



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 286 856**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/715 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98944859 .2**

(86) Fecha de presentación : **11.09.1998**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1012282**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **28.06.2000**

(54) Título: **Receptores TRAIN ricos en cisteína.**

(30) Prioridad: **12.09.1997 US 58631 P**
06.05.1998 US 84422 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

(73) Titular/es: **Biogen Idec MA Inc.**
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US
Apotech R&D S.A.

(72) Inventor/es: **Tschopp, Jurg y**
Hession, Catherine

(74) 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 TRAIN ricos en cisteína.

5 Fundamento de la invención

La presente invención se refiere a nuevos receptores en la familia del factor de necrosis tumoral (en lo sucesivo, abreviadamente TNF por la expresión inglesa *Tumor Necrosis Factor*). Se ha identificado un nuevo receptor que en la presente memoria se denomina TRAIN.

La familia del TNF consiste en pares de ligandos y sus receptores específicos denominados ligandos de la familia del TNF y receptores de la familia del TNF (Bazzoni and Beutler, 1996). La familia está implicada en la regulación del sistema inmune y posiblemente en otros sistemas no inmunológicos. La regulación se efectúa con frecuencia a un nivel de "interruptor general", de tal modo que la señalización de la familia del TNF puede dar como resultado un gran número de episodios subsiguientes tipificados mejor por el TNF. El TNF puede iniciar la respuesta inflamatoria protectora general de un organismo a una invasión extraña que implica la presentación alterada de moléculas de adhesión involucradas en el tráfico de células, la producción de quimioquinas para conducir células específicas a compartimientos específicos y la iniciación (cebado) de diversas células efectoras. En consecuencia, la regulación de estas vías tiene potencial clínico.

La familia de receptores del TNF es una colección de proteínas relacionadas que consiste en general en un dominio extracelular, un dominio transmembránico y un dominio de señalización intracelular. El dominio extracelular está constituido por 2-6 copias de un dominio unido fuertemente por disulfuro y es reconocido basándose en la disposición única de los residuos de cisteína. Cada receptor se une a un ligando correspondiente aunque un ligando puede compartir varios receptores. En algunos casos, es evidente que por corte y empalme alternativo del RNA, existen de manera natural formas solubles de los receptores que carecen de las regiones transmembránicas y los dominios intracelulares. Además, en la naturaleza, existen versiones truncadas de estos receptores y la forma inhibidora soluble puede tener funciones reguladoras biológicas directas. Evidentemente, los virus han usado esta táctica para inhibir la actividad del TNF en sus organismos hospedantes (Smith, 1994). Estos receptores pueden señalar un sinnúmero de episodios incluyendo las señales de diferenciación celular, muerte celular o supervivencia celular. La señalización de la muerte celular es desencadenada frecuentemente por uniones relativamente directas a la cascada de caspasas de las proteasas, por ejemplo, los receptores de Fas y del TNF. La mayoría de los receptores de esta clase pueden también activar episodios controlados por el factor nuclear kappa B (abreviadamente NFkB por la expresión inglesa *Nuclear Factor Kappa B*).

Un tema emergente en la familia de receptores del TNF ha sido el uso por la naturaleza de ambos receptores de longitud completa con dominios intracelulares que transmiten una señal y formas alternativas que son segregadas o carecen de un dominio de señalización intracelular. Estas últimas formas pueden inhibir la señalización de ligandos y por consiguiente pueden impedir una respuesta biológica. Existen varios ejemplos de este fenómeno. En primer lugar, el receptor p75 del TNF es segregado fácilmente después de la escisión selectiva de la membrana y a continuación actúa bloqueando la acción del TNF. Es probable que la naturaleza haya desarrollado este sistema para amortiguar la actividad del TNF. Un segundo ejemplo lo proporciona el sistema receptor TRAIL-TRAIL en el que existen 4 genes separados que codifican los receptores TRAIL (1-3). Dos de estos, TRAIL-R1 y TRAIL-R2, poseen dominios intracelulares y señal de transducción. Un tercer receptor (TRAIL-R4) posee un dominio intracelular pero este dominio no tienen los elementos encontrados en R1 y R2, por ejemplo, carece de un dominio capaz de señalar la muerte celular. Por último, hay un cuarto receptor, TRAIL-R3, que es esencialmente una forma soluble pero permanece unido por un enlace glicopéptico. Por lo tanto este receptor puede unir ligandos pero es incapaz de transmitir una señal, es decir es efectivamente un receptor señuelo. Un tercer ejemplo lo proporciona el sistema osteoprotegerina (OPG) en el que el receptor OPG carece de un dominio transmembránico y es segregado en el medio (4-6). Este receptor puede bloquear la señalización necesaria para inducir la diferenciación de los osteoclastos uniéndose posiblemente a un ligando denominado RANK-L. El sistema TRAIN descrito en la presente memoria se parece al paradigma de OPG en que puede ser segregada una versión corta que inhibiría la unión del TRAIN-L natural (actualmente desconocido) al TRAIN de longitud completa produciendo una señal.

Los receptores son potentes herramientas para dilucidar vías biológicas por su fácil conversión en proteínas de fusión con inmunoglobulinas. Estas formas dímeras de receptores solubles son buenas inhibidoras de episodios mediados por ligandos segregados o unidos a la superficie. La unión a estos ligandos evita que el ligando interactúe con receptores asociados a células que puedan señalar. Estas proteínas de fusión receptor-Ig no sólo son útiles en un sentido experimental, sino que han sido empleadas con éxito clínicamente en el caso de TNF-R-Ig para tratar el síndrome de intestino inflamado, la artritis reumatoidea y el síndrome clínico agudo que acompaña la administración de OKT3 (Eason *et al.*, 1996; Feldmann *et al.*, 1996; van Dulleman *et al.*, 1995). Puede suponerse que la manipulación de muchos episodios mediados por la señalización a través de la familia de receptores del TNF tendrá amplia aplicación en el tratamiento de enfermedades inmunológicas y también en la amplia gama de enfermedades humanas que tienen secuelas patológicas debido a la implicación del sistema inmune. Una forma soluble del receptor recientemente descrito, la osteoprotegerina, puede bloquear la pérdida de masa ósea y, por consiguiente, los episodios controlados por la señalización del receptor de la familia del TNF no están necesariamente limitados a la regulación del sistema inmune. Los anticuerpos para el receptor pueden bloquear la unión al ligando y por consiguiente también pueden tener aplicación clínica. Dichos anticuerpos tienen con frecuencia larga vida y pueden presentar ventajas respecto a las proteínas de fusión receptor-Ig solubles que tienen semividas en la sangre más cortas.

Aunque la inhibición de la vía mediada por el receptor representa la aplicación terapéutica más explotada de estos receptores, al principio fue la activación de los receptores del TNF la que mostró buenas perspectivas clínicas (Aggarwal and Natarajan, 1996). La activación de los receptores del TNF pueden iniciar la muerte celular en la célula diana y por consiguiente la aplicación a tumores era y todavía es atractiva (Eggermont *et al.*, 1996). El receptor puede ser activado por administración del ligando, es decir la vía natural, o de algunos anticuerpos que pueden interactuar con el receptor son también potentes agonistas. Los anticuerpos tendrían ventajas en oncología, puesto que pueden persistir en la sangre durante largos periodos mientras que los ligandos generalmente tienen un corto periodo de vida en la sangre. Como muchos de estos receptores pueden expresarse más selectivamente en los tumores o pueden señalar sólo la muerte celular o la diferenciación en los tumores, los anticuerpos agonistas podrían ser buenas armas en el tratamiento del cáncer. Igualmente, muchos episodios inmunológicos positivos están mediados por los receptores de la familia del TNF, por ejemplo las reacciones inflamatorias en el hospedante, la producción de anticuerpos, etc., y por consiguiente los anticuerpos agonistas podrían tener efectos beneficiosos en otras aplicaciones no oncológicas.

Paradójicamente, la inhibición de una vía puede tener ventajas clínicas en el tratamiento de tumores. Por ejemplo el ligando Fas es expresado por algunos tumores y esta expresión puede conducir a la muerte de los linfocitos positivos a Fas, facilitando de este modo la capacidad del tumor para eludir el sistema inmune. En este caso, la inhibición del sistema Fas podría permitir al sistema inmune reaccionar con el tumor de otros modos ahora que el acceso es posible (Green and Ware, 1997).

Los receptores son también útiles para descubrir el ligando correspondiente ya que pueden servir como sondas del ligando en las técnicas de clonación por expresión (Smith *et al.*, 1993). Igualmente, los receptores y ligandos pueden someterse a valoraciones de unión *in vitro* lo que permitirá la identificación de sustancias inhibitoras. Dichas sustancias pueden formar la base de nuevos inhibidores de las vías.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra las secuencias de nucleótidos del receptor TRAIN humano de un material compuesto por dos clones lambda gt10 (GJ159 y G3158).

La Figura 2 muestra una comparación de la longitud del receptor TRAIN humano (parte superior) y del receptor TRAIN de muridos (parte inferior).

La Figura 3 muestra las secuencias de nucleótidos del receptor TRAIN humano de un subclón del cDNA de lambda gt10.

La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos del receptor TRAIN humano correspondiente a la secuencia de nucleótidos de la Figura 1.

La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos del receptor TRAIN humano correspondiente a la secuencia de nucleótidos de la Figura 3.

A. Definiciones

“Homólogo”, como se usa en la presente memoria, se refiere a la similitud entre las secuencias de las moléculas que se comparan. Cuando una posición en ambas de las dos secuencias comparadas está ocupada por la misma subunidad monómera de base o aminoácido, por ejemplo, si una posición en una de las dos moléculas de DNA está ocupada por adenina, entonces las moléculas son homólogas en dicha posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias está en función del número de posiciones equivalentes u homólogas compartidas por las dos secuencias dividido por el número de posiciones comparadas x 100. Por ejemplo, si en dos secuencias 6 de 10 posiciones son equivalentes u homólogas las dos secuencias son 60% homólogas. Como ejemplo, las secuencias de DNA, ATTGCC y TATGGC, presentan una homología del 50%. En general, se realiza una comparación cuando dos secuencias están alineadas dando una homología máxima.

Una “preparación purificada” o una “preparación sustancialmente pura” de un polipéptido, como se usa en la presente memoria, significa un polipéptido que ha sido separado de otras proteínas, lípidos y ácidos nucleicos con los que se encuentra de forma natural. Preferiblemente, el polipéptido también se separa de otras sustancias, por ejemplo, anticuerpos, matrices, etc., que se usan para purificarlo.

“Hospedante transformado” como se usa en la presente memoria significa que abarca cualquier hospedante con secuencias establemente integradas, es decir, secuencias TRAIN, introducidas en su genoma o un hospedante que posee elementos episómicos que codifican dichas secuencias, es decir el receptor.

Un “tratamiento”, como se usa en la presente memoria, incluye cualquier tratamiento terapéutico, por ejemplo, la administración de una sustancia o agente terapéutico, por ejemplo, un fármaco.

Un “ácido nucleico sustancialmente puro”, por ejemplo, un DNA sustancialmente puro, es un ácido nucleico que cumple una o ambas de las siguientes condiciones: (1) no está inmediatamente contiguo con una o ambas de las secuencias, por ejemplo, secuencias codificadoras, con las que está inmediatamente contiguo (es decir, una en el

extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma que existe de forma natural en el organismo del que procede el ácido nucleico; o (2) está sustancialmente exento de una secuencia de ácidos nucleicos con la cual está presente en el organismo del que procede el ácido nucleico. La expresión incluye, por ejemplo, un DNA recombinante que está incorporado en un vector, por ejemplo, en un plásmido o virus autónomamente replicante, o al DNA genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un cDNA o un fragmento de DNA genómico producido por PCR o tratamiento con endonucleasas de restricción) independiente de otras secuencias de DNA. DNA sustancialmente puro incluye también un DNA recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica TRAIN.

Los términos "péptidos", "proteínas" y "polipéptidos" se usan en la presente memoria de forma intercambiable.

"Biológicamente activo" como se usa en la presente memoria, significa que tiene una actividad *in vivo* o *in vitro* que puede manifestarse directa o indirectamente. Los fragmentos biológicamente activos de TRAIN pueden tener, por ejemplo, una homología de aminoácidos del 70% con el sitio activo del receptor, más preferiblemente al menos el 80%, y más preferiblemente, al menos del 90%. La identidad u homología con el receptor se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos de TRAIN en SEQ. ID. NO. 3.

La práctica de la presente invención empleará, salvo indicación contraria, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, DNA recombinante e inmunología, que están al alcance de los expertos en la técnica. Dichos métodos están descritos en la bibliografía.

La invención reivindicada se refiere a un nuevo receptor denominado TRAIN-R. La secuencia de aminoácidos de TRAIN-R de múridos está recogida en la SEQ. ID. NO. 1 (la forma corta) y la SEQ. ID. NO. 2 (la forma larga). La longitud completa de la secuencia de aminoácidos de TRAIN-R humano está recogida en la SEQ. ID. NO. 3 y en la Figura 1. Como se muestra en la Figura 1, la longitud de la proteína es 417 aminoácidos. La secuencia señal predicha comprende los residuos 1 - 25. Se cree que el extremo N maduro está en el residuo de aminoácidos 26, el dominio extracelular abarca los residuos 26 -173, el dominio transmembránico abarca los residuos 174 - 190 y el dominio citoplásmico abarca los residuos 191 - 417. Existe un sitio potencial de glicosación unido al extremo N en el residuo 105.

La SEQ. ID. NO. 4 representa la secuencia de aminoácidos de 30 aminoácidos del extremo carboxi de una forma segregada de TRAIN-R humano de un subclón de cDNA de lambda gt10 (GJ156). Esta secuencia peptídica comprende 30 aminoácidos que son idénticos a los aminoácidos 121 - 149 de la proteína compuesta mostrada en la Figura 1 y son idénticos a los aminoácidos 121 - 150 del extremo C de la forma corta del TRAIN-R de múridos (proteína segregada). La SEQ. ID. NO 9 muestra la secuencia de aminoácidos de la forma segregada corta completa del TRAIN-R humano basado en el exón clonado alternativo y por comparación con la forma corta de ratón.

La Figura 2 muestra una comparación de los primeros 214 aminoácidos de TRAIN-R humano (417 aa) y la forma larga de TRAIN-R de múridos (214 aa). Como se muestra en la Figura, las dos secuencias tienen una identidad de aproximadamente 81,8%.

Los receptores TRAIN de la invención pueden aislarse de tejidos de mamíferos y purificarse hasta homogeneidad, o aislarse de células que contienen TRAIN-R unido a una membrana y purificarse hasta homogeneidad. Los métodos para el cultivo de las células y el aislamiento de los extractos celulares son muy conocidos en la técnica, así como los diversos tipos de células y métodos de cultivo y aislamiento. En general, cualquier TRAIN-R puede aislarse de cualquier célula o tejido que exprese esta proteína usando una sonda de cDNA, aislando el mRNA y transcribiendo el mRNA en cDNA. A continuación puede producirse la proteína insertando el cDNA en un vector de expresión, tal como un virus, plásmido, cósmido u otro vector de expresión, insertando el vector de expresión en una célula y haciendo proliferar las células resultantes. El TRAIN-R puede aislarse a continuación del medio o extracto celular por métodos bien conocidos en la técnica. Los expertos en la técnica pueden variar fácilmente los vectores y líneas celulares obteniendo sin embargo los receptores reivindicados. Alternativamente, los receptores TRAIN pueden sintetizarse químicamente usando las secuencias recogidas en las SEQ. ID. NOS. 1, 2, 3 ó 4.

Se cree que el TRAIN-R de múridos se expresa mayoritariamente en el cerebro y pulmón y a menor nivel en hígado, músculo esquelético y riñón. El modelo de expresión de TRAIN-R humano difiere en que ha sido detectado un bajo nivel de expresión en cada tejido y línea celular ensayados hasta ahora (ubicuo) detectando una expresión significativamente mayor en corazón, próstata, ovario, testículos, linfocitos de la sangre periférica (PBL), tiroides y glándula suprarrenal.

El TRAIN-R de múridos puede existir en la naturaleza en forma natural soluble como se indica en SEQ. ID. NO. 1. El TRAIN-R humano puede existir como forma natural soluble que tiene la secuencia en el extremo carboxi indicada en la SEQ. ID. NO. 4 y en la Figura 3. La proteína soluble debe inhibir la señalización por la longitud completa de TRAIN-R.

La presente invención también abarca las secuencias de DNA que codifican los receptores TRAIN de múridos (tanto largos como cortos) y humanos (longitud completa y extremo carboxi). Estas secuencias de DNA están recogidas en las SEQ. ID. NOS. 5, 6, 7 y 8, respectivamente. La secuencia de TRAIN-R humano en SEQ. ID. NO. 7 contiene

5'UTR, una región codificadora completa, un codón de parada y algo de 3'UTR. La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de TRAIN-R humano derivada de una secuencia mixta de GJ159 y G3158. Como se muestra en la Figura 1, el TRAIN-R humano tiene una longitud de secuencia de nucleótidos de 2185, una región codificadora de 179 - 1429, y un codón de parada en 1430 - 1432.

La secuencia de TRAIN-Ren SEQ. ID. NO. 8 contiene una secuencia del intrón, un exón que codifica los 30 aminoácidos del extremo carboxi de una forma segregada de TRAIN-R humano, un codón de parada y 3'UTR. Como se muestra en la Figura 3, se cree que el intrón está en los residuos 1 - 350, la región codificadora en 352 - 441, el codón de parada en 442 - 444 y 3'UTR = 445 - 791.

La invención en ciertas realizaciones se refiere además a secuencias de DNA que codifican los receptores TRAIN en los que las secuencias están unidas operativamente a una secuencia de control de la expresión. Cualquiera de las secuencias de control de la expresión adecuadas es útil en la invención reivindicada y puede ser seleccionada fácilmente por los expertos en la técnica.

La invención comprende también los DNA recombinantes que comprenden una secuencia que codifica los receptores TRAIN o sus fragmentos, así como los hospedantes en los que se ha introducido en su genoma secuencias de TRAIN-R establemente integradas, o que poseen elementos episómicos. En la invención puede usarse cualquier hospedante adecuado que puede ser seleccionado fácilmente por el experto en la técnica sin excesiva experimentación.

La invención reivindicada en ciertas realizaciones abarca los TRAIN-R recombinantes. Los expertos en la técnica pueden aislar fácilmente dichos receptores recombinantes proporcionando con ello polipéptidos TRAIN-R recombinantes sustancialmente puros. Los receptores aislados de la invención están sustancialmente exentos de otros materiales contaminantes de origen natural o endógeno, y contienen menos de aproximadamente 10-15% en masa de contaminantes proteicos residuales de procesos de producción.

Los receptores de mamíferos que están dentro del alcance de la invención también incluyen, TRAIN-R de primates, seres humanos, muridos, caninos, felinos, bovinos, ovinos, equinos y porcinos, aunque sin estar limitados a ellos. Los receptores de mamíferos también pueden obtenerse por hibridación de especies cruzadas usando cDNA monocatenario procedente de TRAIN-R humano. Las secuencias de DNA de la invención pueden usarse como sonda de hibridación para aislar los cDNA del receptor de otras colecciones de cDNA de mamíferos.

Los derivados de los receptores que están dentro del alcance de la invención también incluyen diversas formas estructurales de las proteínas de SEQ. ID. NOS. 1, 2, 3 y 4 que retienen la actividad biológica. Por ejemplo, una proteína receptora puede estar en forma de sales ácidas o básicas, o puede estar en forma neutra. Los residuos de aminoácidos individuales pueden ser también modificados por oxidación o reducción.

Los derivados de los receptores pueden usarse también como agentes inmunógenos, reactivos en un inmunoensayo basado en los receptores o como agentes de unión para procedimientos de purificación por afinidad de ligandos de TRAIN.

La presente invención también incluye TRAIN-R con o sin asociación de la glicosilación del modelo natural. Los expertos en la técnica comprenderán que el modelo de glicosilación en el receptor puede variar dependiendo del sistema de expresión particular utilizado. Por ejemplo, típicamente, la expresión en bacterias, tal como *E. coli* da como resultado una molécula no glicosilada. Los derivados de TRAIN-R pueden obtenerse también por mutaciones de los receptores o de sus subunidades. Un mutante, como se denomina en la presente memoria, es un polipéptido homólogo a un receptor reivindicado pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la secuencia natural debido a delección (supresión), inserción o sustitución.

Pueden construirse análogos bioequivalentes de las proteínas del receptor, por ejemplo, realizando diversas sustituciones de residuos o secuencias o suprimiendo residuos o secuencias terminales o internos no necesarios para la actividad biológica. Por ejemplo, con frecuencia pueden suprimirse o sustituirse los residuos de cisteína por otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos por renaturalización. Otros métodos de mutagénesis implicaban las modificaciones, por ejemplo, para mejorar la expresión en el sistema de expresión elegido.

Los receptores solubles de la invención pueden comprender subunidades que han sido cambiadas desde una membrana unida a una forma soluble. De esta manera, los péptidos solubles pueden producirse truncando el polipéptido para separar, por ejemplo, la cola citoplásmica y/o la región transmembránica. Alternativamente, el dominio transmembránico puede ser inactivado por delección o por sustituciones de los residuos aminoácidos normalmente hidrófobos que comprenden un dominio transmembránico por otros hidrófilos. En cualquier caso, se crea un perfil de hidropatía sustancialmente hidrófila que reducirá la afinidad lipídica y mejorará la solubilidad acuosa. Se prefiere la delección del dominio transmembránico a la sustitución por residuos de aminoácidos hidrófilos debido a que se evita la introducción de epítomos potencialmente inmunógenos. Los receptores solubles de la invención pueden incluir en el extremo N cualquier número de secuencias delanteras bien conocidas. Dicha secuencia permitiría que los péptidos se expresaran y fueran dianas en la vía de secreción en un sistema eucariota.

La invención proporciona agentes, tales como agonistas y antagonistas, dirigidos contra los receptores reivindicados. En ciertas realizaciones de esta invención, el agente comprende un agente bloqueador que comprende un anticuerpo dirigido contra el TRAIN-R que inhibe la señalización del receptor TRAIN. Preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Igualmente, la invención reivindicada abarca anticuerpos y otros agentes que actúan como agonistas en las vías de TRAIN.

Los anticuerpos anti-TRAIN-R inhibidores y otros agentes bloqueadores de los receptores pueden identificarse usando métodos de escrutinio que detectan la capacidad de uno o más agentes para unirse al TRAIN-R, o a sus ligandos, o para inhibir los efectos de señalización de TRAIN-R en las células.

Los expertos en la técnica conocerán varios ensayos que miden la fuerza de la unión ligando-receptor y que pueden usarse para realizar ensayos de competencia con supuestos agentes bloqueadores del receptor TRAIN. La fuerza de unión entre un receptor y un ligando puede medirse usando un ensayo inmunoquímico (ELISA) o un radioinmunoensayo (RIA). La unión específica también puede medirse por complejos anticuerpo-antígeno marcados fluorescentemente y realizando un análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), o realizando otro de dichos métodos de inmunodetección, los cuales son todos bien conocidos en la técnica.

Con cualquiera de estas u otras técnicas para medir las interacciones receptor-ligando, los expertos en la técnica pueden evaluar la capacidad de un agente bloqueante, sólo o en combinación con otros agentes, para inhibir la unión de ligandos a las moléculas del receptor. Dichos ensayos pueden usarse también para analizar los agentes bloqueantes o derivados de dichos agentes, es decir fusiones, quimeras, mutantes o formas alteradas químicamente, para optimizar la capacidad de los agentes para bloquear la activación del receptor.

Los agentes bloqueantes del receptor de la invención en una realización comprenden moléculas del receptor TRAIN solubles. Utilizando la información secuencial de la presente memoria y técnicas de DNA recombinante bien conocidas, pueden clonarse en un vector fragmentos funcionales que codifican el dominio de unión del ligando y el receptor TRAIN y expresarse en un hospedante apropiado para producir una molécula del receptor soluble. Las moléculas del receptor TRAIN solubles que pueden competir con los receptores TRAIN naturales para la unión con el ligando de acuerdo con los ensayos descritos en la presente memoria pueden seleccionarse como agentes bloqueantes del receptor TRAIN.

Un receptor TRAIN soluble que comprende secuencias de aminoácidos seleccionadas entre las mostradas en la presente memoria puede unirse a uno o más dominios de proteínas heterólogas ("dominios de fusión") para aumentar la estabilidad *in vivo* de la proteína de fusión del receptor o para modular su actividad biológica o localización.

Preferiblemente, se usan proteínas plasmáticas estables -que tienen típicamente una semi-vida mayor que 20 horas en la circulación de un mamífero- para construir las proteínas de fusión del receptor. Dichas proteínas del plasma incluyen inmunoglobulinas, seroalbúmina, lipoproteínas, apolipoproteínas y transferrina, aunque sin estar limitadas a ellas. También pueden unirse al dominio de unión del ligando y receptor secuencias que puede dirigir el receptor soluble a un tipo de célula o tejido particular para crear una proteína de fusión del receptor soluble específicamente localizada.

Toda la región extracelular del receptor TRAIN, o uno de sus fragmentos funcionales, que comprende el dominio de unión del ligando y el receptor TRAIN, puede fusionarse a una región constante de inmunoglobulina similar al dominio Fc de una cadena pesada de IgG1 humana. Las proteínas de fusión receptor-IgG solubles son generalmente reactivos inmunológicos y los métodos para su construcción son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo la Patente de EE.UU. N°. 5.225.538).

Un dominio funcional de la unión del ligando y TRAIN-R puede fusionarse a un dominio Fc de inmunoglobulina (Ig) derivado de una clase o subclase de inmunoglobulina distinta de IgG1. Los dominios Fc de anticuerpos que pertenecen a diferentes clases o subclases de Ig pueden activar diversas funciones efectoras secundarias. La activación se produce cuando el dominio Fc se une por un receptor Fc correspondiente. Las funciones efectoras secundarias incluyen la capacidad de activar el sistema del complemento, atravesar la placenta y unirse a diversas proteínas microbianas. Las propiedades de las diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas están descritas en la técnica.

La activación del sistema del complemento inicia cascadas de reacciones enzimáticas que median la inflamación. Los productos del sistema del complemento poseen una variedad de funciones, incluyendo la unión de bacterias, endocitosis, fagocitosis, citotoxicidad, producción de radicales libres y solubilización de complejos inmunes.

La cascada de las enzimas del complemento puede ser activada por los dominios Fc de los anticuerpos IgG1, IgG3 e IgM unidos al antígeno. Parece que el dominio Fc de IgG2 es menos eficaz y los dominios Fc de IgG4, IgA, IgD e IgE son ineficaces en la activación del complemento. De esta manera puede seleccionarse un dominio Fc basándose en si sus funciones efectoras secundarias asociadas son deseables para la respuesta inmune particular o para la enfermedad que ha de tratarse con la proteína de fusión con el receptor.

Si fuera ventajoso dañar o matar la célula diana que lleva el ligando de TRAIN, podría seleccionarse, por ejemplo, un dominio Fc (IgG1) especialmente activo para formar la proteína de fusión. Alternativamente, si fuera deseable

dirigir la fusión receptor TRAIN - Fc a una célula sin desencadenar el sistema del complemento, podría seleccionarse un dominio IgC4 Fc inactivo.

En la técnica se han descrito mutaciones en los dominios Fc que reducen o eliminan la unión a los receptores Fc y la activación del complemento. Pueden usarse estas u otras mutaciones, solas o en combinación, para optimizar la actividad del dominio Fc usado para construir la proteína de fusión receptor TRAIN - Fc.

Los expertos en la técnica apreciarán que diferentes residuos de aminoácidos que forman el punto de unión de la proteína de fusión receptor-Ig pueden alterar la estructura, estabilidad y finalmente la actividad biológica de la proteína de fusión del receptor TRAIN soluble. Pueden añadirse uno o más aminoácidos al extremo C del fragmento seleccionado del receptor TRAIN para modificar el punto de unión con el dominio de fusión seleccionado.

El extremo N de la proteína de fusión del receptor TRAIN puede variarse también cambiando la posición en la que es escindido el fragmento de DNA del receptor TRAIN seleccionado en su extremo 5' para inserción en el vector de expresión recombinante. La estabilidad y actividad de cada proteína de fusión del receptor TRAIN puede analizarse y optimizarse usando la experimentación habitual y los ensayos para seleccionar los agentes bloqueantes descritos en la presente memoria.

Usando las secuencias del dominio de unión del receptor TRAIN dentro del dominio extracelular como se muestra en la presente memoria, también pueden construirse variantes de las secuencias de aminoácidos para modificar la afinidad de las moléculas del receptor TRAIN solubles por sus ligandos. Las moléculas solubles de esta invención pueden competir por la unión con receptores endógenos. Se considera que cualquier molécula soluble que comprende un dominio de unión del ligando al receptor TRAIN que puede competir con los receptores naturales para la unión al ligando es un agente bloqueante del receptor que está incluido en el alcance de la presente invención.

En otras realizaciones de esta invención, los anticuerpos dirigidos contra los receptores TRAIL y TRAIN (anticuerpos anti-TRAIN-R) actúan como agentes bloqueantes de receptores. Los anticuerpos de esta invención pueden ser policlonales o monoclonales y pueden ser modificados para optimizar su capacidad para bloquear la señalización de TRAIN-R, su biodisponibilidad, estabilidad u otros rasgos deseados.

Los sueros de anticuerpos policlonales dirigidos contra TRAIN-R se preparan por técnicas convencionales inyectando por vía subcutánea proteína de fusión TRAIN-R-Fc en adyuvante de Freund a animales, tales como cabras, conejos, ratas, hámsteres o ratones, seguido por inyección de recuerdo por vía intraperitoneal o subcutánea en adyuvante de Freund incompleto. A continuación los antisueros policlonales que contienen los anticuerpos deseados dirigidos contra los receptores TRAIN pueden escrutarse por procedimientos inmunológicos convencionales.

También pueden prepararse diversas formas de anticuerpos anti-TRAIN-R por técnicas estándares de DNA recombinante. Por ejemplo, pueden construirse anticuerpos "quiméricos" en los que el dominio de unión al antígeno procedente de un anticuerpo animal está unido a un dominio constante humano. Los anticuerpos quiméricos reducen las respuestas inmunógenas observadas provocadas por los anticuerpos animales cuando se usan en tratamientos clínicos humanos.

Además, pueden sintetizarse anticuerpos "humanizados" recombinantes que pueden reconocer el TRAIN-R. Los anticuerpos humanos son quimeras que comprenden en su mayor parte secuencias IgG humanas en las que han insertado las regiones responsables de la unión específica al antígeno (véase por ejemplo, el documento WO 94/04679). Se inmunizan los animales con el antígeno deseado, se aíslan los anticuerpos correspondientes y se separa la porción de las secuencias de la región variable responsable de la unión específica al antígeno. A continuación las regiones de unión al antígeno procedentes de animales se clonan en la posición apropiada de los genes de los anticuerpos humanos en los que han sido suprimidas las regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos humanizados minimizan el uso de secuencias heterólogas (entre especies) en anticuerpos humanos y es menos probable que provoquen respuestas inmunes en los mamíferos en tratamiento.

La construcción de diferentes clases de anticuerpos anti-TRAIN-R recombinantes puede también realizarse preparando anticuerpos quiméricos o humanizados que comprendan los dominios variables anti-R y los dominios constantes humanos procedentes de diferentes clases de inmunoglobulinas. Por ejemplo, los anticuerpos IgM anti-TRAIN-R con mayores sitios de unión al antígeno pueden producirse recombinantemente clonando el sitio de unión al antígeno en vectores que llevan las regiones constantes de la cadena μ humana.

Además, pueden usarse técnicas estándares de DNA recombinante para alterar las afinidades de unión de los anticuerpos recombinantes con sus antígenos alterando los residuos de aminoácidos en la proximidad de los sitios de unión al antígeno. La afinidad de unión del antígeno de un anticuerpo humanizado puede aumentarse por mutagénesis basada en modelado molecular.

Puede ser deseable aumentar o disminuir la afinidad de anticuerpos anti-TRAIN-R para los receptores dependiendo del tipo de tejido diana o el programa de tratamiento particular considerado. Por ejemplo, puede ser ventajoso tratar un paciente con niveles constantes de anticuerpos anti-receptor con capacidad reducida para señalizar por medio de la vía para tratamientos semi-profilácticos. Análogamente, los anticuerpos anti-TRAIN-R inhibidores con mayor afinidad para los receptores pueden ser ventajosos para tratamientos a corto plazo.

La invención reivindicada en otras realizaciones abarca composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de un agente bloqueante o activante de TRAIN-R y vehículos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones de la invención se administrarán a una dosis eficaz para tratar el estado clínico particular considerado. La determinación de una formulación farmacéutica preferida y de un régimen de dosis terapéuticamente eficaz para una aplicación dada la puede tomar el experto en la técnica teniendo en cuenta, por ejemplo, el estado y peso del paciente, la extensión del tratamiento deseado y la tolerancia del paciente al tratamiento. Se espera que dosis de aproximadamente 1 mg/kg de un TRAIN-R soluble sean puntos de partida adecuados para optimizar las dosificaciones del tratamiento.

También puede evaluarse la determinación de una dosis terapéuticamente eficaz realizando experimentos *in vitro* para medir la concentración del agente bloqueante o activante. Son útiles los ensayos de unión descritos en la presente memoria, así como otros ensayos conocidos en la técnica.

La administración de los agentes activantes o bloqueantes solubles, solos o en combinación, incluyendo las formas aisladas y purificadas, sus sales o sus derivados farmacéuticamente aceptables, puede llevarse a cabo por cualquiera de los modos de administración de agentes convencionalmente aceptados que presentan actividad inmunosupresora.

Ejemplos

20 Generación de formas solubles del receptor

Para formar un inhibidor del receptor para uso en seres humanos, se requiere la secuencia de cDNA del dominio extracelular del receptor humano. Si es conocida la forma del ratón, pueden escrutarse fácilmente colecciones de cDNA humanos usando la secuencia de cDNA de ratón y dichas manipulaciones se efectúan habitualmente en este campo. Con una secuencia de cDNA humano, pueden diseñarse iniciadores oligonucleotídicos para amplificar por PCR el dominio extracelular del receptor en ausencia de los dominios transmembránico e intracelular. Típicamente, se incluye la mayor parte de los aminoácidos entre el último “dominio del TNF” unido por disulfuro y el dominio transmembránico. Podría variarse la cantidad de región “del tallo” incluida para optimizar la actividad del receptor soluble resultante. Este trozo ampliado sería transformado por ingeniería para incluir sitios de restricción adecuados que permitieran la clonación en diversos vectores quiméricos de fusión con Ig en el extremo C. Alternativamente, podría insertarse una señal de parada en el extremo 3’ y preparar una forma soluble del receptor sin recurrir al uso de un método con una quimera de fusión con Ig. Los vectores resultantes pueden expresarse en la mayoría de los sistemas usados en biotecnología incluyendo levadura, células de insectos, células de bacterias y mamíferos y existen ejemplos de todos los tipos de expresión. Pueden unirse diversos dominios Fc humanos para optimizar o eliminar las interacciones de FcR y del complemento según se desee. Alternativamente, pueden usarse formas mutadas de estos dominios Fc para eliminar selectivamente las interacciones de FcR o del complemento o la unión de azúcares unidos en N al dominio Fc, lo que tiene ciertas ventajas.

40 Generación de anticuerpos agonistas o antagonistas

Las formas solubles del receptor descritas anteriormente pueden usarse para inmunizar ratones y obtener anticuerpos monoclonales por métodos convencionales. Los anticuerpos monoclonales resultantes que fueron identificados por métodos ELISA pueden ser escrutados para la actividad agonista como anticuerpos solubles o inmovilizados en plástico por diversos ensayos celulares *in vitro*. Con frecuencia la muerte de la línea de células HT29 es un sistema conveniente que es sensible a la señalización por medio de muchos receptores de TNF. Si esta línea no posee el receptor de interés, la longitud completa de dicho receptor puede ser transfectada de manera estable en la línea HT29 para permitir ahora que se realice el ensayo de citotoxicidad. Alternativamente, pueden usarse dichas células en el aparato Cytosensor para determinar si la activación del receptor puede provocar un cambio del pH que es indicativo de un episodio de señalización. Los receptores de la familia del TNF señalan bien en dicho formato y este método no requiere conocer los episodios biológicos reales desencadenados por el receptor. Los anticuerpos monoclonales agonistas serían “humanizados” para uso clínico. Este procedimiento puede usarse también para definir anticuerpos monoclonales antagonistas. Dichos anticuerpos monoclonales se definirían por la falta de actividad agonista y por la capacidad de inhibir las interacciones receptor-ligando, como las controladas por técnicas ELISA, de unión clásica o BIAcore. Por último, la inducción de la secreción de quimioquinas por diversas células en respuesta a un anticuerpo agonista puede constituir un ensayo de escrutinio.

Escrutinio de inhibidores de la interacción receptor-ligando

Utilizando la proteína de fusión receptor-Ig, pueden escrutarse quimiotecas combinatorias para moléculas que pueden unirse directamente al receptor. Estas moléculas pueden analizarse a continuación en un ensayo con formato ELISA usando la proteína de fusión receptor-Ig y una forma soluble del ligando para determinar la capacidad de inhibir la interacción receptor-ligando. Este ELISA puede aplicarse directamente para escrutar diversas quimiotecas de productos naturales, etc., como compuestos inhibidores. El receptor puede ser transfectado a una línea celular tal como la línea HT29 para constituir un ensayo biológico (en este caso citotoxicidad) que puede a continuación constituir el ensayo de escrutinio.

Para los expertos en la técnica será evidente que pueden realizarse diversas modificaciones y variaciones en los polipéptidos, composiciones y métodos de la invención sin apartarse del espíritu o alcance de la invención. De esta

manera, se supone que la presente invención abarca las modificaciones y variaciones de esta invención siempre que estén incluidas dentro del alcance de las reivindicaciones que se acompañan y sus equivalentes.

Identificación del receptor TRAIN humano

TRAIN-R humano se clonó a partir de dos secuencias de cDNA. La primera secuencia (hTrainR) SEQ. ID. NO. 7 es una secuencia compuesta de dos clones lambda gt10 (GJ159 y GJ158) de una selección de cDNA de pulmón de adulto de Clontech Humann. La secuencia compuesta en SEQ. ID. NO. 7 tiene una longitud de 2185 nucleótidos y codifica una proteína de 417 aminoácidos (SEQ. ID. NO. 3) que tiene una secuencia señal, un dominio extracelular de 140 aminoácidos, un dominio transmembránico y un dominio intracelular de 227 aminoácidos y un codón de parada. Incluyen otros 1200 pb. El dominio extracelular de TRAIN-R humano codifica tres dominios similares al del receptor del TNF (parece que está ausente el dominio 1 cuando se compara con TNF-R). La secuencia en SEQ. ID. NO. 3 es 19% idéntica a la del factor de crecimiento nervioso (LNGFR) de baja afinidad y 24% idéntica a la de Tramp/Lard4/Wsl/Dr3, siendo ambos miembros de la familia de TNF.

También se clonó TRAIN-R humano procedente de un segundo subclón de las secuencias del cDNA de lambda gt10 (GJ156, un subclón de 790 pb). La secuencia resultante se muestra en SEQ. ID. NO. 8. Contiene una secuencia de un intrón, un exón que codifica los 30 aminoácidos del extremo carboxi de una forma segregada de TrainR humano, un codón de parada y un 3'UTR. Los 30 aminoácidos en la secuencia del exón eran 100% homólogos a la forma segregada del extremo C de múridos (forma corta del receptor TRAIN de múridos).

Se observan dos mensajes predominantes de 5 kb y 0,5 kb.

Bibliografía citada

Aggarwal, B. B., and Natarajan, K. (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw* 7, 93-124.

Bazzoni, F. and Beutier, B. (1996). The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N Engl J Med* 334, 1717-25.

Eason, J. D., Pascual, M., Wee, S., Farrell, M., Phelan, J., Boskovic, S., Bloesch, C., Mohler, K. M., y Cosimi, A. B. (1996). Evaluation of recombinant human soluble dimeric tumor necrosis factor receptor for prevention of OKT3-associated acute clinical syndrome. *Transplantation* 61, 224-8.

Eggermont, A. M., Schraffordt Koops, H., Lienard, D., Kroon, B. B., van Geel, A. N., Hoekstra, H. J., and Lejeune, F. J. (1996). Isolated limb perfusion with high-dose tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma and melphalan for nonresectable extremity soft tissue sarcomas: a multicenter trial. [see comments]. *J Clin Oncol* 14, 2653-65.

Feldmann, M., Brennan, F. M., and Maini, R. N. (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*.

Green, D. R., and Ware, C. F. (1997). Fas-Ligand: Privilege and Peril. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5986-5990.

Smith, C. A., Gruss, H. J., Davis, T., Anderson, D., Farrah, T., Baker, E., Sutherland, G. R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and et al. (1993). CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. *Cell* 73, 1349-60.

Smith, G. L. (1994). Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends in Microbiol.* 2, 81-88.

Van Dullemen, H. M., van Deventer, S. J., Hommes, D. W., Bijl, H. A., Jansen, J., Tytgat, G. N., and Woody, J. (1995). Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 109, 129-35.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de DNA aislada que codifica un polipéptido que muestra una actividad biológica de la proteína denominada receptor TRAIN, seleccionándose dicha secuencia de DNA de:
 - (a) secuencias de DNA que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ. ID. NO: 1 a 4;
 - (b) secuencias de DNA que comprenden una cualquiera de SEQ. ID. NOs: 5 a 8, codificando dichas secuencia de DNA un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ. ID. NO: 1 a 4;
 - (c) secuencias de DNA que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que está definida por los aminoácidos 26 a 173 de SEQ. ID. NO: 3; y
 - (d) secuencias de DNA que al menos codifican un fragmento del polipéptido definido por SEQ. ID. NO: 3 o SEQ. ID. NO: 4, en la que dicho fragmento presenta una actividad biológica de la proteína denominada receptor TRAIN.
2. La secuencia de DNA de la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de DNA codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que está definida por los aminoácidos 26 a 173 de SEQ. ID. NO: 3 y un dominio Fc de inmunoglobulina humano.
3. Una molécula de DNA recombinante que comprende la secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, estando dicha secuencia de DNA unida operativamente a una secuencia de control de expresión.
4. Un vector que contiene la secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, o la molécula de DNA recombinante de la reivindicación 3.
5. Una célula hospedante transformada por ingeniería genética con la secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, la molécula de DNA recombinante de la reivindicación 3, o el vector de la reivindicación 4.
6. Un método para expresar el polipéptido del receptor TRAIN en una célula de mamífero, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) introducir la secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la célula; y
 - (b) permitir que la célula viva en condiciones tales que se exprese el polipéptido.
7. Un polipéptido del receptor TRAIN aislado que es codificado por la secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2.
8. Un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de la reivindicación 7.
9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
10. Un método para producir el anticuerpo de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que comprende la etapa de inmunizar un organismo no humano con el polipéptido de la reivindicación 7.
11. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de la reivindicación 7 o el anticuerpo de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, comprendiendo además dicha composición farmacéutica un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. El uso del polipéptido de la reivindicación 7, o del anticuerpo de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, para la preparación de un medicamento para evitar y/o reducir la gravedad de una respuesta inmune, para inducir la muerte celular o para tratar o reducir el avance, gravedad o efectos de una enfermedad inmunológica en un mamífero.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que la enfermedad inmunológica es un cáncer.
14. El uso de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que el mamífero es un ser humano.
15. Un método para identificar un ligando para un polipéptido del receptor TRAIN, comprendiendo dicho método las etapas de:
 - (a) proporcionar el polipéptido de la reivindicación 7;
 - (b) marcar el polipéptido con un marcador detectable; y

ES 2 286 856 T3

(c) escrutar para detectar un ligando que se une a dicho polipéptido marcado detectablemente.

16. Un método para identificar un agente bloqueante que se une a un polipéptido del receptor TRAIN, comprendiendo dicho método las etapas de:

5

(a) proporcionar el polipéptido de la reivindicación 7; y

(b) escrutar para detectar un agente bloqueante que se une a dicho polipéptido.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

1  GAATTCGGGG GGAGGTGCAC GGTGTGCACG CTGGACTGGA CCCCCCATGC
51  AACCCCGCGC CCTGCGCCCTT AACCAAGGACT GCTCCGCGCG CCCCTGAGCC
101 TCGGGCTCCG GCCCGGACCT GCAGCCTCCC AGGTGGCTGG GAAGAATCTT
151 CCAACAATAA ATACATTTCA TAAGAAAGAT GGCTTTAAAA GTGCTACTAG
201 AACAAAGAGAA AACGTTTTTC ACTCTTTTAG TATTACTAGG CTATTTGTCA
251 TGTAAAGTGA CTGTGTGATC AGGAGACTGT ACACAGCAAG AATTCAGGGA
301 TCGGTCTGGA AACTGTGTTT CCTGCAACCA GTGTGGGCCA GGCATOGAOT
351 TGTCTAAGGA ATGTGGCTTC CGCTATGCGG AGGATGCACA GTGTGTGACG
401 TGCCGGCTGC ACAGGTTCAA GGAGGACTGG GGCTTCCAGA AATGCAAGCC
451 CTGTCTGGAC TGCCAGTGGG TGAACCGCTT TCAGAAGGCA AATTGTTTACG
501 CCACCAGTGA TGCCATCTGC GGGGACTGCT TGCCAGGATT TTATAGGAAG
551 ACGAAACTTG TCGGCTTTCA AGACATGGAG TGTCTGCCCT GTGGAGACCC
601 TCCTCTCTCT TACGAACCGC ACTGTGCCAG CAAGGTCAAC CTCGTGAAGA
651 TCGGCTCCAC GGCTCCAGC CCACGGGACA CGGCCTGGC TGCCGTTATC
701 TGCAGCGCTC TGCCCAACCT CCGCTGGCC CTGCTCATCC TCTGTGTGAT
751 CTATTGTAAG AGACAGTTTA TGGAGAAGAA ACCCAGCTGG TCTCTGCGGT
801 CGCAGGACAT TCAGTACAAC GGCTCTGAGC TGTGCTGTTT TGACAGACCT
851 CAGCTCCACG AATATGCCCA CAGAGCCTGC TGCCAGTGCC GCCGTGACTC
901 AGTGAGACCC TGCGGGCGCG TCGCTTGCT CCCATCCATG TGCTGTGAGG
951 AGGCTGCGAG CCCCACCCG GCGACTCTTG GTTGTGGGGT GCATCTGCA
1001 GCCAGTCTTC AGGCAAGAAA CGCAGGCCCA GCGGGGAGA TGGTCCGAC
1051 TTTCTTGGGA TCCCTCACGC AGTCCATCTC TGGCGAGTTT TCAGATGCCCT
1101 GGGCTCTGAT GCAGATATCC ATGGGTGGTG ACAACATCTC TTTTGTGAC
1151 TCTTATCTCT AACTCACTGG AGAAGACATT CATTCCTCA ATCCAGAATC
1201 TGAAAGCTCA ACGTCTTTGG ATTCAAATAG CAGTCRAGAT TTGCTTCTG
1251 GGGCTGTGCC AGTCCAGTCT CATCTGAAA ACTTTACAGC AGCTACTGAT
1301 TTATCTAGAT ATAACAACAC ACTGGTAGAA TCAGCATCAA CTCAGGATGC
1351 ACTAATCTATG AGAAGCCAGC TAGATCAGGA GAGTGGCGCT GTCATCCACC
1401 CAGCCACTCA GACGTCCCTC CAGGAAGCTT AAAGAACCTG CTTCTTTCTG
1451 CAGTAGAAGC GTGTGCTGGA ACCCAAAGAG TACTCTTTTG TTAGGCTTAT
1501 GGACTGAGCA GTCTGGACCT TGCAATGGCT CTGGGGCANA AATAAATCTG
1551 AACCAAACCTG ACGGCATTTG AAGCCTTTCA GCCAGTTGCT TCTGAGCCAG
1601 ACCAGCTGTA AGCTGAAACC TCAATGAATA ACAAGAAAG ACTCCAGGCC
1651 GACTCATGAT ACTCTGCATC TTTCTACAT GAGAAGCTTC TCTGCCACAA
1701 AAGTGACTTC AAAGACGGAT GGGTTGAGCT GGCAGCCTAT GAGATTGTGC
1751 ACATATAACA AGAAACAGAA ATGCCCTCAT GCTTATTTTC ATGGTGATTG
1801 TGGTMTTACA AGACTGAAGA CCCAGAGTAT ACTTTTCTTT TCCAGAAATA
1851 ATTTATATCC GCCTATGAAA TATCAGATAA ATTACCTTAG CTTTATGTA
1901 GAATCGGTTC AAAAGTGAOT GTTCTATTTT GAGAAGGACA CTTTTTCATC
1951 ATCTAAACTG ATTGCGATAG GTGCTTAGAA TGGCCCTCAT ATTGCTGCC
2001 TAAATCTTGG GTTTATTAGA TGAAGTTTAC TGAATCAGAG GAATCAGACA
2051 GAGGAGGATA GCTCTTTCCA GAATCCACAC TTCTGACCTC AGCCTCGGTC
2101 TCATGAACAC CCGCTGATCT CAGGAGAACA CCGGGGCTAG GGAATGTGGT
2151 CGAGAAAGGG CAGCCCATTG CCCAGAATTA ACACA

```

FIG. 1

000001 : 000000 : 000000 : 000000 : 000000

1. 2. 3. 4. 5.

010011263/17100002578 72 021000004/02110 011-014

[illegible]

• • • • •

[illegible]

Fig. 1.1

1000

```

1  GAATTCCAAA TGCTAAAACC TAGTCTTTA TTCATCTATA AGGTATTTG
51  TCGTTTAAGT TTCAATAAAA ATGCCGAAGA CCACTGACTT TATATTCCCC
101 CACCTGCACC CCCACCCCAA TATAGAAGAA GTGCACTGAG AAGCATCTGC
151 AAAGTTAGCT TTAGGGGAAT TGATATTTCT TAAGTGTTCA CTGCTTCCTC
201 TTCRAAAATG TGTCTACCTA AGATACTATT ATTTAAGCCT CTGTGTACTT
251 TTAACCGTAG AACTGGTAAT GGAGACTGCT GGTAATTTAT GACCACAACT
301 GTAAGCTTAG ATCAAAGAGT TAACAAGGAG TATTTTCCTT TCTCTCTAG
351 ATTTTATAGG AAGACGAAAC TTGTCGGCTT TCAAGACATG GAGTGTGTGC
401 CTTGTGAGCA CCCTCCTCCT CCTTACGAAC CGCACTGTGA GTGAACGCAA
451 CACAGGCAGA GCCAAGGGGA CGCCTGGCCT TTGAAAAAG TTTAAATTTG
501 TAAACGTTTC TTCTCTGGCA CATGGAGCCA AATCTGTCTC TCCTGTGGGG
551 TGTACAGTGT GTCCCTTTTA ATCAGGCTTC TGCCAGGACA GAAAGTCCCT
601 TTGTTCTGTG CCTCAGTCAG CAAACCGGTC CCAGGGATTT GAATCTCAGA
651 GTGGAGTGCA GACATTTTGC CACTGCTCAG CTCCTTCTGA AGCCTTCCCT
701 GGCACCTGG GTCTGTAATT CAGGCCACTT TGAATAACCA GCGGGCTCAC
751 ATCCTCACTC TTAGGTCTTC GTGCCCTGGC CCCATGAATT C

```

FIG. 3

FIG. 4

MALKVLLDQERTFFTLVLGLYLSCVTCESGDCRQQEFRDRSGNCVPCNQCGPMELSKCCGFGYGE
 DAQCVTCLHREFKEDWGFQCKPCLDCAVVNRFOKANCATSDAICGDCLPGFYRKTCLVGPQDMECV
 PCGDPPPPYEPHCASKVNLVKIASTASSPRDTALAAVICSAIATVLLALLILCVTVCKRQPMKKPSW
 SLRSQDIQYNGSELSCFDRPQLHEYAMRACCQCRDSVQTCGPVRLLPSCCEEACSPNPATLCGGVH
 SAASLOARNAGPAGEMVPTFFGSLTQSTICGEFSDANPLNQNPNGGDNISFCDSYPETGEDIHSLNPE
 LESSTSIDSNSQDLVGGAVFVQSHSENFTAATDLSRYNNTLVESASTQDALTRSQLDQESGAVIHP
 ATQTSLQEA

ES 2 286 856 T3

FIG 5

FYRKTKLVGFQDMBCVPCGDPPFPYEPHCE

ES 2 286 856 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

5 1 MALKVLPLHR TVLFAAILFL LHLACKVSCE TGDCRQQEFK DRSGNCVLCK
51 QCGPGMELSK ECGFGYGEDA QCVPCRPHRF KEDWGFQKCK PCADCALVNR
101 FQRANCSHTS DAVCGDCLPG FYRKTCLVGF QDMECVPCGD PPPPYEPHCE

SEQ ID NO: 2

10 1 MALKVLPLHR TVLFAAILFL LHLACKVSCE TGDCRQQEFK DRSGNCVLCK
51 QCGPGMELSK ECGFGYGEDA QCVPCRPHRF KEDWGFQKCK PCADCALVNR
101 FQRANCSHTS DAVCGDCLPG FYRKTCLVGF QDMECVPCGD PPPPYEPHCT
151 SKVNLVKISS TVSSPRDTAL AAVICSALAT VLLALLILCV IYCKRQFMEK
15 201 KPSCKLPSLC LTVK

SEQ ID NO: 3

20 MALKVLLQEKTFFTLLVLLGYLSCKVTCESGDCRQQEFRDRSGNCVPCN
QCGPGMELSK ECGFGYGEDA QCVPCRPHRF KEDWGFQKCK PCADCALVNR
FQRANCSHTS DAVCGDCLPG FYRKTCLVGF QDMECVPCGD PPPPYEPHCA
SKVNLVKIASTASSPRDTAL AAVICSALAT VLLALLILCV IYCKRQFMEK
25 KPSWSLRSQDIQYNGSELSCFDRPQLHEYAHRACCQCRDSVQTCGPVRL
LPSMCCEEACSPNPATLGC GVHSAASLQARNAGPAGEMVPTFFGSLTQSI
CGEFSDAWPLMQNPMGGDNISFCDSYPELTGEDIHSLNPELESSTSLDSN
SSQDLVGGAVPVQSHSENFTAATDL SRYNNTLVESASTQDALTMRSQLDQ
ESGAVIHPATQTSLQEA

SEQ ID NO: 4

FYRKTCLVGFQDMECVPCGD PPPPYEPHCE*

SEQ ID NO: 5

35 1 GGCACGAGG CGTTTGGCGC GGAAGTGCTA CCAAGCTGCG GAAAGCGTGA
51 GTCTGGAGCA CAGCACTGGC GAGTAGCAGG AATAAACACG TTTGGTGAGA
40 101 GCCATGGCAC TCAAGGTCCT ACCTCTACAC AGGACGGTGC TCTTCGCTGC
151 CATTCCTCTC TACTCCACC TGGCATGTAA AGTGAGTTGC GAAACCGGAG
201 APTGCAGGCA GCAGGAATTC AAGGATCGAT CTGGAAACTG TGTCTCTGCTGC
251 AAACAGTGCG GACCTGGCAT GGAGTTGTCC AAGGAATGTG GCTTCGGCTA
301 TGGGGAGGAT GCACAGTGTG TGCCCTGCAG GCCGCACCGG TTCAAGGAAG
45 351 ACTGGGGTTT CCAGAAGTGT AAGCCATGTG CGGACTGTGC GCTGGTGAAAC
401 CGCTTTTACA GGGCCAACTG CTCACACACC AGTGATGCTG TCTGCGGGGA
451 CTGCCTGCCA GGATTTTACC GGAAGACCAA ACTGGTTGGT TTTCAAGACA
501 TGGAGTGTGT GCCCTGCGGA GACCCACCTC CTCCCTACGA ACCACACTGT
50 551 GAGTGATGTG CCAAGTGGCA GCAGACCTTT AAAAAAAAAA GAAAAAAAAA

SEQ ID NO: 6

55 1 CGGCACGAGG GCCGGCACCC CGCGCCACCC CAGCCTCAAA CTGCAGTCCG
51 GCGCCGCGGG GCAGGACAAG GGGAAAGGAAT AAACACGTTT GGTGAGAGCC
101 ATGGCACTCA AGGTCCCTACC TCTACACAGG ACGGTGCTCT TCGCTGCCAT
151 TCTCTTCTTA CTCCACCTGG CATGTAAAGT GAGTTGCGAA ACCGGAGATT
201 GCAGGCAGCA GGAATTCAAG GATCGATCTG GAAACTGTGT CCTCTGCAAA
60 251 CAGTGCGGAC CTGGCATGGA GTTGTCCAAG GAATGTGGCT TCGGCTATGG
301 GGAGGATGCA CAGTGTGTGC CCTGCAGGCC GCACCGGTTT AAGGAAGACT
351 GGGGTTTCCA GAAGTGTAAG CCATGTGCGG ACTGTGCGCT GGTGAACCGC
401 TTTCAAGAGG CCAACTGCTC ACACACCAGT GATGCTGTCT GCGGGGACTG
451 CCTGCCAGGA TTTTACCGGA AGACCAAACCT GGTGTTTGT CAAGACATGG
65 501 AGTGTGTGCC CTGCGGAGAC CCACCTCCTC CCTACGAACC AACTGTATCC

ES 2 286 856 T3

```

551  AGCAAGGTGA  ACCTTGTGAA  GATCTCCTCC  ACCGTCTCCA  GCCCTCGGGA
601  CACGGCGCTG  GCTGCCGTCA  TCTGCAGTGC  TCTGGCCACG  GTGCTGCTCG

5    651  CCCTGCTCAT  CCTGTGTGTC  ATCTACTGCA  AGAGGCAGTT  CATGGAGAAG
701  AAACCCAGCT  GTAAGCTCCC  ATCCCTCTGT  CTCACTGTGA  AGTGAGCTTG
751  TTAGCATTGT  CACCCAAGAG  TTCTCAAGAC  ACCTGGCTGA  GACCTAAGAC
801  CTTTAGAGCA  TCAACAGCTA  CTTAGAATAC  AAGATGCAGG  AAAACGAGCC
851  TCTTCAGGAA  TCTCAGGGCC  TCCTAGGGAT  GCTGGCAAGG  CTGTGATGTC
10   901  TCAAGCTACC  AGGAAAAATT  TAAAGTTGTT  TWTCCCCTAA  AA

```

SEQ ID NO: 7

```

15   GAATTCCGGGGGAGGTGCACGGTGTGCACGCTGGACTGGACCCCCCATGC
AACCCCGCGCCCTGCGCCTTAACCAGGACTGCTCCGCGCGCCCCCTGAGCC
TCGGGCTCCGGCCCCGACCTGCAGCCTCCCAGGTGGCTGGGAAGAAGTCT
CCAACAATAAATACATTTGATAAGAAAGATGGCTTTAAAAGTGCTACTAG
20   AACAAGAGAAAACGTTTTTCACTCTTTTAGTATTACTAGGCTATTTGTCA
TGTAAGTGACTTGTGAATCAGGAGACTGTAGACAGCAAGAATTCAGGGA
TCGGTCTGGAACTGTGTTCCCTGCAACCAAGTGTGGGCCAGGCATGGAGT
TGTCTAAGGAATGTGGCTTCGGCTATGGGGAGGATGCACAGTGTGTGACG
TGCCGGCTGCACAGGTTCAAGGAGGACTGGGGCTTCCAGAAATGCAAGCC
25   CTGTCTGGACTGCGCAGTGGTGAACCGCTTTCAGAAGGCAAATTTGTTAG
CCACCAAGTGATGCCATCTGCGGGGACTGCTTGCCAGGATTTTATAGGAAG
ACGAAACTTGTGGCTTTCAAGACATGGAGTGTGTGCCTTGTGGAGACCC
TCCTCTCTCTTACGAACCGCACTGTGCCAGCAAGGTCAACCTCGTGAAGA
30   TCGCGTCCACGGCCTCCAGCCCACGGGACACGGCGCTGGCTGCCGTTATC
TGCAGCGCTCTGGCCACCGTCTCTGCTGGCCCTGCTCATCCTCTGTGTCAT
CTATTGTAAGAGACAGTTTATGGAGAAGAAACCCAGCTGGTCTCTGCGGT
CGCAGGACATTCAGTACAACGGCTCTGAGCTGTCTGTGTTTTGACAGACCT
35   CAGCTCCACGAATATGCCCACAGAGCCTGCTGCCAGTGGCGCCGTGACTC
AGTGCAGACCTGCGGGCCGGTGCCTTGGCTCCCATCCATGTGCTGTGAGG
AGGCCTGCAGCCCCAACCCGGCGACTCTTGTTGTGGGGTGCATTTCTGCA
GCCAGTCTTCAGGCAAGAAACGCAGGCCCAGCCGGGAGATGGTGCCGAC
40   TTTCTTCGGATCCCTCACGCAGTCCATCTGTGGCGAGTTTTTCAGATGCCT
GGCCTCTGATGCAGAATCCCATGGGTGGTGACAACATCTCTTTTTGTGAC
TCTTATCTCTGAACCTCACTGGAGAAGACATTCAATCTCTCAATCCAGAACT
TGAAAGCTCAACGTCTTTGGATTCAAATAGCAGTCAAGATTTGGTTGGTG
45   GGGCTCTTCCAGTCCAGTCTCAATCTGAAAACCTTACAGCAGCTACTGAT
TTATCTAGATATAACAACACACTGGTAGAATCAGCATCAACTCAGGATGC
ACTAACTATGAGAAGCCAGCTAGATCAGGAGAGTGGCGCTGTCATCCACC
CAGCCACTCAGACGTCCCTCCAGGAAGCTTAAAGAACCTGCTTCTTTCTG
CAGTAGAAGCGTGTGCTGGAACCCAAAGAGTACTCCTTTGTTAGGCTTAT
50   GGACTCAGCAGTCTGGACCTTGCAATGGCTTCTGGGGCAAAAATAAATCTG
AACCAAACTGACGGCATTTGAAGCCTTTCAGCCAGTTGCTTCTGAGCCAG
ACCAGCTGTAAGCTGAAACCTCAATGAATAACAAGAAAAGACTCCAGGCC
GACTCATGATACTCTGCATCTTTCCCTACATGAGAAGCTTCTCTGCCACAA
55   AAGTGACTTCAAAGACGGATGGGTGAGCTGGCAGCCTATGAGATTGTGG
ACATATAACAAGAAACAGAAATGCCCTCATGCTTATTTTCATGGTGATTG
TGGTTTTACAAGACTGAAGACCCAGAGTATACTTTTTCTTTCCAGAAATA
ATTTTCATACCGCCTATGAAATATCAGATAAATTACCTTAGCTTTTATGTA
60   GAATGGGTTCAAAGTGAGTGTCTTATTTGAGAAGGACACTTTTTTCATC
ATCTAAACTGATTTCGCATAGGTGGTTAGAAAGGCCCTCATATTGCCTGCC
TAAATCTTGGGTTTATTTAGATGAAGTTTACTGAATCAGAGGAATCAGACA
GAGGAGGATAGCTCTTTCCAGAATCCACACTTCTGACCTCAGCCTCGGTC
65   TCATGAACACCCGCTGATCTCAGGAGAACACCTGGGCTAGGGAATGTGGT
CGAGAAAGGGCAGCCCCATTGCCAGAATTAACACA

```

ES 2 286 856 T3

SEQ ID NO: 8

5 GAATTCCAAATGCTAAAACCTAGTTCTTTATTCATCTATAAGGTATTTTG
TCGTTTAAAGTTTCAATAAAAAATGCCGAAGACCACTGACTTTATATTCCCC
CACCTGCACCCCCACCCCAATATAGAAGAAGTGCAC TGAGAAGCATCTGC
AAAGTTAGCTTTAGGGGAATTGATATTTCTTAAGTGTCCACTGCCTTCCTC
TTCAAAAATGTGTCTACCTAAGATACTATTATTTAAGCCTCTGTGTACTT
TAAACCGTAGAAGTGGTAATGGAGACTGCTGGTAATTTATGACCACAAC
10 GTAAGCTTAGATGAAAGAGTTAACAAGGAGTATTTTCCTTTCTCTCTAG
ATTTTATAGGAAGACGAAACTTGTTCGGCTTTCAAGACATGGAGTGTGTGC
CTTGTGGAGACCCCTCCTCCTCCTTACGAACCGCAC TGAGTGAACGCAA
CACAGGCAGAGCCAAGGGGACGCCTGGCCTTTGTAAAAAGTTTAAATTTG
15 TAAACGTTTCTTCTCTGGCAGATGGAGCCAAATCTGTCTCTCCTGTGGGG
TGTACAGTGTGTCTCTTTAATCAGGCTTCTGGCAGGACAGAAAGTCCCT
TTGTTCTGTGCCTCAGTCAGCAAACCGGTCCCAGGGATTTGAATCTCAGA
GTGGAGTGCAGACATTTTGCCACTGCTCAGCTCCTTCTGAAGCCTTCCT
20 GGCACCTGGGTCTGTAATTCAGGCCACTTTGAATAACCAGGCGGCTCAC
ATCCTCACTCTTAGGTCTTCGTGCCCTGGCCCCATGAATTC

SEQ ID NO: 9

25 MALKVLEQEKTFFTLLVLLGYLSCKVTCESGDCRQQEFRDRSGNCVPCN
QCGPGMELSKECGFGYGEDAQCVTCLHRFKEDWGFQKCKPCLDCAVVNR
FQKANCSATSDAICGDCLPGFYRKTCLVGFQDMECVPCGDP PPPPYEPHCE
30
35
40
45
50
55
60
65