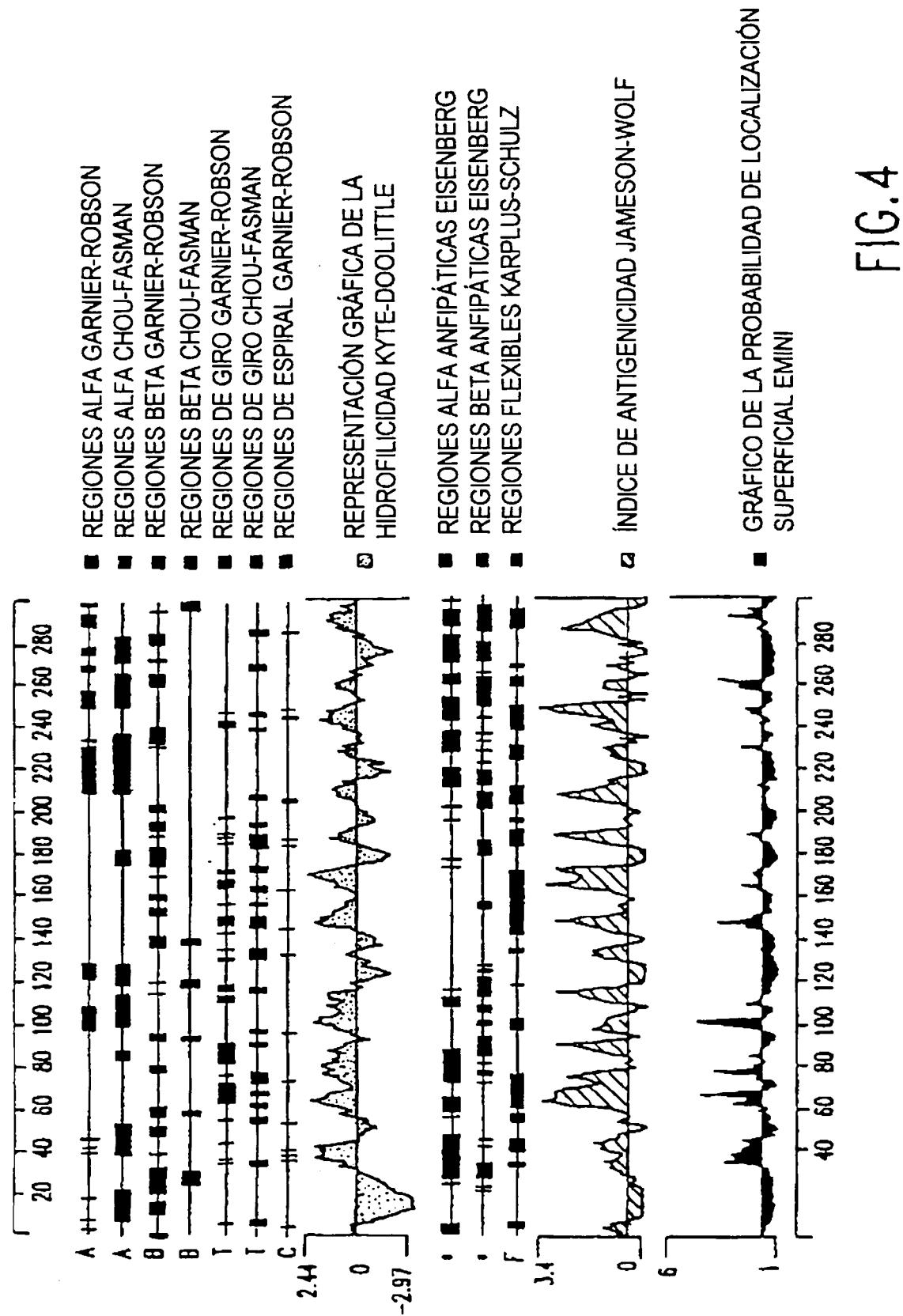
FIG. 3

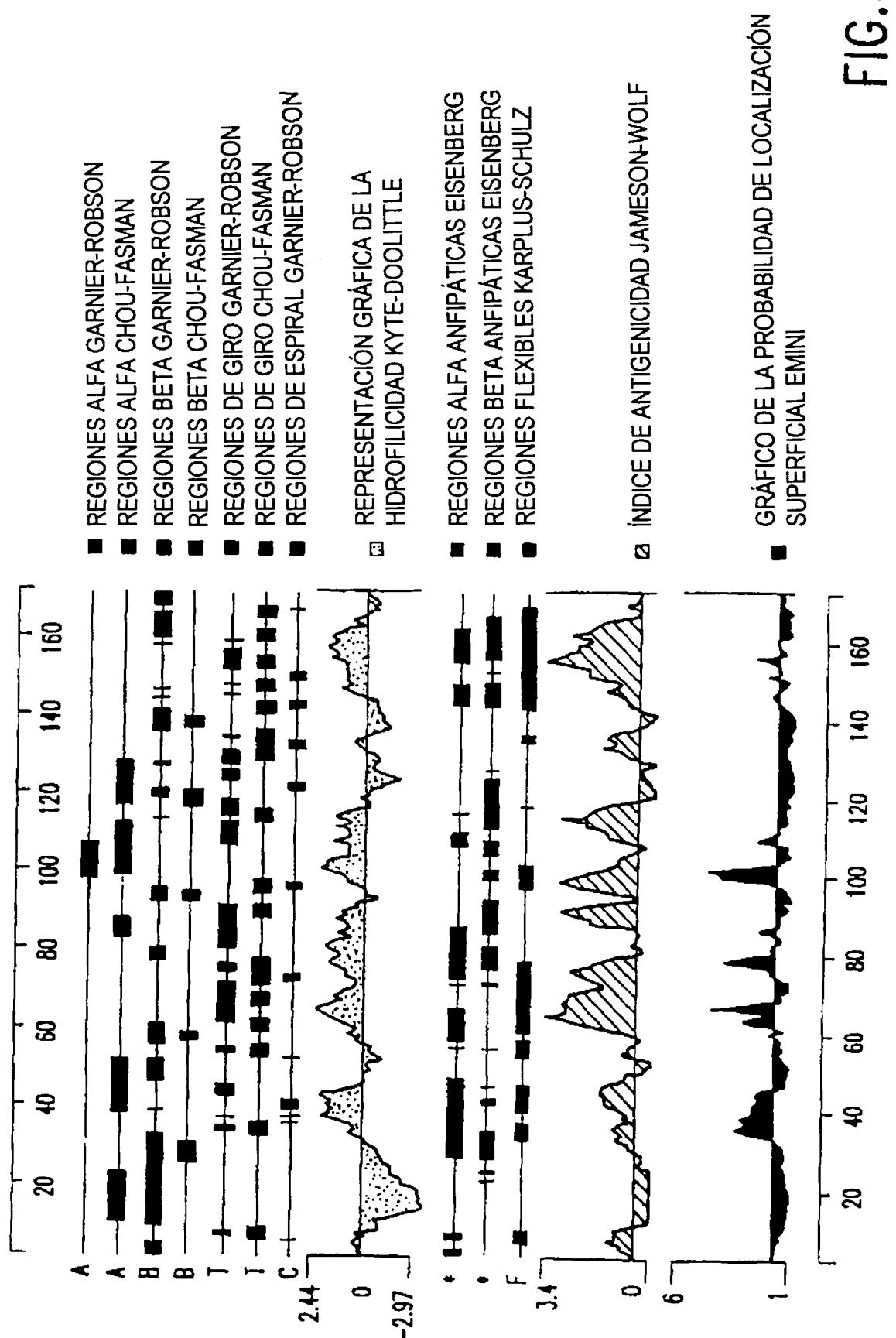
ES 2 286 843 T3

FIG. 30

ES 2 286 843 T3

FIG. 3P





**HELDI06R**

GGCACGAGCA GGGTCTGTN TCCGCCCTGA GCCGCGCTCT NCCTGCTCCA GCAAGGACCA  
TGAGGGCGCT GGAGGGGCCA GGCCTGTCGC TGCTGTGCCT GGTGTTGGCG CTGCCTGCC  
TGCTGCCGGT GCCGGCTGTA CGCGGAGTGG CAGAAACACN NACNTACCCC TGGCGGGACG  
NAGAGACAGG GGAGCGGCTG GTGTNTNCCC ANTGCCCCCC AGGCACCTTT NTGCAGCGGC  
CGTGCCGNCG AGACAGCCCC ACGACGTGTG GCCCGTNTCC ACCGCGCCAC TACACGCATT  
CTGGAACCTAC CTGGAGCGCT GNCGTTACTN CAACGTCCCTC TGCGGGGAGC GTNAGGAGGA  
GGCACGGTT TNCCACGNCA ACCACAACCG NGGNNTACCG TNGCCGNACC GGTTTCTTCG  
NGGCAAGTTG GTTTTNTNTT TGGAGNAAGG ATTGTGTTN CAATTNATTG ACGNAGTGAT  
TNNNCNCGGG AAACTNAAA

**HCEOW38R**

CGCAACTGCA CGGCCCTGGG ACTGGCCCTC AATGTGCCAG GNTCTTCCTC CCATGACACC  
CTGTGCACCA GCTGCACTGG CTTCCCCCTC AGCACCAAGGG TACCANGAGC TGAGGAGTGT  
GAGCNTGCCG TCATCGACTT TTTGGCTTTC CAGGACATCT CCATCAAGAG GCTGCAGCGG  
CTGCTCANGC C

**FIG.6**

**LISTA DE SECUENCIAS**

**(1) INFORMACIÓN GENERAL:**

- 5 (i) SOLICITANTE: Human Genome Sciences Inc. *et al.*
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: RECEPTORES 6 ALFA Y 6 BETA DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 24
- (iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:
- 15 (A) NOMBRE: HUMAN GENOME SCIENCES, INC.
- (B) CALLE: 9410 KEY WEST AVENUE
- (C) CIUDAD: ROCKVILLE
- (D) ESTADO: MD
- (E) PAÍS: EE.UU.
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 20850
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- 25 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
- (B) ORDENADOR: Compatible con PC IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) PROGRAMA: PatentIn Edición nº 1.0, Versión nº 1.30
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US98/00153
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 13 Enero 1998
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: BROOKES, ANDERS A
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.373
- 40 (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: PF454PCT
- (ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:
- 45 (A) TELÉFONO: (301) 309-8504
- (B) TELEFAX: (301) 309-8512

**(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:1:**

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1077 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (ix) CARACTERÍSTICAS:
- 60 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 25..924
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

# ES 2 286 843 T3

	GCTCTCCCTG CTCCAGCAAG GACC ATG AGG GCG CTG GAG GGG CCA GGC CTG Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu	51
	1 5	
5	TCG CTG CTG TGC CTG GTG TTG GCG CTG CCT GCC CTG CTG CCG GTG CCG Ser Leu Leu Cys Leu Val Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro	99
	10 15 20 25	
	GCT GTA CCC GGA GTG GCA GAA ACA CCC ACC TAC CCC TGG CCG GAC GCA Ala Val Arg Gly Val Ala Glu Thr Pro Thr Tyr Pro Trp Arg Asp Ala	147
	30 35 40	
10	GAG ACA GGG GAG CGG CTG GTG TGC GCC CAG TGC CCC CCA GGC ACC TTT Glu Thr Gly Glu Arg Leu Val Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe	195
	45 50 55	
	GTG CAG CGG CCG TGC CGC CGA GAC ACC CCC ACG ACG TGT GGC CCG TGT Val Gln Arg Pro Cys Arg Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys	243
15	60 65 70	
	CCA CCG CGC CAC TAC ACG CAG TTC TGG AAC TAC CTG GAG CGC TGC CGC Pro Pro Arg His Tyr Thr Gln Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg	291
	75 80 85	
20	TAC TGC AAC GTC CTC TGC GGG GAG CGT GAG GAG GCA CGG GCT TGC Tyr Cys Asn Val Leu Cys Gly Glu Arg Glu Glu Ala Arg Ala Cys	339
	90 95 100 105	
	CAC GCC ACC CAC AAC CGT GCC TGC CGC TGC CGC ACC GGC TTC TTC GCG His Ala Thr His Asn Arg Ala Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala	387
25	110 115 120	
	CAC GCT CGT TTC TGC TTG GAG CAC GCA TCG TGT CCA CCT GGT GCC GGC His Ala Gly Phe Cys Leu Glu His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly	435
	125 130 135	
	GTG ATT GCC CCG GGC ACC CCC AGC CAG AAC ACG CAG TGC CAG CCG TGC Val Ile Ala Pro Gly Thr Pro Ser Gln Asn Thr Gln Cys Gln Pro Cys	483
30	140 145 150	
	CCC CCA GGC ACC TTC TCA GCC AGC AGC TCC AGC TCA GAG CAG TGC CAG Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala Ser Ser Ser Ser Glu Gln Cys Gln	531
	155 160 165	
35	CCC CAC CGC AAC TGC ACG GCC CTG GGC CTG GCC CTC AAT GTG CCA GGC Pro His Arg Asn Cys Thr Ala Leu Gly Leu Ala Leu Asn Val Pro Gly	579
	170 175 180 185	
	TCT TCC TCC CAT GAC ACC CTG TGC ACC AGC TGC ACT GGC TTC CCC CTC Ser Ser Ser His Asp Thr Leu Cys Thr Ser Cys Thr Gly Phe Pro Leu	627
40	190 195 200	
	AGC ACC AGG GTA CCA GGA GCT GAG GAG TGT GAG CGT GCC GTC ATC GAC Ser Thr Arg Val Pro Gly Ala Glu Glu Cys Glu Arg Ala Val Ile Asp	675
	205 210 215	
45	TTT GTG GCT TTC CAG GAC ATC TCC ATC AAG AGG CTG CAG CGG CTG CTG Phe Val Ala Phe Gln Asp Ile Ser Ile Lys Arg Leu Gln Arg Leu Leu	723
	220 225 230	
	CAG GCC CTC GAG GCC CCG GAG GGC TGG GGT CCG ACA CCA AGG GCG GGC Gln Ala Leu Glu Ala Pro Glu Gly Trp Gly Pro Thr Pro Arg Ala Gly	771
50	235 240 245	
	CGC GCG GCC TTG CAG CTG AAG CTG CGT CGG CGG CTC ACG GAG CTC CTG Arg Ala Ala Leu Gln Leu Lys Leu Arg Arg Leu Thr Glu Leu Leu	819
	250 255 260 265	
55	GGG GCG CAG GAC GGG GCG CTG CTG GTG CGG CTG CTG CAG GCG CTG CGC Gly Ala Gln Asp Gly Ala Leu Leu Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu Arg	857
	270 275 280	
	GTG GCC AGG ATG CCC GGG CTG GAG CGG AGC GTC CGT GAG CGC TTC CTC Val Ala Arg Met Pro Gly Leu Glu Arg Ser Val Arg Glu Arg Phe Leu	915
60	285 290 295	
	CCT GTG CAC TGATCCTGGC CCCCTCTTAT TTATTCTACA TCCTTGGCAC Pro Val His	964
	300	
65	CCCCACTTGCA CTGAAAGAGG CTTTTTTTTA AATAGAAGAA ATGAGGTTTC TTAAAGCTTA TTTTTATAAA GCTTTTTCAT AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAA	1024 1077

# ES 2 286 843 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:2:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 300 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) TOPOLOGÍA: lineal

### 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu Ser Leu Leu Cys Leu Val Leu  
1 5 10 15

Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro Ala Val Arg Gly Val Ala Glu  
20 25 30

20 Thr Pro Thr Tyr Pro Trp Arg Asp Ala Glu Thr Gly Glu Arg Leu Val  
35 40 45

25 Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe Val Gln Arg Pro Cys Arg Arg  
50 55 60

Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys Pro Pro Arg His Tyr Thr Gln  
65 70 75 80

30 Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg Tyr Cys Asn Val Leu Cys Gly  
85 90 95

35 Glu Arg Glu Glu Ala Arg Ala Cys His Ala Thr His Asn Arg Ala  
100 105 110

40 Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala His Ala Gly Phe Cys Leu Glu  
115 120 125

His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly Val Ile Ala Pro Gly Thr Pro  
130 135 140

45 Ser Gln Asn Thr Gln Cys Gln Pro Cys Pro Pro Gly Thr Phe Ser Ala  
145 150 155 160

Ser Ser Ser Ser Glu Gln Cys Gln Pro His Arg Asn Cys Thr Ala  
165 170 175

50 Leu Gly Leu Ala Leu Asn Val Pro Gly Ser Ser Ser His Asp Thr Leu  
180 185 190

Cys Thr Ser Cys Thr Gly Phe Pro Leu Ser Thr Arg Val Pro Gly Ala  
195 200 205

Glu Glu Cys Glu Arg Ala Val Ile Asp Phe Val Ala Phe Gln Asp Ile  
210 215 220

55 Ser Ile Lys Arg Leu Gln Arg Leu Leu Gln Ala Leu Glu Ala Pro Glu  
225 230 235 240

Gly Trp Gly Pro Thr Pro Arg Ala Gly Arg Ala Ala Leu Gln Leu Lys  
245 250 255

60 Leu Arg Arg Arg Leu Thr Glu Leu Leu Gly Ala Gln Asp Gly Ala Leu  
260 265 270

Leu Val Arg Leu Leu Gln Ala Leu Arg Val Ala Arg Met Pro Gly Leu  
275 280 285

65 Glu Arg Ser Val Arg Glu Arg Phe Leu Pro Val His  
290 295 300

# ES 2 286 843 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 1667 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CATEGORÍA: sencilla
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

15 (ix) CARACTERÍSTICAS:

- 15 (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 73..582

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

20	TGGCATGTCG GTCAGGCACA GCAGGGTCCT GTGTCCGCGC TGAGCCGCGC TCTCCCTGCT	60
	CCAGCAAGGA CC ATG AGG GCG CTG GAG GGG CCA GGC CTG TCG CTG CTG	108
	Met Arg Ala Leu Glu Gly Pro Gly Leu Ser Leu Leu	
	1 5 10	
25	TGC CTG GTG TTG GCG CTG CCT GCC CTG CTG CCG GTG CCG GCT GTA CGC	156
	Cys Leu Val Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Pro Val Pro Ala Val Arg	
	15 20 25	
30	GGA GTG GCA GAA ACA CCC ACC TAC CCC TGG CGG GAC GCA GAG ACA GGG	204
	Gly Val Ala Glu Thr Pro Thr Tyr Pro Trp Arg Asp Ala Glu Thr Gly	
	30 35 40	
35	GAG CGG CTG GTG TGC GCC CAG TGC CCC CCA GGC ACC TTT GTG CAG CGG	252
	Glu Arg Leu Val Cys Ala Gln Cys Pro Pro Gly Thr Phe Val Gln Arg	
	45 50 55 60	
40	CCG TGC CGC CGA GAC AGC CCC ACG ACG TGT GGC CCG TGT CCA CCG CGC	300
	Pro Cys Arg Arg Asp Ser Pro Thr Thr Cys Gly Pro Cys Pro Pro Arg	
	65 70 75	
45	CAC TAC ACG CAG TTC TGG AAC TAC CTG GAG CGC TGC CGC TAC TGC AAC	348
	Bis Tyr Thr Gln Phe Trp Asn Tyr Leu Glu Arg Cys Arg Tyr Cys Asn	
	80 85 90	
50	GTC CTC TGC GGG GAG CGT GAG GAG CAG GCA CGC CCT TGC CAC GCC ACC	396
	Val Leu Cys Gly Glu Arg Glu Glu Ala Arg Ala Cys His Ala Thr	
	95 100 105	
55	CAC AAC CGT GCC TGC CGC TGC CGC ACC GGC TTC TTC GCG CAC GCT GGT	444
	His Asn Arg Ala Cys Arg Cys Arg Thr Gly Phe Phe Ala His Ala Gly	
	110 115 120	
60	TTC TGC TTG GAG CAC GCA TCG TGT CCA CCT GGT GCC GGC GTG ATT GCC	492
	Phe Cys Leu Glu His Ala Ser Cys Pro Pro Gly Ala Gly Val Ile Ala	
	125 130 135 140	
65	CCG GGT GAG AGC TGG GCG AGG GGA GGG GCC CCC AGG AGT GGT GGC CGG	540
	Pro Gly Glu Ser Trp Ala Arg Gly Gly Ala Pro Arg Ser Gly Gly Arg	
	145 150 155	
70	AGG TGT GGC AGG GGT CAG GTT GCT GGT CCC AGC CTT GCA CCC	582
	Arg Cys Gly Arg Gly Gln Val Ala Gly Pro Ser Leu Ala Pro	
	160 165 170	
75	TGAGCTAGGA CACCAGTTCC CCTGACCCCTG TTCTTCCCTC CTGGCTGCAG GCACCCCCAG	642
	CCAGAACACG CAGTGCCAGC CGTGCCCCCC AGGCACCTTC TCAGCCAGCA GCTCCAGCTC	
	702	
80	AGAGCAGTGC CAGCCCCACC GCAACTGCAC GGCCCTGGC CTGGCCCTCA ATGTGCCAGG	762

# ES 2 286 843 T3

5	CTCTTCCTCC CATGACACCC TGTGCACCAAG CTGCACTGGC TTCCCCCTCA GCACCAGGGT	822
	ACCAGGTGAG CCAGAGGCCT GAGGGGGCAG CACACTGCAG GCCAGGCCA CTTGTGCCCT	882
	CACTCCTGCC CCTGCACGTG CATCTAGCCT GAGGCATGCC AGCTGGCTCT GGGAAAGGGC	942
	CACAGTGGAT TTGAGGGGTC AGGGGTCCCT CCACTAGATC CCCACCAAGT CTGCCCTCTC	1002
10	AGGGGTGGCT GAGAATTGAG ATCTGAGCCA GGGCACAGCC TCCCCTGGAG AGCTCTGGGA	1062
	AAGTGGGCAG CAATCTCCTA ACTGCCAGG GGGAAAGGTGG CTGGCTCCTC TGACACGGGG	1122
	AAACCGAGGC CTGATCGTAA CTCTCCTAAC TGCCTGAGAG GAAGGTGGCT GCCTCCTCTG	1182
15	ACATGGGAA ACCGAGGCC ACCGAGGCC AATGTTAACC ACTGTTGAGA AGTCACAGGG GGAAGTGACC	1242
	CCCTTAACAT CAAGTCAGGT CCGGTCCATC TGCAGGTCCC AACTCGCCCC TTCCGATGGC	1302
	CCAGGAGGCC CAAGCCCTTG CCTGGGCCCC CTTGCTCTT GCAGCCAAGG TCCGAGTGGC	1362
20	CGCTCCTGCC CCCTAGGCCT TTGCTCCAGC TCTCTGACCG AAGGCTCCTG CCCCTCTCC	1422
	AGTCCCCATC GTTGCACTGC CCTCTCCAGC ACGGCTCACT GCACAGGGAT TTCTCTCTCC	1482
	TGCAAAACCCC CCGAGTGGGG CCCAGAAAGC AGGGTACCTG GCAGCCCCCG CCAGTGTGTG	1542
25	TGGGTGAAAT GATCGGACCG CTGCCTCCCC ACCCCACTGC AGGAGCTGAG GAGTGTGAGC	1602
	GTGCCGTCACT CGACTTTGTG GCTTTCCAGG ACATCTCCAT CAAGAGGAGC GGCTGCTGCA	1662
	GGCCC	1667

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

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 170 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

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

ES 2 286 843 T3

130 135 140

5 Trp Ala Arg Gly Gly Ala Pro Arg Ser Gly Gly Arg Arg Cys Gly Arg  
145 150 155 160

Gly Gln Val Ala Gly Pro Ser Leu Ala Pro  
165 170

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

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 455 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) CATENARIEDAD: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

25 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu  
1 5 10 15

Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro  
20 25 30

30 His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys  
35 40 45

Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys  
50 55 60

35 Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp  
65 70 75 80

40 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu  
85 90 95

Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val  
100 105 110

45 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg  
115 120 125

Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe  
130 135 140

50 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu  
145 150 155 160

Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu  
165 170 175

55 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr  
180 185 190

Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser  
195 200 205

60 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu  
210 215 220

Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys  
225 230 235 240

65 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu  
245 250 255

# ES 2 286 843 T3

Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro .Ser  
 260 265 270  
 5 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val  
 275 280 285  
 Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr Pro Gly Asp Cys  
 290 295 300  
 10 Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly  
 305 310 315 320  
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn  
 325 330 335  
 15 Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp  
 340 345 350  
 Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro  
 20 355 360 365  
 Leu Arg Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu  
 370 375 380  
 25 Ile Asp Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln  
 385 390 395 400  
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala  
 405 410 415  
 30 Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu Leu Gly  
 420 425 430  
 Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro  
 435 440 445  
 35 Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg  
 450 455

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:6:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
 (A) LONGITUD: 461 aminoácidos  
 (B) TIPO: aminoácido  
 45 (C) CATENARIEDAD: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína  
 50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

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

## ES 2 286 843 T3

	Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
	100 105 110
5	Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
	115 120 125
	Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
	130 135 140
10	Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
	145 150 155 160
	Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
	165 170 175
15	Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
	180 185 190
20	Asn Ala Ser Arg Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
	195 200 205
	Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
	210 215 220
25	Gln His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser
	225 230 235 240
	Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly
	245 250 255
30	Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly
	260 265 270
	Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr Gln Val Lys
	275 280 285
35	Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val Pro His Leu Pro
	290 295 300
	Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln His Leu Leu
40	305 310 315 320
	Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser
	325 330 335
45	Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly
	340 345 350
	Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser
	355 360 365
50	Asp Ser Ser Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile
	370 375 380
	Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln
	385 390 395 400
55	Ala Ser Ser Thr Met Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro
	405 410 415
	Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser
60	420 425 430
	Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro
	435 440 445
65	Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser
	450 455 460

# ES 2 286 843 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:7:

### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 427 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) CATEGORÍA: sencilla  
10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

15 Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys  
20 25 30

20 Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn  
35 40 45

25 Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys  
50 55 60

30 Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr  
65 70 75 80

35 Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser  
85 90 95

40 Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly  
100 105 110

45 Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys  
115 120 125

50 Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr  
130 135 140

55 Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His  
145 150 155 160

60 Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln  
165 170 175

65 Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro  
180 185 190

70 Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr  
195 200 205

75 Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile  
210 215 220

80 Ala Ser Thr Val Ala Gly Val Val Thr Thr Val Met Gly Ser Ser Gln  
225 230 235 240

85 Pro Val Val Thr Arg Gly Thr Thr Asp Asn Leu Ile Pro Val Tyr Cys  
245 250 255

90 Ser Ile Leu Ala Ala Val Val Val Gly Leu Val Ala Tyr Ile Ala Phe  
260 265 270

95 Lys Arg Trp Asn Ser Cys Lys Gln Asn Lys Gln Gly Ala Asn Ser Arg  
275 280 285

100 Pro Val Asn Gln Thr Pro Pro Glu Gly Glu Lys Leu His Ser Asp  
290 295 300

ES 2 286 843 T3

Ser Gly Ile Ser Val Asp Ser Gln Ser Leu His Asp Gln Gln Pro His  
 305 310 315 320  
 Thr Gln Thr Ala Ser Gly Gln Ala Leu Lys Gly Asp Gly Gly Leu Tyr  
 325 330 335  
 Ser Ser Leu Pro Pro Ala Lys Arg Glu Glu Val Glu Lys Leu Leu Asn  
 340 345 350  
 Gly Ser Ala Gly Asp Thr Trp Arg His Leu Ala Gly Glu Leu Gly Tyr  
 355 360 365  
 Gln Pro Glu His Ile Asp Ser Phe Thr His Glu Ala Cys Pro Val Arg  
 370 375 380  
 Ala Leu Leu Ala Ser Trp Ala Thr Gln Asp Ser Ala Thr Leu Asp Ala  
 385 390 395 400  
 Leu Leu Ala Ala Leu Arg Arg Ile Gln Arg Ala Asp Leu Val Glu Ser  
 405 410 415  
 Leu Cys Ser Glu Ser Thr Ala Thr Ser Pro Val  
 420 425

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 415 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

Met Arg Leu Pro Arg Ala Ser Ser Pro Cys Gly Leu Ala Trp Gly Pro  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Gly Leu Ser Gly Leu Leu Val Ala Ser Gln Pro Gln Leu  
20 25 30

Val Pro Pro Tyr Arg Ile Glu Asn Gln Thr Cys Trp Asp Gln Asp Lys  
35 40 45

Glu Tyr Tyr Glu Pro Met His Asp Val Cys Cys Ser Arg Cys Pro Pro  
 50 55 60

Gly Glu Phe Val Phe Ala Val Cys Ser Arg Ser Gln Asp Thr Val Cys  
65 70 75 80

Lys Thr Cys Pro His Asn Ser Tyr Asn Glu His Trp Asn His Leu Ser  
 85 90 95

Thr Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp Ile Val Leu Gly Phe Glu Glu  
 100 105 110

Val Ala Pro Cys Thr Ser Asp Arg Lys Ala Glu Cys Arg Cys Gln Pro  
115 120 125

Gly Met Ser Cys Val Tyr Leu Asp Asn Glu Cys Val His Cys Glu Glu  
 130 135 140

Glu Arg Leu Val Leu Cys Gin Pro Gly Thr Glu Ala Glu Val Thr Asp  
145 150 155 160

Glu Ile Met Asp Thr Asp Val Asn Cys Val Pro Cys Lys Pro Gly His

# ES 2 286 843 T3

	165	170	175
5	Phe Gln Asn Thr Ser Ser Pro Arg Ala Arg Cys Gln Pro His Thr Arg 180	185	190
10	Cys Glu Ile Gln Gly Leu Val Glu Ala Ala Pro Gly Thr Ser Tyr Ser 195	200	205
15	Asp Thr Ile Cys Lys Asn Pro Pro Glu Pro Gly Ala Met Leu Leu Leu 210	215	220
20	Ala Ile Leu Leu Ser Leu Val Leu Phe Leu Leu Phe Thr Thr Val Leu 225	230	235
25	Ala Cys Ala Trp Met Arg His Pro Ser Leu Cys Arg Lys Leu Gly Thr 245	250	255
30	Leu Leu Lys Arg His Pro Glu Gly Glu Glu Ser Pro Pro Cys Pro Ala 260	265	270
35	Pro Arg Ala Asp Pro His Phe Pro Asp Leu Ala Glu Pro Leu Leu Pro 275	280	285
40	Met Ser Gly Asp Leu Ser Pro Ser Pro Ala Gly Pro Pro Thr Ala Pro 290	295	300
45	Ser Leu Glu Glu Val Val Leu Gln Gln Ser Pro Leu Val Gln Ala 305	310	315
50	Arg Glu Leu Glu Ala Glu Pro Gly Glu His Gly Gln Val Ala His Gly 325	330	335
55	Ala Asn Gly Ile His Val Thr Gly Gly Ser Val Thr Val Thr Gly Asn 340	345	350
60	Ile Tyr Ile Tyr Asn Gly Pro Val Leu Gly Gly Thr Arg Gly Pro Gly 355	360	365
65	Asp Pro Pro Ala Pro Pro Glu Pro Pro Tyr Pro Thr Pro Glu Glu Gly 370	375	380
70	Ala Pro Gly Pro Ser Glu Leu Ser Thr Pro Tyr Gln Glu Asp Gly Lys 385	390	395
75	Ala Trp His Leu Ala Glu Thr Glu Thr Leu Gly Cys Gln Asp Leu 405	410	415

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:9:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 335 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (C) CATENARIEDAD: sencilla
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 55 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

ES 2 286 843 T3

Met	Leu	Gly	Ile	Trp	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Leu	Thr	Ser	Val	Ala	
1															15	
5	Arg	Leu	Ser	Ser	Lys	Ser	Val	Asn	Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Ile	Asn	Ser
															30	
10	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Arg	Lys	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Thr	Gln	Asn	
															45	
15	Leu	Glu	Gly	Leu	His	His	Asp	Gly	Gln	Phe	Cys	His	Lys	Pro	Cys	Pro
															60	
20	Pro	Gly	Glu	Arg	Lys	Ala	Arg	Asp	Cys	Thr	Val	Asn	Gly	Asp	Glu	Pro
															80	
25	Asp	Cys	Val	Pro	Cys	Gln	Glu	Gly	Lys	Glu	Tyr	Thr	Asp	Lys	Ala	His
															95	
30	Phe	Ser	Ser	Lys	Cys	Arg	Arg	Cys	Arg	Leu	Cys	Asp	Glu	Gly	His	Gly
															110	
35	Leu	Glu	Val	Glu	Ile	Asn	Cys	Thr	Arg	Thr	Gln	Asn	Thr	Lys	Cys	Arg
															125	
40	Cys	Lys	Pro	Asn	Phe	Phe	Cys	Asn	Ser	Thr	Val	Cys	Glu	His	Cys	Asp
															140	
45	Pro	Cys	Thr	Lys	Cys	Glu	His	Ile	Ile	Lys	Glu	Cys	Thr	Leu	Thr	
															160	
50	Ser	Asn	Thr	Lys	Cys	Lys	Glu	Glu	Gly	Ser	Arg	Ser	Asn	Leu	Gly	Trp
															175	
55	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ile	Pro	Leu	Ile	Val	Trp	Val	Lys	Arg
															190	
60	Lys	Glu	Val	Gln	Lys	Thr	Cys	Arg	Lys	His	Arg	Lys	Glu	Asn	Gln	Gly
															205	
65	Ser	His	Glu	Ser	Pro	Thr	Leu	Asn	Pro	Glu	Thr	Val	Ala	Ile	Asn	Leu
															220	
70	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Tyr	Ile	Thr	Thr	Ile	Ala	Gly	Val	Met
															240	
75	Thr	Leu	Ser	Gln	Val	Lys	Gly	Phe	Val	Arg	Lys	Asn	Gly	Val	Asn	Glu
															255	
80	Ala	Lys	Ile	Asp	Glu	Ile	Lys	Asn	Asp	Asn	Val	Gln	Asp	Thr	Ala	Glu
															270	
85	Gln	Lys	Val	Gln	Leu	Leu	Arg	Asn	Trp	His	Gln	Leu	His	Gly	Lys	Lys
															285	
90	Glu	Ala	Tyr	Asp	Thr	Leu	Ile	Lys	Asp	Leu	Lys	Lys	Ala	Asn	Leu	Cys
															300	
95	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Gln	Thr	Ile	Ile	Leu	Lys	Asp	Ile	Thr	Ser
															320	
100	Asp	Ser	Glu	Asn	Ser	Asn	Phe	Arg	Asn	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Val	
															335	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:10:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 260 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

# ES 2 286 843 T3

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:11:

60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 595 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

# ES 2 286 843 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómica)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

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

ES 2 286 843 T3

	405	410	415
5	Arg Gln Lys Leu His Leu Cys Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys		
	420	425	430
10	Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg		
	435	440	445
15	Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met		
	450	455	460
20	Ser Gln Pro Leu Met Glu Thr Cys His Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu		
	465	470	475
25	Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Ala Ser Pro Ala Gly Gly Pro Ser Ser		
	485	490	495
30	Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr Glu His Thr Asn Asn		
	500	505	510
35	Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp Thr Val Ile Val Gly		
	515	520	525
40	Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly Leu Ala Gly Pro Ala		
	530	535	540
45	Glu Pro Glu Leu Glu Glu Leu Glu Ala Asp His Thr Pro His Tyr		
	545	550	555
50	Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser Cys Ser Asp Val Met		
	565	570	575
55	Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys Glu Asp Pro Leu Pro Thr Ala Ala		
	580	585	590
60	Ser Gly Lys		
	595		

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:12:

40	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
	(A) LONGITUD: 277 aminoácidos
	(B) TIPO: aminoácido
45	(C) CATEGORÍA: sencilla
	(D) TOPOLOGÍA: lineal
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
50	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:
	Met Val Arg Leu Pro Leu Gln Cys Val Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
	1 5 10 15
55	Ala Val His Pro Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu
	20 25 30
	Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val
	35 40 45
60	Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu
	50 55 60
	Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His
	65 70 75 80
65	Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr
	85 90 95

ES 2 286 843 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:13:

35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 255 aminoácidos
  - (B) TIPO: aminoácido
  - (C) CATEVARIEDAD: sencilla
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

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

# ES 2 286 843 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:14:

30	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
	(A) LONGITUD: 277 aminoácidos
	(B) TIPO: aminoácido
35	(C) CATENARIEDAD: sencilla
	(D) TOPOLOGÍA: lineal
40	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
45	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:
	Met Cys Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu 1 5 10 15
	Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val 20 25 30
	Gly Asp Thr Tyr Pro Ser Asn Asp Arg Cys Cys His Glu Cys Arg Pro 35 40 45
50	Gly Asn Gly Met Val Ser Arg Cys Ser Arg Ser Gln Asn Thr Val Cys 50 55 60
	Arg Pro Cys Gly Pro Gly Phe Tyr Asn Asp Val Val Ser Ser Lys Pro 65 70 75 80
55	Cys Lys Pro Cys Thr Trp Cys Asn Leu Arg Ser Gly Ser Glu Arg Lys 85 90 95
	Gln Leu Cys Thr Ala Thr Gln Asp Thr Val Cys Arg Cys Arg Ala Gly 100 105 110
60	Thr Gln Pro Leu Asp Ser Tyr Lys Pro Gly Val Asp Cys Ala Pro Cys 115 120 125
65	Pro Pro Gly His Phe Ser Pro Gly Asp Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp 130 135 140
	Thr Asn Cys Thr Leu Ala Gly Lys His Thr Leu Gln Pro Ala Ser Asn

# ES 2 286 843 T3

145	150	155	160
Ser Ser Asp Ala Ile Cys Glu Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro			
165 170 175			
5 Gln Glu Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr			
180 185 190			
10 Glu Ala Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Thr Arg Pro Val Glu			
195 200 205			
15 Val Pro Gly Gly Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val			
210 215 220			
Leu Gly Leu Leu Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu			
225 230 235 240			
20 Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly			
245 250 255			
Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Gln Ala Asp Ala His Ser			
260 265 270			
25 Thr Leu Ala Lys Ile			
275			

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 349 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

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

# ES 2 286 843 T3

5	Thr Val Ser Ser Ala Asp Lys Cys Glu Pro Val Pro Asn Asn Thr Phe 165 170 175
	Asn Tyr Ile Asp Val Glu Ile Thr Leu Tyr Pro Val Asn Asp Thr Ser 180 185 190
	Cys Thr Arg Thr Thr Gly Leu Ser Glu Ser Ile Leu Thr Ser 195 200 205
10	Glu Leu Thr Ile Thr Met Asn His Thr Asp Cys Asn Pro Val Phe Arg 210 215 220
	Glu Glu Tyr Phe Ser Val Leu Asn Lys Val Ala Thr Ser Gly Phe Phe 225 230 235 240
15	Thr Gly Glu Asn Arg Tyr Gln Asn Ile Ser Lys Val Cys Thr Leu Asn 245 250 255
	Phe Glu Ile Lys Cys Asn Asn Lys Gly Ser Ser Phe Lys Gln Leu Thr 260 265 270
20	Lys Ala Lys Asn Asp Asp Gly Met Met Ser His Ser Glu Thr Val Thr 275 280 285
	Leu Ala Gly Asp Cys Leu Ser Ser Val Asp Ile Tyr Ile Leu Tyr Ser 290 295 300
25	Asn Thr Asn Ala Gln Asp Tyr Glu Thr Asp Thr Ile Ser Tyr Arg Val 305 310 315 320
	Gly Asn Val Leu Asp Asp Asp Ser His Met Pro Gly Ser Cys Asn Ile 325 330 335
30	His Lys Pro Ile Thr Asn Ser Lys Pro Thr Arg Phe Leu 340 345

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:16:

- |    |   |
|----|---|
| 35 | (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:            |
|    | (A) LONGITUD: 355 aminoácidos                   |
|    | (B) TIPO: aminoácido                            |
| 40 | (C) CATENARIEDAD: sencilla                      |
|    | (D) TOPOLOGÍA: lineal                           |
|    | (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína                 |
| 45 | (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16: |

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

# ES 2 286 843 T3

	Gly Tyr Tyr Cys Phe Leu Lys Gly Ser Ser Gly Cys Lys Ala Cys Val	
	115 120 125	
5	Ser Gln Thr Lys Cys Gly Ile Gly Tyr Gly Val Ser Gly His Thr Pro	
	130 135 140	
	Thr Gly Asp Val Val Cys Ser Pro Cys Gly Leu Gly Thr Tyr Ser His	
10	145 150 155 160	
	Thr Val Ser Ser Val Asp Lys Cys Glu Pro Val Pro Ser Asn Thr Phe	
	165 170 175	
15	Asn Tyr Ile Asp Val Glu Ile Asn Leu Tyr Pro Val Asn Asp Thr Ser	
	180 185 190	
	Cys Thr Arg Thr Thr Thr Gly Leu Ser Glu Ser Ile Ser Thr Ser	
	195 200 205	
20	Glu Leu Thr Ile Thr Met Asn His Lys Asp Cys Asp Pro Val Phe Arg	
	210 215 220	
	Asn Gly Tyr Phe Ser Val Leu Asn Glu Val Ala Thr Ser Gly Phe Phe	
	225 230 235 240	
25	Thr Gly Gln Asn Arg Tyr Gln Asn Ile Ser Lys Val Cys Thr Leu Asn	
	245 250 255	
	Phe Glu Ile Lys Cys Asn Asn Lys Asp Ser Tyr Ser Ser Ser Lys Gln	
	260 265 270	
30	Leu Thr Lys Thr Lys Asn Asp Asp Asp Ser Ile Met Pro His Ser Glu	
	275 280 285	
	Ser Val Thr Leu Val Gly Asp Cys Leu Ser Ser Val Asp Ile Tyr Ile	
35	290 295 300	
	Leu Tyr Ser Asn Thr Asn Thr Gln Asp Tyr Glu Thr Asp Thr Ile Ser	
	305 310 315 320	
40	Tyr His Val Gly Asn Val Leu Asp Val Asp Ser His Met Pro Gly Arg	
	325 330 335	
	Cys Asp Thr His Lys Leu Ile Thr Asn Ser Asn Ser Gln Tyr Pro Thr	
	340 345 350	
45	His Phe Leu	
	355	

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:17:

50	(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:	
	(A) LONGITUD: 497 pares de bases	
	(B) TIPO: ácido nucleico	
55	(C) CATENARIEDAD: sencilla	
	(D) TOPOLOGÍA: lineal	
	(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)	
60	(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:	
	GGCACCGAGCA GGGTCCTGTN TCCGCCCTGA GCCGCGCTCT NCCTGCTCCA GCAAGGACCA	60
	TGAGGGCGCT GGAGGGGCCA GGCCTGTCCC TGCTGTCTTG GTGTTGGCGC TGCCTGCCCT	120
65	GCTGCCGGTG CCGGCTGTAC GCGGAGTGGC AGAAACACNN ACNTACCCCT GGCAGGACGN	180

# ES 2 286 843 T3

<pre> AGAGACAGGG GAGCGGCTGG TGTNTNCCCA NTGCCCCAG GCACCTTTNT GCAGGGCCG TGCCGNCGAG ACAGCCCCAC GACGTGTGGC CCGTNTCCAC CGCGCCACTA CACGCATTCT 5 GGAACCTACCT GGAGCGCTGN CCTTACTNCA ACGTCCTCTG CGGGGAGCGT NAGGAGGAGG CACGGGTTN CCACGNCAAC CACAACCGNG GNTTACCGTN GCCGNACCGG TTTCTTCGNG 10 GCAAGTTGGT TTTTNTTTG GAGNAAGGAT TCGTGTTNCA ATTNATTGAC GNAGTGATTN NNCNCGGGAA ACTNAAA </pre>	<b>240</b> <b>300</b> <b>360</b> <b>420</b> <b>480</b> <b>497</b>
---	--

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:18:

- 15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 191 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - 20 (C) CATENARIEDAD: sencilla
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

<pre> CCCAAATGCA CGGCCCTGGG ACTGGCCCTC AATGTGCCAG GNTCTTCCTC CCATGACACC CTGTGCACCA GCTGCCACTGG CTTCCCCCTC AGCACCAGGG TACCAAGAGC TGAGGAGTGT 30 GAGCNTGCCG TCATCGACTT TTTGGCTTTC CAGGACATCT CCATCAAGAGG CTGCAGCGG CTGCTCANGC C 191 </pre>	<b>60</b> <b>120</b> <b>180</b>
---	---------------------------------------

35 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:19:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CATENARIEDAD: sencilla
  - 45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

<pre> CGCCCATGGC AGAACACCC ACCTAC </pre>	<b>26</b>
--	-----------

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:20:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 26 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - (C) CATENARIEDAD: sencilla
  - 60 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

<pre> CGCAAGCTT TCTTCAGTG CAAGTG </pre>	<b>26</b>
---	-----------

# ES 2 286 843 T3

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:21:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
5 (A) LONGITUD: 28 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CATENARIEDAD: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

15 CGCAAGCTTC TCCTCAGCTC CTGCAGTG

28

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:22:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 36 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CATENARIEDAD: sencilla  
25 (D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

CGCGGATCCG CCATCATGAG GGCAGTGGAGG GGCCAG

36

## (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:23:

- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
(A) LONGITUD: 26 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
40 (C) CATENARIEDAD: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

CGCGGTACCC TCTTCAGTG CAAGTG

26

## 50 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO:24:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:  
55 (A) LONGITUD: 28 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) CATENARIEDAD: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal  
60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:24:

CGCGGTACCC TCCTCAGCTC CTGCAGTG

28

65