



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 295 040**

(51) Int. Cl.:
A61K 38/17 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **00947204 .4**

(86) Fecha de presentación : **11.07.2000**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1196186**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **17.04.2002**

(54) Título: **Promoción o inhibición de la angiogénesis y cardiovascularización mediante homólogos del ligando/receptor del factor de necrosis del tumor.**

(30) Prioridad: **12.07.1999 US 143304 P**

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

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

(72) Inventor/es: **Williams, P., Mickey y**
Gerritsen, Mary, E.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 295 040 T3

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

Promoción o inhibición de la angiogénesis y cardiovascularización mediante homólogos del ligando/receptor del factor de necrosis del tumor.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para promover o inhibir la angiogénesis y/o cardiovascularización en mamíferos que precisan de tal efecto biológico. Esto incluye el diagnóstico y tratamiento de los trastornos cardiovasculares, así como de los trastornos oncológicos.

Descripción de los antecedentes

Trastornos cardíacos y factores

El fallo cardíaco afecta aproximadamente a cinco millones de estadounidenses, y los nuevos casos de fallo cardíaco ascienden aproximadamente a 400.000 cada año. Es la causa única más frecuente de hospitalización para persona de más de 65 años de edad en los EE.UU. Los recientes avances en la gestión de las enfermedades cardíacas agudas, incluyendo el infarto de miocardio agudo, están resultando en una creciente población de pacientes que eventualmente desarrollarán un fallo cardíaco crónico. Desde 1979 hasta 1995 las hospitalizaciones por fallo cardíaco congestivo (CHF) incrementaron desde 377.000 hasta 872.000 (un incremento del 130 por ciento), y los fallecimientos por CHF incrementaron un 116 por ciento.

El CHF es un síndrome caracterizado por la disfunción ventricular izquierda, una tolerancia reducida al ejercicio, una calidad de vida deficiente, y una esperanza de vida marcadamente acortada. El “sine qua non” del fallo cardíaco es una incapacidad del corazón para bombear sangre a una velocidad suficiente para satisfacer las necesidades metabólicas de los tejidos corporales (dicho de otro modo, hay un rendimiento cardíaco insuficiente).

En el inicio del fallo cardíaco se activan al menos cuatro mecanismos compensatorios principales para potenciar el rendimiento cardíaco, incluyendo la vasoconstricción periférica, el ritmo cardíaco incrementado, una contractibilidad cardíaca incrementada, y un volumen plasmático incrementado. Estos efectos están mediados principalmente por el sistema nervioso simpático y el sistema renina-angiotensina. Ver Eichhorn, *American Journal of Medicine*, 104:163-169 (1998). El rendimiento incrementado del sistema nervioso simpático aumenta el tono vascular, la frecuencia cardíaca, y la contractibilidad. La angiotensina II eleva la presión sanguínea mediante 1) la estimulación directa de la contracción del músculo liso vascular, 2) la promoción de la expansión del volumen plasmático estimulando la secreción de la aldosterona y de la hormona antidiurética, 3) la estimulación mediada por el sistema simpático del tono vascular, y 4) la catalización de la degradación de la braquidina, la cual tiene una actividad vasodilatadora y natriurética. Consultar la revisión por Brown y Vaughan, *Circulation*, 97:1411-1420 (1998). Como se ha mencionado más arriba, la angiotensina II puede tener también efectos directamente perjudiciales sobre el corazón al promover la necrosis de miocitos (dañando la función sistólica) y la fibrosis intracardíaca (dañando la función diastólica y, en algunos casos, la sistólica). Consultar Weber, *Circulation*, 96:4065-4082 (1998).

Una característica propia del fallo cardíaco congestivo (CHF) es la hipertrofia cardíaca, un aumento del corazón que es activado tanto por estímulos mecánicos como hormonales, y que permite al corazón adaptarse a las demandas de un rendimiento cardíaco incrementado. Morgan y Baker, *Circulation*, 83:13-25 (1991). Esta respuesta hipertrófica está frecuentemente asociadas con una variedad de condiciones patológicas características, tales como la hipertensión, la estenosis aórtica, el infarto de miocardio, la cardiomiopatía, la regurgitación valvular, y la comunicación intracardíacas, todas las cuales resultan en una sobrecarga hemodinámica crónica.

La hipertrofia se define generalmente como un incremento en el tamaño de un órgano o estructura, independiente del crecimiento natural, y que no implica la formación de tumor. La hipertrofia del corazón se debe, bien a un incremento en la masa de las células individuales (miocitos), bien a un incremento en el número de celular que forman el tejido (hiperplasia), o ambos. Mientras que el aumento de un corazón embrionario depende en gran medida de un incremento del número de miocitos (lo cual continúa hasta poco antes del nacimiento), los miocitos cardíacos posnatales pierden su capacidad proliferativa. El crecimiento adicional ocurre a través de la hipertrofia de las células individuales.

La hipertrofia de los miocitos adultos es inicialmente beneficiosa como respuesta a corto plazo frente a una función cardíaca deteriorada, al permitir una disminución en el esfuerzo de las fibras musculares individuales. Sin embargo, con una sobrecarga grave, duradera, las células hipertrofiadas empiezan a deteriorarse y mueren. Katz, “Heart Failure”, en: Katz A.M. (editor), *Physiology of the Heart* (Nueva York: Raven Press, 1992) pp. 638-668. La hipertrofia cardíaca es un factor de riesgo significativo tanto para la mortalidad como para la morbilidad en el curso clínico del fallo cardíaco. Katz, *Trends Cardiovasc. Med.*, 5:37-44 (1995). Para más información sobre las causas y patología de la hipertrofia cardíaca consultar, por ejemplo, *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*, Braunwald, E. (editor). (W.B. Saunders Co., 1988), Capítulo 14, “Pathophysiology of Heart Failure.”

A nivel celular, el corazón está compuesto por miocitos y células de apoyo que los rodean, denominadas genéricamente “no miocitos”. Aunque los no miocitos son mayoritariamente fibroblastos/células mesenquimales, también incluyen células endoteliales y musculares lisas. Además, aunque los miocitos componen la mayoría de la masa de miocardio adulto, representan sólo aproximadamente el 30% del número total de células presentes en el corazón. En respuesta a estímulos hormonales, fisiológicos, hemodinámicos, y patológicos, las células musculares ventriculares adultas pueden adaptarse a cargas de trabajo incrementadas a través de la activación de un proceso hipertrófico. Esta respuesta está caracterizada por un incremento en el tamaño de la célula de miocito y en el contenido de proteína contráctil de las células musculares cardíacas individuales, sin una división celular y activación de los genes embrionarios, incluyendo el gen del péptido natriurético atrial (ANP), concomitantes. Chien *et al.*, *FASEB J.*, 5:3037-3046 (1991); Chien *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.*, 55:77-95 (1993). En la hipertrofia ventricular izquierda, secundaria a una sobrecarga de presión en humanos, se ha descrito un incremento de la masa de miocardio como resultado de un incremento en el tamaño de los miocitos, que está asociado con una acumulación de colágeno intersticial dentro de la matriz extracelular y alrededor de las arterias coronarias intramiocárdicas. Caspari *et al.*, *Cardiovasc. Res.*, 11:554-558 (1977); Schwarz *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 42:895-903 (1978); Hess *et al.*, *Circulation*, 63:360-371 (1981); Pearlman *et al.*, *Lab. Invest.*, 46:158-164 (1982).

Se ha sugerido también que factores paracrinos, producidos por las células de apoyo no miocitos, podrían estar implicados adicionalmente en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, y se han identificado varios factores hipertróficos derivados de no miocitos, tales como, el factor inhibidor de leucocitos (LIF) y la endotelina. Metcalf, *Growth Factors*, 7:169-173 (1992); Kurzrock *et al.*, *Endocrine Reviews*, 12:208-217 (1991); Inoue *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:2863-2867 (1989); Yanagisawa y Masaki, *Trends Pharm. Sci.*, 10:374-378 (1989); patente estadounidense n° 5.573.762 (concedida el 12 de noviembre de 1996). Otros factores ilustrativos adicionales que se han identificado como mediadores potenciales de la hipertrofia cardíaca incluyen la cardiotrofina-1 (CT-1) (Pennica *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 92:1142-1146 (1995)), la catecolaminas, los adrenocorticosteroides, la angiotensina, y las prostaglandinas.

Actualmente, el tratamiento de la hipertrofia cardíaca varía dependiendo de la enfermedad cardíaca subyacente. Las catecolaminas, los adrenocorticosteroides, la angiotensina, las prostaglandinas, el LIF, la endotelina (incluyendo las endotelina-1, -2; y -3 y la gran endotelina), y la CT-1 se encuentran entre los factores identificados como mediadores potenciales de la hipertrofia. Por ejemplo, los fármacos bloqueadores del receptor betaadrenérgico (beta-bloqueadores, por ejemplo, el propranolol, timolol, tertalolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutolol, atenolol, metoprolol, carvedilol, etcétera) y el verapamil se han usado ampliamente en el tratamiento de la cardiomiopatía hipertrófica. Los efectos beneficiosos de los beta-bloqueadores sobre los síntomas (por ejemplo, dolor en el pecho) y la tolerancia al ejercicio se deben en gran parte a una disminución de la frecuencia cardíaca, con una consecuente prolongación de la diástole y un relleno ventricular pasivo incrementado. Thompson *et al.*, *Br. Heart J.*, 44:488-98 (1980); Harrison *et al.*, *Circulation*, 29:84-98 (1964). Se ha descrito que el verapamil mejora el relleno ventricular y que, probablemente, reduce la isquemia de miocardio. Bonow *et al.*, *Circulation*, 72:853-64 (1985).

La nifedipina y el diltiazem se han usado también ocasionalmente en el tratamiento de la cardiomiopatía hipertrófica. Lorell *et al.*, *Circulation*, 65:499-507 (1982); Betocchi *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 78:451-457 (1996). Sin embargo, debido a sus potentes propiedades vasodilatadoras, la nifedipina podría ser perjudicial, especialmente en pacientes con obstrucción del flujo de salida. La disopiramide se ha usado para aliviar los síntomas por medio de sus propiedades inotrópicas negativas. Pollick, *N. Engl. J. Med.*, 307:997-999 (1982). Sin embargo, en muchos pacientes, los beneficios iniciales disminuyen con el tiempo. Wigle *et al.*, *Circulation*, 92:1680-1692 (1995).

Se ha descrito que la terapia antihipertensiva tiene efectos beneficiosos sobre la hipertrofia cardíaca asociadas con la presión sanguínea elevada. Los ejemplos de fármacos usados en la terapia antihipertensiva, solos o en combinación, son los antagonistas del calcio, por ejemplo, la nitrendipina; los agentes bloqueadores del receptor adrenérgico, por ejemplo, los listados más arriba; los inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina (ACE) tales como el quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril, y lisinopril; los diuréticos, por ejemplo, la clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetazida, metilclotiazida, benzotiazida, diclorfenamida, acetazolamida, e indapamida; y los bloqueadores del canal de calcio, por ejemplo, el diltiazem, la nifedipina, el verapamil, y la nicardipina.

Por ejemplo, el tratamiento de la hipertensión con diltiazem y captopril mostró una disminución en la masa muscular ventricular izquierda, pero los índices Doppler de la función diastólica no se normalizaron. Szlachcic *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 63:198-201 (1989); Shahi *et al.*, *Lancet*, 336:458-461 (1990). Estos hallazgos se interpretan como indicativos de que pueden permanecer cantidades excesivas de colágeno intersticial después de la regresión de la hipertrofia ventricular. Rossi *et al.*, *Am. Heart J.*, 124:700-709 (1992). Rossi *et al.*, ver más arriba, investigaron el efecto del captopril sobre la prevención y regresión de la hipertrofia celular de miocardio, y de la fibrosis intersticial en la hipertrofia cardíaca por sobrecarga de presión, en ratas experimentales.

Inicialmente se creyó que los agentes que incrementan la contractibilidad cardíaca directamente (agentes inotrópicos) eran beneficiosos para los pacientes con fallo cardíaco, porque mejoraban el rendimiento cardíaco a corto plazo. Sin embargo, se ha hallado que todos los agentes inotrópicos positivos, con excepción de la digoxigenina, resultan en una mortalidad a largo plazo incrementada, a pesar de las mejoras a corto plazo del rendimiento cardíaco. Massie, *Curr. Opin. Cardiology*, 12:209-217 (1997); Reddy *et al.*, *Curr. Opin. Cardiol.*, 12:233-241 (1997). Recientemente, se ha apoyado el uso de bloqueadores del receptor beta-adrenérgico para su uso en el fallo cardíaco. Las evidencia procedente de ensayos clínicos sugiere que pueden alcanzarse mejoras en las función cardíaca sin una mortalidad incrementada, aunque las mejoras documentadas en supervivencia de pacientes no se han demostrado todavía. Con-

sultar también, las patentes estadounidenses nº 5.624.806; 5.661.122; y 5.610.134 y WO 95/28173 en relación al uso de la cardiotropina-I o de antagonistas de la misma, o de la hormona del crecimiento y/o del factor-I de crecimiento parecido a insulina, en el tratamiento del CHF. Otra modalidad de tratamiento es el trasplante de corazón, pero está limitada por la disponibilidad de donantes de corazón.

5

La endotelina es un péptido vasoconstrictor que comprende 21 aminoácidos, aislado del sobrenadante de cultivos endoteliales arteriales de cerdo, y determinado estructuralmente. Yanagisawa *et al.*, *Nature*, 332:411-415 (1988). Posteriormente se halló que la endotelina exhibía varias acciones, y se ha probado que los anticuerpos contra la endotelina y los antagonistas de la endotelina son efectivos en el tratamiento del infarto de miocardio, del fallo renal, y otras enfermedades. Puesto que la endotelina está presente en el cuerpo vivo, y exhibe una acción vasoconstrictora, se espera que sea un factor endógeno implicado en la regulación del sistema circulatorio, y puede estar asociado con la hipertensión, las enfermedades cardiovasculares tales como el infarto de miocardio, y las enfermedades renales tales como el fallo renal agudo. Los antagonistas de la endotelina se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 5.773.414; en la publicación de patente japonesa 3130299/1991; en EP 457.195; EP 460.679; y EP 552.489. En la patente estadounidense nº 5.773.223 se describe un nuevo receptor de la endotelina B para identificar antagonistas del receptor de la endotelina.

15

La terapia actual para el fallo cardíaco se dirige principalmente a usar los inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina (ACE), tales como el captopril, y diuréticos. Estos fármacos mejoran el perfil hemodinámico y la tolerancia al ejercicio, y reducen la incidencia de la morbilidad y mortalidad en pacientes con el CHF. Kramer *et al.*, *Circulation*, 67(4):807-816 (1983); Captopril Multicenter Research Group., *J.A.C.C.*, 2(4):755-763 (1983); The CONSENSUS Trial Study Group., *N. Engl. J. Med.*, 316(23):1429-1435 (1987); The SOLVD Investigators., *N. Engl. J. Med.*, 325(5):293-302 (1991). Además, son útiles para tratar la hipertensión, la disfunción ventricular izquierda, la enfermedad vascular aterosclerótica, y la nefropatía diabética. Brown y Vaughan, ver más arriba. Sin embargo, a pesar de su probada eficacia, la respuesta a los inhibidores del ACE ha sido limitada. Por ejemplo, aunque prolongan la supervivencia en el escenario del fallo cardíaco, los inhibidores del ACE parecen retrasar la progresión hacia la etapa final del fallo cardíaco, y un número sustancial de pacientes en tratamiento con inhibidores del ACE tienen un fallo cardíaco funcional de clase III.

20

25

Además, la mejora de la capacidad funcional y del tiempo de ejercicio es solamente pequeña, y la mortalidad, aunque reducida, continúa siendo elevada. The CONSENSUS Trial Study Group, *N. Engl. J. Med.*, 316(23):1429-1453 (1987); The SOLVD Investigators, *N. Engl. J. Med.*, 325(5):293-302 (1991); Cohn *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 325(5):303-310 (1991); The Captopril-Digoxin Multicenter Research Group, *JAMA*, 259(4):539-544 (1988). Por tanto, los inhibidores del ACE de forma consistente parecen ser incapaces de aliviar los síntomas en más del 60% de los pacientes de fallo cardíaco, y reducen la mortalidad del fallo cardíaco sólo en aproximadamente el 15-20%. Para otros efectos perjudiciales, consultar Brown y Vaughan, ver más arriba.

35

Una alternativa a los inhibidores del ACE está representada por antagonistas específicos del receptor del AT1. Hay planificados estudios clínicos para comparar la eficacia de estas dos modalidades en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular y renal. No obstante, los datos de modelos animales sugieren que la vía ACE/Ang II, aunque claramente implicada en la hipertrofia cardíaca, no es la única, o incluso la principal vía activa en este aspecto. Se han creado modelos genéticos de ratones "knockout" para ensayar los componentes individuales de la vía. En uno de tales modelos, el receptor cardíaco principal para la Ang II, el AT sub 1A, se ha eliminado genéticamente; estos ratones no desarrollan hipertrofia cuando se administra la Ang II experimentalmente (confirmando el éxito básico del modelo para eliminar la hipertrofia secundaria a la Ang II). Sin embargo, cuando se constriñe la aorta en estos animales (un modelo de estrés cardíaco hipertensivo), los corazones aún devienen hipertróficos. Esto sugiere que en la hipertensión se activan vías de señalización alternativas, que no dependen de este receptor (AT sub 1A). Los inhibidores del ACE presumiblemente no serían capaces de inhibir estas vías. Consultar Harada *et al.*; *Circulation*, 97:1952-1959 (1998). Consultar también Homey, *Circulation*, 97:1890-1892 (1998) en relación al enigma asociado con el proceso y mecanismo de la hipertrofia cardíaca.

50

Aproximadamente 750.000 pacientes padecen anualmente un infarto de miocardio agudo (AMI), y aproximadamente una cuarta parte de todas las muertes en los Estados Unidos se deben al AMI. En los últimos años, los agentes trombolíticos, por ejemplo, la estreptoquinasa, la uroquinasa, y, en particular, el activador del plasminógeno tisular (t-PA), han incrementado significativamente la supervivencia de los pacientes que padecieron un infarto de miocardio. Cuando se administra como una infusión intravenosa continua a los largo de 1,5 a 4 horas, el t-PA produce una permeabilidad coronaria a los 90 minutos del 69% en el 90% de los pacientes tratados. Topol *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 61, 723-728 (1988); Neuhaus *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 12:581-587 (1988); Neuhaus *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 14:1566-1569 (1989). Las velocidades de permeabilidad más elevadas se han descrito con dosis elevadas o regímenes de dosificación acelerada. Topol, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 15:922-924 (1990). El t-PA puede administrarse también como una única embolada, aunque debido a su relativamente corta vida media, es más apropiado para terapia por infusión. Tebbe *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 64:448-453 (1989). Una variante del t-PA, diseñada específicamente para tener una mayor vida media y una especificidad muy elevada por la fibrina, el TNK t-PA (una variante T103N, N117Q, KHRR (296-299)AAAA t-PA, Keyt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:3670-3674 (1994)) es particularmente apropiada para su administración en embolada. Sin embargo, a pesar de todos estos avances, la prognosis a largo plazo de la supervivencia del paciente depende enormemente en la monitorización y tratamiento de los pacientes con posterioridad al infarto, la cual debería incluir la monitorización y tratamiento de la hipertrofia cardíaca.

65

Factores de crecimiento

- Se ha descrito que varios polipéptidos que ocurren de forma natural inducen la proliferación de las células endoteliales. Entre estos polipéptidos se encuentran los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) básico y ácido (Burgess y Maciag, *Annual Rev. Biochem.*, 58:575 (1989)), el factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF) (Ishikawa *et al.*, *Nature*, 338:557 (1989)), y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Leung *et al.*, *Science*, 246:1306 (1989); Ferrara y Henzel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 161:851 (1989); Tischer *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165:1198 (1989); EP 471.754B, concedida el 31 de julio de 1996.
- Los medios condicionados por células transfectadas con el ADNc del VEGF humano (hVEGF) promovieron la proliferación de células endoteliales capilares, mientras las células control no lo conseguían. Leung *et al.*, *Science*, 246:1306 (1989). Se identificaron varios ADNc adicionales, en bibliotecas de ADNc humanas, que codifican isoformas ácidos del hVEGF de 121-, 189-, y 206-aminoácidos (también denominadas conjuntamente como proteínas relacionadas con el hVEGF). La proteína de 121 aminoácidos difiere del hVEGF a causa de la supresión de los 44 aminoácidos entre los residuos 116 y 159 del hVEGF. La proteína de 189 aminoácidos difiere del hVEGF gracias a la difiere del hVEGF a causa de la inserción de 24 aminoácidos en el residuo 116 del hVEGF, y aparentemente es idéntica al factor de permeabilidad vascular humano (hVPF). La proteína de 206 aminoácidos difiere del hVEGF a causa de una inserción de 41 aminoácidos en el residuo 116 del hVEGF. Houck *et al.*, *Mol. Endocrin.*, 5:1806 (1991); Ferrara *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 47:211 (1991); Ferrara *et al.*, *Endocrine Reviews*, 13:18 (1992); Keck *et al.*, *Science*, 246:1309 (1989); Connolly *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:20017 (1989); EP 370.989, publicada el 30 de mayo de 1990.
- Actualmente está claramente establecido que la angiogénesis, la cual implica la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de endotelio preexistente, está implicada en la patogénesis de una variedad de trastornos. Estos incluyen los tumores sólidos y la metástasis, aterosclerosis, fibroplasia retrolental, hemangiomas, inflamación crónica, síndromes neovasculares intraoculares tales como la retinopatía diabética, la degeneración macular asociada a la edad (AMD), el glaucoma neovascular, el rechazo inmune de tejido corneal trasplantado y de otros tejidos, la artritis reumatoide, y la psoriasis. Folkman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:10931-10934 (1992); Klagsbrun *et al.*, *Annu. Rev. Physiol.*, 53:217-239 (1991); y Garner A, "Vascular diseases", In: *Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach*, Garner A, Klintworth GK, editores, 2ª Edición (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710.
- En el caso del tumor sólido, la angiogénesis parece ser crucial para la transición de la hiperplasia a la neoplasia, y para proporcionar alimentos al tumor sólido en crecimiento. Folkman *et al.*, *Nature*, 339:58 (1989). La neovascularización permite a las células tumorales alcanzar una ventaja de crecimiento y una autonomía proliferativa en comparación con las células normales. En consecuencia, se ha observado una correlación entre la densidad de microvasos en secciones de tumor y la supervivencia de pacientes con cáncer de mama, así como en otros tumores. Weidner *et al.*, *N Engl J Med*, 324:1-6 (1991); Horak *et al.*, *Lancet*, 340:1120-1124 (1992); Macchiarini *et al.*, *Lancet*, 340:145-146 (1992).
- La búsqueda de reguladores positivos de la angiogénesis ha proporcionado muchos candidatos, incluyendo el aFGF, bFGF, TGF- α , TGF- β , HGF, TNF- α , angiogenina, IL-8, etc. Folkman *et al.*, J.B.C., ver más arriba, y Klagsbrun *et al.*, ver más arriba. Los reguladores negativos identificados hasta la fecha incluyen la trombospodina (Good *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87:6624-6628 (1990)), el fragmento N-terminal de 16-kilodalton de la prolactina (Clapp *et al.*, *Endocrinology*, 133:1292-1299 (1993)), la angiostatina (O'Reilly *et al.*, *Cell*, 79:315-328 (1994)), y la endostatina. O'Reilly *et al.*, *Cell*, 88:277-285 (1996).
- El trabajo realizado a los largo de los últimos años ha establecido el papel clave del VEGF, no sólo para estimular la proliferación de células endoteliales vasculares, sino también para inducir la permeabilidad vascular y la angiogénesis. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.*, 18:4-25 (1997). El hallazgo de que la pérdida de incluso un único alelo del VEGF resulta en mortalidad embrionaria, apunta a un papel irreemplazable jugado por este factor en el desarrollo y diferenciación del sistema vascular. Además, es ha mostrado que el VEGF es un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares. Ferrara *et al.*, *Endocr. Rev.*, ver más arriba. El ARNm del VEGF está sobreexpresado en la mayoría de los tumores humanos examinados, Berkman *et al.*, *J Clin Invest*, 91:153-159 (1993); Brown *et al.*, *Human Pathol.*, 26:86-91 (1995); Brown *et al.*, *Cancer Res.*, 53:4727-4735 (1993); Mattern *et al.*, *Brit. J. Cancer*, 73:931-934 (1996); Dvorak *et al.*, *Am J. Pathol.*, 146:1029-1039 (1995).
- De igual modo, los niveles de concentración de VEGF en los fluidos oculares están altamente correlacionados con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en paciente con retinopatía diabética y otras retinopatías relacionadas con la isquemia. Aiello *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 331:1480-1487 (1994). Además, estudios recientes han demostrado la localización del VEGF en membranas neovasculares coroidales en pacientes afectados de la AMD. Lopez *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37:855-868 (1996).
- Los anticuerpos neutralizadores anti-VEGF suprimen el crecimiento de una variedad de líneas celulares tumorales humanas en ratones desnudos (Kim *et al.*, *Nature*, 362:841-844 (1993); Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:1789-1797 (1995); Borgström *et al.*, *Cancer Res.*, 56:4032-4039 (1996); Melnyk *et al.*, *Cancer Res.*, 56:921-924 (1996)), y también inhiben la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos del retinales isquémicos. Adamis *et al.*, *Arch. Ophthalmol.*, 114:66-71 (1996). Por tanto, los anticuerpos monoclonales anti-VEGF, y otros inhibidores de la acción del VEGF, son candidatos prometedores para el tratamiento de tumores sólidos y de varios trastornos neovasculares intraoculares. Tales anticuerpos se describen, por ejemplo, en in EP 817.648 publicada el 14 de enero de 1998, y en PCT/US 98/06724 registrada el 3 abril de 1998.

- Hay otros diversos factores de crecimiento y mitógenos, incluyendo los oncogenes transformantes, que son capaces de inducir rápidamente la expresión de un complejo conjunto de genes por parte de ciertas células. Lau y Nathans, *Molecular Aspects of Cellular Regulation*, 6:165-202 (1991). Estos genes, los cuales se han denominado genes inmediatos-tempranos o de respuesta temprana, son activados transcripcionalmente minutos después de la puesta en
- 5 contacto con un factor de crecimiento o mitógeno, independientemente de la síntesis *de novo* de proteína. Un grupo de estos genes intermedios-tempranos codifica proteínas extracelulares secretadas, las cuales son necesarias para la coordinación de complejos procesos biológicos, tales como la diferenciación y proliferación, la regeneración, y la curación de heridas. Ryseck *et al.*, *Cell Growth Differ.*, 2:235-233 (1991).
- 10 Las proteínas altamente relacionadas que pertenecen a este grupo incluyen la cef 10 (Simmons *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1178-1182 (1989)), la *cyr 61*, la cual es rápidamente activas por el factor derivado del suero o de plaquetas (PDGF) (O'Brien *et al.*, *Mol. Cell Biol.*, 10:3569-3577 (1990)), el factor de crecimiento del tejido conectivo humano (CTGF) (Bradham *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 114:1285-1294 (1991), el cual es secretado por células endoteliales
- 15 β), exhibe actividades biológicas e inmunológicas similares al PDGF, y compite con el PDGF por un determinado receptor de la superficie celular, el *fisp-1 2* (Ryseck *et al.*, *Cell Growth Differ.*, 2:235-233 (1991)), un factor de crecimiento vascular humano parecido al IBP (VIGF) (WO 96/17931), inducidos por el virus del tipo 1 asociado a la mieloblastosis. Jolait *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 12:10-21 (1992).
- 20 La expresión de estos genes inmediatos-tempranos actúa como "terceros mensajeros" en la cascada de sucesos activados por los factores de crecimiento. Se cree también que son necesarios para integrar y coordinar procesos biológicos complejos, tales como la diferenciación y curación de heridas, en los que la proliferación celular es un suceso común.
- 25 Como mitógenos adicionales, se ha mostrado que las proteínas unidoras del factor de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP), en complejo con el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF), estimular una unión incrementada del IGF a receptores de la superficie de células de fibroblastos y músculo liso. Clemmons *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 77:1548 (1986). Los efectos inhibidores *in vitro* de las IGFBP sobre varias acciones del IGF incluyen la estimulación del transporte de glucosa por adipocitos, la incorporación de sulfato por parte de condrocitos,
- 30 y la incorporación de timidina en fibroblastos. Zapf *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 63:1077 (1979). Además, se han mostrado efectos inhibidores de las IGFBP sobre la actividad mitogénica mediada por factores de crecimiento en células normales.
- 35 *Ligandos y receptores del factor de necrosis tumoral*
- Varias moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral- α ("TNF- α "), el factor de necrosis tumoral- β ("TNF- β " o "linfotóxina- α "), la linfotóxina- β ("LT- β "), el ligando de CD30, el ligando de CD27, el ligando de CD40, el ligando de OX-40, el ligando de 4-1BB, el ligando de Apo-1 (también denominado como ligando de Fas o ligando de CD95),
- 40 el ligando de Apo-2 (también denominado TRAIL), se han identificado como miembros de la familia de citocinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") [Consultar, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Pitti *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley *et al.*, *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning *et al.*, *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage *et al.*, *Nature*, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997].
- 45 La inducción de varias respuestas celulares mediadas por tales citocinas de la familia del TNF se cree que se inicia con su unión a receptores celulares específicos. Se han identificado dos receptores distintos del TNF, de aproximadamente 55-kDa (TNFR1) y 75-kDa (TNFR2) [Hohman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989); Brockhaus *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-3131 (1990); EP 417.563; publicada el 20 de marzo de 1991], y los ADNc humano
- 50 y de ratón correspondientes a ambos tipos de receptores se han aislado y caracterizado (Loetscher *et al.*, *Cell*, 61:351 (1990); Schall *et al.*, *Cell*, 61:361 (1990); Smith *et al.*, *Science*, 248:1019-1023 (1990); Lewis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991); Goodwin *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991)]. Se han asociados amplios polimorfismos con los genes de ambos receptores del TNF [consultar, por ejemplo, Takao *et al.*, *Immunogenetics*, 37:199-203 (1993)]. Ambos TNFR comparten la estructura típica de los receptores de superficie celular, incluyendo las regiones
- 55 extramembrana, transmembrana e intracelulares. Las porciones extracelulares de ambos receptores se hallan también naturalmente como proteínas unidoras de TNF- β solubles [Nophar, Y. *et al.*, *EMBO J.*, 9:3269 (1990); y Kohno, T. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87:8331 (1990)]. Más recientemente, la clonación de receptores de TNF solubles recombinantes fue descrita por Hale *et al.* [*J. Cell. Biochem. Supplement 15F*, 1991, p. 113 (P424)].
- 60 La porción extracelular de los TNFR del tipo 1 y tipo 2 (TNFR1 y TNFR2) contienen un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivos de cuatro dominios ricos en cisteínas (CRD) denominados del 1 al 4, que empiezan a partir del extremo NH₂-terminal. Cada CRD tiene aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, y contiene de 4 a 6 residuos cisteína en posiciones que están bien conservadas [Schall *et al.*, *supra*; Loetscher *et al.*, *supra*; Smith *et al.*, *supra*; Nophar *et al.*, *supra*; Kohno *et al.*, *supra*]. En el TNFR1, los límites aproximados de los cuatro CRD son
- 65 como sigue: CRD1- aminoácidos 14 a aproximadamente 53; CRD2- aminoácidos desde aproximadamente 54 hasta aproximadamente 97; CRD3- aminoácidos desde aproximadamente 98 hasta aproximadamente 138; CRD4- aminoácidos desde aproximadamente 139 hasta aproximadamente 167. En el TNFR2, el CRD1 incluye los aminoácidos 17 a aproximadamente 54; CRD2- aminoácidos desde aproximadamente 55 hasta aproximadamente 97; CRD3- aminoáci-

dos desde aproximadamente 98 hasta aproximadamente 140; CRD4- aminoácidos desde aproximadamente 141 hasta aproximadamente 179 [Banner *et al.*, *Cell*, 73:431-435 (1993)]. El papel potencial de los CRD en la unión del ligando es descrito también por Banner *et al.*, ver más arriba.

- 5 Existe un patrón repetitivo de CDR similar en otras varias proteínas de la superficie celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento del nervio p75 (NGFR) [Johnson *et al.*, *Cell*, 47:545 (1986); Radeke *et al.*, *Nature*, 325:593 (1987)], el antígeno CD40 de la célula B [Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.*, 8:1403 (1989)], el antígeno OX40 de la célula T [Mallet *et al.*, *EMBO J.*, 9:1063 (1990)] y el antígeno Fas [Yonehara *et al.*, ver más arriba, e Itoh *et al.*, *Cell*, 66:233-243 (1991)]. Los CDR también se hallan en las proteínas solubles T2 similares al TNFR (sTNFR) de los virus de la viruela de Shope y mixoma [Upton *et al.*, *Virology*, 160:20-29 (1987); Smith *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 176:335 (1991); Upton *et al.*, *Virology*, 184:370 (1991)]. El alineamiento óptimo de estas secuencias indica que las posiciones de los residuos cisteína están bien conservadas. Estos receptores a menudo se denominan de forma conjunta como miembros de la superfamilia del receptor de TNF/NGF. Estudios recientes sobre el p75NGFR mostraron que la supresión del CRD I [Welcher, A.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:159-163 (1991)] o una inserción de 5 aminoácidos en este dominio [Yan, H. y Chao, M.V., *J. Biol. Chem.*, 266:12099-12104 (1991)] tenían poco o ningún efecto sobre la unión del NGF [Yan, H. y Chao, M.V., ver más arriba]. El p75 NGFR contiene una tirada rica en prolinas de aproximadamente 60 aminoácidos, entre su CRD4 y la región transmembrana, la cual no está implicada en la unión al NGF [Peetre, C. *et al.*, *Eur. J. Hematol.*, 41:414-419 (1988); Seckinger, P. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:11966-11973 (1989); Yan, H. y Chao, M.V., ver más arriba]. Una región similar rica en prolinas se halla en el TNFR2, pero no en el TNFR1.

- Los ligandos de la familia del TNF identificados hasta la fecha, con excepción de la linfoxina- α , son proteínas transmembrana del tipo II, cuyo extremo C-terminal es extracelular. Por contra, la mayoría de los receptores en la familia del receptor del TNF (TNFR) identificados hasta la fecha son proteínas transmembrana del tipo I. No obstante, en ambas familias del ligando y del receptor del TNF, la homología identificada entre los miembros de la familia se ha hallado principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias de las citocinas de la familia del TNF, incluyendo el TNF- α , el ligando de Apo-1 y el ligando de CD40, son cortadas proteolíticamente a nivel de la superficie celular; la proteína resultante en cada caso típicamente forma una molécula homotrimérica que funciona como una citocina soluble. Las proteínas de la familia del receptor del TNF también son cortadas proteolíticamente a menudo para liberar ECD solubles del receptor que pueden funcionar como inhibidores de las citocinas cognadas.

- Recientemente se han identificado otros miembros de la familia del TNFR. Tales miembros recién identificados incluyen el CAR1, HVEM y la osteoprotegerina (OPG) [Brojatsch *et al.*, *Cell*, 87:845-855 (1996); Montgomery *et al.*, *Cell*, 87:427-436 (1996); Marsters *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 272:14029-14032 (1997); Simonet *et al.*, *Cell*, 89:309-319 (1997)]. A diferencia de otras moléculas parecidas al TNFR conocidas, Simonet *et al.*, ver más arriba, informan que la OPG no contiene una secuencia hidrofóbica transmembrana.

- Además, se ha identificado en ratón un nuevo miembro de la familia del receptor TNF/NGF, un receptor denominado "GITR" por "gen inducido por glucocorticoide, relacionado con la familia del factor de necrosis del tumor" [Nocentini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:6216-6221 (1997)]. El receptor GITR de ratón es una proteína transmembrana de tipo I, de 228 aminoácidos, que se expresa en linfocitos T de ratón normales, procedentes del timo, bazo y nodos linfáticos. La expresión del receptor GITR de ratón se indujo en linfocitos T a partir de su activación con anticuerpos anti-CD3, Con A, o forbol 12-miristato o 13-acetato. Los autores especularon que el receptor GITR del ratón estaba implicado en la regulación de la muerte celular mediada por receptor de la célula T.

- En Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 6:750 (1996), los investigadores describen un polipéptido humano de secuencia nativa, de longitud completa, denominado Apo-3, el cual presenta similitud con la familia del TNFR en sus repeticiones extracelulares ricas en cisteínas, y que se parece al TNFR1 y CD95 en que contiene una secuencia de dominio de muerte citoplasmática [consultar también Marsters *et al.*, *Curr. Biol.*, 6:1669 (1996)]. El Apo-3 ha sido denominado por otros investigadores como DR3, wsl-1 y TRAMP [Chinnaiyan *et al.*, *Science*, 274:990 (1996); Kitson *et al.*, *Nature*, 384:372 (1996); Bodmer *et al.*, *Immunity*, 6:79 (1997)].

- Pan *et al.* han descrito otro miembro de la familia del receptor del TNF denominado como "DR4" [Pan *et al.*, *Science*, 276:111-113 (1997)]. Se describió que el DR4 contenía un dominio de muerte citoplasmático capaz de poner en marcha el aparato de suicidio de la célula. Pan *et al.* describen que se cree que el DR4 es un receptor para el ligando conocido como ligando de Apo-2 o TRAIL.

- En Sheridan *et al.*, *Science*, 277:818-921 (1997) y Pan *et al.*, *Science*, 277:815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree que es un receptor para el ligando de Apo2L (TRAIL). Esa molécula se denomina como DR5 (también se ha denominado alternativamente como Apo-2). Al igual que el DR4, se ha descrito que el DR5 contiene un dominio de muerte citoplasmático y que es capaz de dar la señal para la apoptosis.

- En Sheridan *et al.*, ver más arriba, se descubre un receptor denominado DcR1 (o alternativamente Apo-2DcR) como un receptor señuelo potencial para el ligando de Apo-2 (TRAIL). Sheridan *et al.* informan que el DcR1 puede inhibir *in vitro* la función del ligando de Apo-2. Consultar también, Pan *et al.*, ver más arriba, para una descripción del receptor señuelo denominado TRID.

Para una revisión de la familia de citocinas del TNF y sus receptores, consultar Gruss y Dower, ver más arriba.

Necesidad de tratamientos adicionales

A la vista del papel del crecimiento de las células endoteliales vasculares y de la angiogénesis en muchas enfermedades y trastornos, es deseable tener un medio para reducir o inhibir uno o más de los efectos biológicos causantes de estos procesos. Es deseable también tener un medio para ensayar la presencia de polipéptidos patogénicos en condiciones normales y morbosas, y especialmente en el cáncer. Además, en un aspecto específico, puesto que no hay una terapia aplicable de forma general para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca, la identificación de factores que pueden prevenir o reducir la hipertrofia de miocito cardíaco es de primordial importancia en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para inhibir el crecimiento cardíaco patofisiológico. Mientras que hay varias modalidades de tratamiento para varios trastornos cardiovasculares y oncológicos, hay todavía una necesidad de enfoques terapéuticos adicionales.

Resumen de la invención

En consecuencia, la presente invención concierne a composiciones y procedimientos para promover o inhibir la angiogénesis y/o cardiovascularización en mamíferos. En la presente invención se describen los clones de ADNc que codifican los polipéptidos denominados en la presente solicitud como "PRO364" y "PRO175". Estas proteínas dieron positivo en varios ensayos cardiovasculares que ensayaban la promoción o inhibición de ciertas actividades biológicas. En consecuencia, se cree que las proteínas son fármacos útiles para el diagnóstico y/o tratamiento (incluyendo la prevención) de trastornos en los que se desean tales efectos, tales como la promoción o inhibición de la angiogénesis, la inhibición del crecimiento o proliferación de células endoteliales vasculares, la inhibición del crecimiento tumoral, y la inhibición del crecimiento de tejido dependiente de la angiogénesis.

En una realización, la presente invención concierne a una composición que comprende un polipéptido PRO364 (hGITR), en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, y un agente angiogénico cardiovascular, endotelial, o un agente angiostático. En otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un polipéptido PRO175 (hGITRL o GLITTER) en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o ambos polipéptidos. En otro aspecto, la composición comprende un ingrediente activo adicional, a saber, un agente cardiovascular, endotelial o angiogénico, o un agente angiostático, preferiblemente un agente angiogénico o angiostático. Preferiblemente la composición es estéril. El polipéptido PRO364 o PRO175 pueden administrarse en forma de una formulación farmacéutica líquida, la cual puede conservarse para conseguir una estabilidad en almacenamiento prolongada. Las formulaciones farmacéuticas líquidas conservadas pueden contener múltiples dosis del polipéptido PRO364 o PRO175, y pueden, por tanto, sea apropiadas para un uso repetido.

En una realización adicional, la invención proporciona un procedimiento para preparar tal composición para el tratamiento de un trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico, que comprende mezclar una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido PRO364 o PRO175 con el portador.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un producto farmacéutico que comprende:

- (a) tal composición, que comprende una dosis terapéuticamente efectiva del polipéptido PRO364, en mezcla con un agente cardiovascular, endotelial o angiogénico, o un agente angiostático, o el polipéptido PRO175;
- (b) un contenedor que contiene dicha composición; y
- (c) una etiqueta pegada a dicho contenedor, o un prospecto incluido en dicho producto farmacéutico que se refiere al uso de dicho polipéptido PRO364 o PRO175 en el tratamiento de un trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un proceso para diagnosticar una enfermedad, o una susceptibilidad hacia una enfermedad relacionada con una mutación en la secuencia de ácido nucleico del polipéptido PRO364 o PRO175, que comprende:

- (a) aislar una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 a partir de una muestra derivada de un huésped; y
- (b) determinar una mutación en la secuencia de ácido nucleico del polipéptido PRO364 o PRO175.

En aún otro aspecto, la invención proporciona un proceso de diagnóstico que comprende analizar en busca de la presencia del polipéptido PRO364 o PRO175 en una muestra derivada de un huésped.

En aún otra realización, la presente invención concierne a un procedimiento de diagnóstico de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos en un mamífero, el cual comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido PRO364 o PRO175 (a) en una muestra de ensayo de células del tejido obtenida del mamífero, y (b) en una muestra de control de células de tejido que se sabe es normal del mismo tipo de células, en donde una nivel de expresión superior o inferior en la muestra de ensayo indica la presencia de una disfunción cardiovascular, endotelial y angiogénica en el mamífero del cual se obtuvieron las células de tejido de ensayo.

En aún otro realización, la invención concierne al uso de un polipéptido PRO364 o PRO175 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno cardiovascular, endotelial o angiogénico en un mamífero. Preferiblemente, el trastorno es una hipertrofia cardíaca, una trauma, tal como heridas o quemaduras, o un tipo de cáncer. En un aspecto adicional, el mamífero se expone además a angioplastia, o a un fármaco que trata los trastornos

cardiovasculares, endoteliales, y angiogénicos, tal como los inhibidores del ACE, o un agente quimioterapéutico si el trastorno cardiovascular, endotelial y angiogénico es un tipo de cáncer. Preferiblemente, el mamífero es un humano, preferiblemente alguien que presenta riesgo de desarrollar una hipertrofia cardíaca, y más preferiblemente que ha padecido un infarto de miocardio.

En otro aspecto preferido, la hipertrofia cardíaca se caracteriza por la presencia de un nivel elevado de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Alternativamente, la hipertrofia cardíaca puede ser inducida por un infarto de miocardio, en donde preferiblemente la administración del polipéptido PRO364 o PRO175 se inicia durante la 48 horas, más preferiblemente durante las 24 horas, siguientes al infarto de miocardio.

En otra realización preferida, el trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico es la hipertrofia cardíaca, y dicho polipéptido PRO364 o PRO175 se administra junto con un agente cardiovascular, endotelial, o angiogénico. El agente cardiovascular, endotelial, o angiogénico preferido para este propósito se selecciona de entre el grupo consistente en un fármaco antihipertensivo, un inhibidor de ACE, un antagonista de receptor de endotelina, y un agente trombolítico. Si se administra un agente trombolítico, el polipéptido PRO364 o PRO175 preferiblemente se administra a continuación de la administración de tal agente. Más preferiblemente, el agente trombolítico es un activador del plasminógeno tisular humano.

En otro aspecto preferido, el trastorno cardiovascular, endotelial y angiogénico es la hipertrofia cardíaca, y el polipéptido PRO364 o PRO175 se administra a continuación de una angioplastia primaria para el tratamiento del infarto de miocardio agudo, preferiblemente cuando el mamífero se expone además a angioplastia, o a un agente cardiovascular, endotelial, o angiogénico.

En otra realización preferida, el trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico es un cáncer, y el polipéptido PRO364 o PRO175 se administra en combinación con un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente citotóxico.

En otra realización, la invención facilita un proceso para identificar agonistas contra un polipéptido PRO364 o PRO175, que comprende:

- (a) poner en contacto células y un compuesto a examinar, en condiciones apropiadas para la estimulación de la proliferación celular por parte de PRO364 o PRO175; y
- (b) medir la proliferación de las células para determinar si el compuesto es un agonista efectivo.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para identificar un compuesto que inhibe la expresión o actividad de un polipéptido PRO364 o PRO175, que comprende poner en contacto un compuesto candidato con un polipéptido PRO364 o PRO175 en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que el compuesto y el polipéptido interactúen. En una aspecto preferido, el compuesto candidato o el polipéptido PRO364 o PRO175 está inmovilizado sobre un soporte sólido. En otro aspecto preferido, el componente no inmovilizado es portador de una marca detectable. Preferiblemente, este proceso comprende los pasos de:

- (a) poner en contacto células y un compuesto a examinar, en presencia de polipéptido PRO364 o PRO175, en condiciones apropiadas para la estimulación de la proliferación celular por parte del polipéptido PRO364 o PRO175; y
- (b) medir la proliferación de las células para determinar si el compuesto es un antagonista efectivo.

También se describe en la presente invención el uso de un antagonista contra un polipéptido PRO364 o PRO175 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno cardiovascular, endotelial o angiogénico en un mamífero. Preferiblemente, el trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico es la hipertrofia cardíaca, un trauma, un cáncer, o la degeneración macular relacionada con la edad. Es también preferido cuando el mamífero es un humano, y cuando se administra una cantidad efectiva de un agente angiogénico o angiostático conjuntamente con el antagonista.

Un tipo de antagonista de un polipéptido PRO364 o PRO175 que inhibe una o más de las funciones o actividades de polipéptido PRO364 o PRO175 es un anticuerpo. También se describe en la presente invención un anticuerpo aislado que une un polipéptido PRO364 o PRO175.

El anticuerpo podría ser un anticuerpo monoclonal, el cual preferiblemente has residuos de la región determinante de la complementariedad (CDR) humanos, y residuos de la región estructural (FR) humanos. El anticuerpo puede marcarse, y puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. El anticuerpo puede ser un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de cadena única, o un anticuerpo anti-idiotípico.

En otra realización, la invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un polipéptido PRO364 o PRO175 que comprende exponer una célula sospechosa de contener el polipéptido PRO364 o PRO175 a un anticuerpo anti-PRO364 o -PRO175 y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicha célula.

5 En aún otra realización, la invención proporciona un procedimiento para diagnosticar trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos en un mamífero, el cual comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti-PRO364
-PRO175 con una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) detectar la formación de un
10 complejo entre el anticuerpo anti-PRO364 o PRO175 y el PRO364 o PRO175 en la muestra de ensayo. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa, y puede realizarse comparándola con la monitorización de la formación de
complejo en una muestra control conocida de células de tejidos normal del mismo tipo de célula. Una mayor o menor
cantidad de complejos formados en la muestra de ensayo indica la presencia de una disfunción cardiovascular,
endotelial, y angiogénico en el mamífero del cual se obtuvieron las células de tejido de ensayo. El anticuerpo preferi-
blemente es portador de una marca detectable. La formación de complejo puede monitorizarse, por ejemplo, mediante
microscopía óptica, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en la técnica. La muestra de ensayo se
15 obtiene usualmente de un individuo sospechoso de tener un trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un equipo de diagnóstico de cáncer que comprende un anticuerpo anti-PRO364 o -PRO175, y un portador, en un envase apropiado. Preferiblemente, tal equipo comprende además
instrucciones para usar dicho anticuerpo para detectar el polipéptido PRO364 o PRO175. Preferiblemente, el portador
20 es un tampón, por ejemplo. En una realización adicional, la invención proporciona un artículo manufacturado, que comprende:

un contenedor;

25 una etiqueta sobre el contenedor,

una composición que comprende un anticuerpo anti-PRO364 o -PRO175 contenido dentro del contenedor,
en donde la etiqueta sobre el contenedor indicar que la composición puede usarse para tratar trastornos
cardiovasculares, endoteliales, y angiogénicos.

30 En aún otra realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo que une un polipéptido PRO364 o PRO175 para la preparación de un medicamento inhibidor de la angiogénesis inducida por el polipéptido PRO364 o PRO175 en un mamífero. Preferiblemente el mamífero es un humano, y más preferiblemente el mamífero tiene un tumor o un trastorno retinal.

35 Descripción resumida de las figuras

La Figura 1 muestra una secuencia nucleotídica (SEC. N° ID.: 1) que contiene la secuencia nucleotídica (SEC. N° ID.: 2) de una ADNc de PRO364 de secuencia nativa (nucleótidos 121-843), en donde la secuencia de nucleótidos (SEC. N° ID.:1) es un clon denominado en la presente invención como “UNQ319” y/o “DNA47365-1206”. También está presente la posición del residuo de metionina iniciador, así como la posición de los tres cebadores de oligonucleótido denominados “47365.tm.f”, “47365.tm.p” y “47365.tm.r”, los cuales están subrayados. El dominio transmembrana putativo está codificado por los nucleótidos 604-660 en la figura.

45 La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de PRO 364 (SEC. N° ID.:3) derivada de los nucleótidos 121-843 de la secuencia nucleotídica mostrada en la Figura 1 (SEC. N° ID.:2). Existe un potencial dominio transmembrana en la figura, entre los aminoácidos 162 a 180, inclusive.

Las Figura 3A-C muestran una secuencia nucleotídica consenso (SEC. N° ID.:4) denominada “<consen01>”.

50 La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos consenso “<consen01>” mostrada en las Figuras 3A-C denominadas en la presente solicitud como DNA44825 (SEC. N° ID.:4). También está presente la posición de los cebadores de oligonucleótidos denominados “44825.GITR.f” (SEC. N° ID.: 5), “44825.fl” (SEC. N° ID.: 6), “44825.GITR.p” (SEC. N° ID.: 7), “44825.r2” (SEC. N° ID.: 8), “44825.pl” (SEC. N° ID.: 9), “44825.GITR.r” (SEC. N° ID.: 10),
55 “44825.f2” (SEC. N° ID.: 11), y “44825.r1” (SEC. N° ID.: 12), los cuales están subrayados.

Las Figuras 5A-B muestra la secuencia nucleotídica codificante (SEC. N° ID.: 13) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC. N° ID.: 14) de un clon de ADNc denominado en la presente invención como PRO175-1150.

60 La Figura 6 ilustra la expresión relativa del ARNm de PRO364 en varias células y tejidos humanos, según se determinó mediante PCR cuantitativa con transcriptasa inversa.

La Figura 7 ilustra la expresión relativa del ARNm de PRO364 en células T humanas primarias y monocitos (Tratados con anticuerpo anti-CD3, PHA o LPS), según se determinó mediante PCR cuantitativa con transcriptasa
65 inversa.

La Figura 8 muestra un análisis de transferencia Northern de la expresión del ARNm de PRO175 en tejidos humanos (tejidos adulto y fetal no identificados), y en líneas de células tumorales (leucemia promielocítica HL60, carci-

noma del cuello uterino HeLa S3, leucemia mielógena crónica K562, leucemia linfoblástica MOLT4, linfoma de Raji Burkitt, adenocarcinoma colorectal SW480, carcinoma de pulmón A549, y melanoma G361).

La Figura 9 muestra un análisis de polipéptido PRO175 soluble mediante SDS-PAGE.

La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo de coprecipitación descrito más adelante en el Ejemplo 6. La autorradiografía del gel de SDS-PAGE reveló la molécula PRO364-IgG unida al polipéptido PRO175 radiodado. La unión no se observó para las otras construcciones de inmunoadhesina identificadas.

La Figura 11A muestra los resultados del análisis FACS de células 293 transfectadas, ensayadas en función de la unión a los receptores identificados o a las construcciones de ligando-inmunoadhesina.

La Figura 11B muestra los resultados del análisis FACS de células HUVEC, ensayadas en función de la unión a las construcciones de inmunoadhesina identificadas.

La Figura 12 es un histograma que muestra el efecto de ligando PRO175 sobre la expresión de c-fos en pericitos humanos.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Las frases “trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico” y “disfunción cardiovascular, endotelial, y angiogénica” se usan de forma intercambiable, y se refieren a trastornos sistémicos que afectan los vasos, tales como la diabetes mellitus, así como las enfermedades de los propios vasos, tales como las arterias, capilares, venas y/o linfáticos. Esto incluiría indicaciones que estimulan la angiogénesis y/o la cardiovascularización, y aquellas que inhiben la angiogénesis y/o la cardiovascularización. Tales trastornos incluyen, por ejemplo, las enfermedades arteriales, tales como la aterosclerosis, la hipertensión, las vasculitis inflamatorias, la enfermedad de Reynaud y el fenómeno de Reynaud, los aneurismas, y la reestenosis arterial; los trastornos venosos y linfáticos tales como la tromboflebitis, la linfangitis, y el linfedema; y otros trastornos vasculares tales como la enfermedad vascular periférica; el cáncer, tales como los tumores vasculares, por ejemplo, el hemangioma (capilar y cavernoso), los tumores del glomus, la telangiectasia, la angiomasia bacilar, el hemangioendotelioma, el angiosarcoma, el hemangiopericitoma, el sarcoma de Kaposi, el linfangioma, y el linfangiosarcoma, la angiogénesis tumoral; los traumas tales como las heridas, quemaduras, y otros tejidos lesionados, la fijación de implantes, la cicatrización, la lesión por reperfusión de isquemia, la artritis reumatoide, la enfermedad cerebrovascular, las enfermedades renales tales como el fallo renal agudo, y la osteoporosis. Esto incluiría también las anginas de pecho, los infartos de miocardio tales como los infartos de miocardio agudos, la hipertrofia cardíaca, y el fallo cardíaco tal como el CHF.

“Hipertrofia”, tal como se usa en la presente invención, se define como un incremento en la masa de un órgano o estructura, independiente del crecimiento natural, y que no implica la formación de tumor. La hipertrofia de un órgano o tejido se debe a un incremento en la masa de las células individuales (hipertrofia verdadera), o a un incremento en el número de celular que forman el tejido (hiperplasia), o a ambos. Ciertos órganos, tales como el corazón, pierden la capacidad de dividirse poco después del nacimiento. En consecuencia, la “hipertrofia cardíaca” se define como un incremento en la masa del corazón, el cual, en los adultos, está caracterizada por un incremento en el tamaño celular de los miocitos y en el contenido de proteína contráctil, sin división celular concomitante. El carácter del estrés responsable de incitar la hipertrofia (por ejemplo, carga previa incrementada, carga posterior incrementada, pérdida de miocitos, como en el infarto de miocardio, o depresión primaria de la contractibilidad), parece desempeñar un papel crítico en la determinación de la naturaleza de la respuesta. La etapa temprana de la hipertrofia cardíaca habitualmente se caracteriza morfológicamente por incrementos en el tamaño de las microfibrillas y de las mitocondrias, así como por un agrandamiento de las mitocondrias y núcleos. En esta etapa, aunque las células musculares son mayores que las normales, la organización celular está mayoritariamente conservada. En una etapa más avanzada de la hipertrofia cardíaca, hay un incremento preferente en el tamaño de orgánulos específicos, tales como las mitocondrias, y se añaden nuevos elementos contráctiles en áreas localizadas de las células, de una manera irregular. Las células sometidas a una hipertrofia de larga duración muestra alteraciones más obvias de la organización celular, incluyendo núcleos marcadamente aumentados con membranas altamente lobuladas, los que desplaza las miofibrillas adyacentes y causa la rotura del patrón de banda Z normal. La frase “hipertrofia cardíaca” se usa para incluir todas las etapas de la progresión de esta condición, caracterizada por varios grados de lesión estructural del músculo cardíaco, con independencia del trastorno cardíaco subyacente. Por tanto, el término incluye también las condiciones fisiológicas instrumentales en el desarrollo de la hipertrofia cardíacas, tales como la presión sanguínea elevada, la estenosis aórtica, o el infarto de miocardio.

“Fallo cardíaco” se refiere a una anomalía de la función cardíaca en la cual el corazón no bombea sangre con la frecuencia necesaria para las necesidades de los tejidos metabolizantes. El fallo cardíaco puede estar causado por un cierto número de factores, incluyendo las formas isquémicas, congénitas, reumáticas o idiopáticas.

La “insuficiencia cardíaca congestiva” (CHF) es un estado patológico progresivo en donde el corazón es incapaz, de forma creciente, de proporcionar el rendimiento cardíaco adecuado (el volumen de sangre bombeada por el corazón a lo largo del tiempo) para aportar la sangre oxigenada a los tejidos periféricos. A medida que progresa el CHF,

ocurren daños estructurales y hemodinámicos. Mientras que estas lesiones tienen una variedad de manifestaciones, un síntoma característico es la hipertrofia ventricular. El CHF es un resultado final común a un cierto número de trastornos cardíacos.

5 El “infarto de miocardio” es generalmente el resultado de una aterosclerosis de las arterias coronarias, a menudo con una trombosis coronaria superpuesta. Puede dividirse en dos tipos principales: infartos transmurales, en los cuales la necrosis de miocardio implica todo el grosor de la pared ventricular, y los infartos subendocárdicos (no transmura-
10 les), en los que la necrosis afecta al subendocardio, el miocardio intramural, o ambos, sin extenderse a lo ancho de toda la pared, desde la pared ventricular hasta el epicardio. Se sabe que el infarto de miocardio causa ambos, un cambio en los efectos hemodinámicos y una alteración en la estructura de las zonas lesionadas y sanas del corazón. De ese modo, por ejemplo, el infarto de miocardio reduce el rendimiento máximo cardíaco y la descarga sistólica del corazón. También asociadas con el infarto de miocardio, hay una estimulación de la síntesis de ADN que ocurre en el intersticio, así como un incremento en la formación de colágeno en las áreas del corazón que no están afectadas.

15 A resultas del estrés o tensión incrementada impuesto sobre el corazón en la hipertensión prolongada debida, por ejemplo, a una resistencia periférica total incrementada, desde hace tiempo se ha asociado la hipertrofia cardíaca con la “hipertensión”. Una característica del ventrículo que deviene hipertrófico a resultas de una sobrecarga de presión crónica es una respuesta diastólica dañada. Fouad *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 4:1500-1506 (1984); Smith *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 5:869-874 (1985). Se ha detectado una relajación ventricular izquierda prolongada en la hipertensión
20 esencial temprana, en vez de una función sistólica normal o supranormal. Hartford *et al.*, *Hypertension*, 6:329-338 (1984). Sin embargo, no hay un estrecho paralelismo entre los niveles de presión sanguínea y la hipertrofia cardíaca. Aunque se ha descrito la mejora de la función ventricular izquierda en respuesta a la terapia antihipertensiva en humanos, los pacientes tratados de forma varia con un diurético (hidroclorotiazida), un β -bloqueante (propranolol), o un bloqueador del canal de calcio (diltiazem), han mostrado una regresión de la hipertrofia ventricular izquierda, sin
25 una mejora de la función diastólica. Inouye *et al.*, *Am. J. Cardiol.*, 53:1583-7 (1984).

Otra enfermedad cardíaca compleja asociada con la hipertrofia cardíaca es la “cardiomiopatía hipertrófica”. Esta condición se caracteriza por una gran diversidad de características morfológicas, funcionales y clínicas (Maron *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 316:780-789 (1987); Spirito *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 320:749-755 (1989); Louie y Edwards, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 36:275-308 (1994); Wigle *et al.*, *Circulation*, 92:1680-1692 (1995)), cuya heterogeneidad está
30 acentuada por el hecho de afligir pacientes de todas las edades. Spirito *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 336:775-785 (1997). Los factores causantes de la cardiomiopatía hipertrófica son también diversos y poco comprendidos. En general, las mutaciones en genes que codifican proteínas sarcoméricas están asociados con la cardiomiopatía hipertrófica. Datos recientes sugieren que las mutaciones en la cadena pesada de la β -miosina pueden ser responsables de aproximada-
35 mente el 30 a 40 por cientos de los casos de cardiomiopatía hipertrófica familiar. Watkins *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 326:1108-1114 (1992); Schwartz *et al.*, *Circulation*, 91:532-540 (1995); Marian y Roberts, *Circulation*, 92:1336-1347 (1995); Thierfelder *et al.*, *Cell*, 77:701-712 (1994); Watkins *et al.*, *Nat. Gen.*, 11:434-437 (1995). Aparte de la cadena pesada de la β -mioglobina, otras lugares de mutaciones genéticas incluyen la troponina T cardíaca, la alfa-tropomiosina, la proteína C unidora de la miosina cardíaca, la cadena ligera esencial de la miosina, y la cadena ligera reguladora
40 de la miosina. Consultar Malik y Watkins, *Curr. Opin. Cardiol.*, 12:295-302 (1997).

La “estenosis aórtica” supravalvular es un trastorno vascular hereditario, caracterizado por el estrechamiento de la aorta ascendente, pero otras arterias, incluyendo las arterias pulmonares, también pueden verse afectadas. La estenosis
45 aórtica no tratada puede conducir a una presión intracardíaca incrementada que resulta en un hipertrofia de miocardio y, eventualmente, en el fallo cardíaco y en la muerte. La patogénesis de este trastorno no se comprende completamente, pero la hipertrofia y la posible hiperplasia del músculo liso medial son características destacadas de este trastorno. Se ha descrito que las variantes moleculares del gen de la elastina están implicadas en el desarrollo y patogénesis de la estenosis aórtica. Patente estadounidense n° 5.650.282 concedida el 22 de julio de 1997.

50 La “regurgitación valvular” ocurre a resultas de enfermedades cardíacas que resultan en trastornos de las válvulas cardíacas. Varias enfermedades, como la fiebre reumática, puede causar el estrechamiento o el desplazamiento del orificio de la válvula, mientras que otras enfermedades pueden resultar en endocarditis, una inflamación del endocardio o membrana de recubrimiento de los orificios atrioventriculares, y del funcionamiento del corazón. Los defectos tales como el estrechamiento de la válvula, estenosis, o el cierre defectuoso de la válvula, resultan en una acumulación de
55 sangre en la cavidad del corazón o en la regurgitación de sangre una vez pasada la válvula. Si no se corrige, la estenosis o insuficiencia valvular prolongada puede resultar en hipertrofia cardíaca y en la lesión asociada del músculo cardíaco, lo que puede requerir eventualmente la sustitución de la válvula.

El tratamiento de todos estos, y otros, trastornos cardiovasculares, endoteliales, y angiogénicos, los cuales pueden
60 o no estar acompañados por hipertrofia cardíaca, está abarcado por la presente invención.

Los términos “cáncer”, “canceroso” y “maligno” se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular descontrolado. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, el carcinoma, incluyendo el adenocarcinoma, el linfoma, el blastoma, el melanoma, el sarcoma y la
65 leucemia. Los ejemplos más concretos de tales cánceres incluyen el carcinoma de célula escamosa, el cáncer pulmonar de célula pequeña, el cáncer pulmonar de células no pequeñas, el cáncer gastrointestinal, el linfoma de Hodgkin o no Hodgkin, el cáncer de páncreas, el glioblastoma, el cáncer de cuello de útero, el cáncer de ovarios, los cánceres de hígado, tales como el carcinoma hepático y hepatoma, el cáncer de vejiga, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el

cáncer colorectal, el carcinoma de endometrio, el carcinoma de la glándula salivar, los cánceres de riñón, tal como el carcinoma de célula renal y los tumores de Wilm, el carcinoma de célula basal, el melanoma, el cáncer de próstata, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, el cáncer de testículos, el cáncer de esófago, y varios tipos de cánceres de cabeza y cuello. Los cánceres preferidos para su tratamiento en la presente invención son los de mama, colon, pulmón, melanoma, de ovario, y otros que implican tumores vasculares, como se apuntó más arriba.

El término “agente citotóxico”, tal como se usa en la presente, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. Se pretende que el término incluya los isótopos radiactivos (por ejemplo, ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y y ^{186}Re), los agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes, los antagonistas del ácido fólico, los anti-metabolitos del metabolismo del ácido nucleico, los antibióticos, los análogos de la pirimidina, el 5-fluorouracilo, el cisplatino, los nucleósidos de purina, las aminas, los aminoácidos, los nucleósidos de triazol, o los corticosteroides. Los ejemplos específicos incluyen la adriamicina, la doxorubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina (“Ara-C”), la ciclofosfamida, la tiotepa, el busulfán, la citoxina, el taxol, el toxotero, el metotrexato, el cisplatino, el melfalán, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C, la mitoxantrona, la vincristina, la vinorelbina, el carboplatino, la teniposida, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (ver patente estadounidense nº 4.675.187), el melfalán, y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición los agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores, tales como el tamoxifén y la onapristona.

Un “agente inhibidor del crecimiento”, cuando se usa en la presente invención, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, tal como una célula cancerosa que sobreexpresa el Wnt, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células cancerosas en la fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en una etapa distinta de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención en G1 y en la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen el vincas (vincristina y vinblastina), el taxol, y los inhibidores de la topoisomerasa II tales como la doxorubicina, la daunorubicina, el etopósido y la bleomicina. Aquellos agentes que detienen en G1 también rebasan hacia la detención en la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN tales como el tamoxifén, la prednisona, la dacarbazina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y el Ara-C. Puede hallarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, editores Mendelsohn e Israel, capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs” por Murakami *et al.*, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la p. 13. Los ejemplos adicionales incluyen el factor de la necrosis tumoral (TNF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar la actividad angiogénica del FGF ácido o básico o del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), un anticuerpo capaz de inhibir o neutralizar las actividades anticoagulantes del factor tisular, de la proteína C, o de la proteína S (consultar WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), o un anticuerpo capaz unirse al receptor de HER2 (WO 89/06692), tal como el anticuerpo 4D5 (y equivalentes funcionales del mismo) (por ejemplo, WO 92/22653).

“Tratamiento” es una intervención realizada con intención de impedir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico. El concepto de tratamiento se usa en el sentido más amplio, e incluye específicamente la prevención (profilaxis), la moderación, la reducción, y la curación de los trastornos cardiovasculares, endoteliales, y angiogénicos en cualquier etapa. En consecuencia, “trastorno” se refiere tanto al tratamiento terapéutico y profiláctico como a las medidas preventivas, en donde el objeto es prevenir o retrasar (aliviar) un trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico, tal como la hipertrofia. Aquellos que precisan el tratamiento incluyen aquellos que ya presentan el trastorno, así como aquellos que son proclives a padecer el trastorno, o aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. El trastorno puede resultar de cualquier causa, incluyendo las causas idiopáticas, cardiotróficas, o miotróficas, o la isquemia o las lesiones isquémicas, tales como el infarto de miocardio.

La administración “crónica” se refiere a la administración del factor o factores de un modo continuo, en oposición a un modo agudo, con objeto de mantener el efecto inicial, tal como un efecto antihipertrófico, durante un extenso período de tiempo.

Mamífero, para los propósitos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los humanos, los animales domésticos y de granja, de zoológicos y de deportes, o los animales de compañía, tales como los perros, los caballos, los gatos, las terneras, las ovejas, los cerdos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

Administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

La frase “agentes cardiovasculares, endoteliales, o angiogénicos” se refiere genéricamente a cualquier fármaco que actúa en el tratamiento de trastornos cardiovasculares, endoteliales, y angiogénicos. Son ejemplos de agentes cardiovasculares aquellos que promueven la homeostasis vascular modulando la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca, la contractibilidad cardíaca, y la biología del endotelio y del músculo liso, factores que tienen un papel en la enfermedad cardiovascular. Los ejemplos específicos de éstos incluyen los antagonistas del receptor de la angiotensina-II;

los antagonistas del receptor de la endotelina tales como, por ejemplo, el BOSENTANTM y el MOXONODINTM; el interferón gamma (IFN- γ); la des-aspartato-angiotensina I; los agentes trombolíticos, por ejemplo, la estreptoquinasa, la uroquinasa, el t-PA, y una variante del t-PA diseñada específicamente para tener una vida media más larga y una especificidad muy elevada por la fibrina, el TNK t-PA (una variante T103N, N117Q, KHRR (296-299)AAAA t-PA, Keyt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 3670-3674 (1994)); los agentes inotrópicos o los agentes hipertensivos tales como la digoxigenina y los agentes bloqueadores del receptor β -adrenérgico, por ejemplo, el propranolol, timolol, tertalolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutolol, atenolol, metoprolol, y carvedilol; los inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina (ACE), por ejemplo, el quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril, y lisinopril; los diuréticos, por ejemplo, la clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetazida, metilclotiazida, benzotiazida, diclorfenamida, acetazolamida, e indapamida; y los bloqueadores del canal de calcio, por ejemplo, el diltiazem, la nifedipina, el verapamil, y la nicardipina. Una categoría preferida de este tipos es un agente terapéutico usado para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca, o de una condición fisiológica instrumental en el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, tal como la presión sanguínea elevada, la estenosis aórtica, o el infarto de miocardio.

Los “agentes angiogénicos” y los “agentes endoteliales” son agentes activos que promueven la angiogénesis y/o el crecimiento de células endoteliales, o, si es aplicable, la vasculogénesis. Esto incluiría factores que aceleran la cicatrización de las heridas, tales como la hormona del crecimiento, el factor-I de crecimiento parecido a la insulina (IGF-I), el VEGF, el VIGF, el PDGF, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el CTGF y los miembros de su familia, el FGF, y el TGF- α y TGF- β .

Los “agentes angiostáticos” son agentes activos que inhiben la angiogénesis o la vasculogénesis, o que inhiben o previenen de otro modo el crecimiento de las células cancerosas. Los ejemplos incluyen anticuerpos u otros antagonistas de agentes angiogénicos como los definidos más arriba, tales como los anticuerpos contra el VEGF. Adicionalmente incluyen los agentes citoterapéuticos tales como los agentes citotóxicos, los agentes quimioterapéuticos, los agentes inhibidores del crecimiento, los agentes apoptóticos, y otros agentes para tratar el cáncer, tales como el anti-HER-2, el anti-CD20; y otros agentes bioactivos y químicos orgánicos.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una “cantidad terapéuticamente efectiva” de un agente activo, tal como un polipéptido PRO364 o PRO175, o un antagonista de los mismos, se refiere a una cantidad efectiva para el tratamiento de un trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico.

Tal como se usa en la presente, un “polipéptido PRO364” se usa para referirse a un polipéptido PRO364 de secuencia nativa que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido PRO364 (SEC. N° ID.: 3) derivado de la naturaleza. Tal polipéptido PRO364 de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término abarca específicamente las formas truncadas o secretadas de un PRO364 que ocurren de forma natural (por ejemplo, las formas solubles que contienen, por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variantes que ocurren de forma natural (por ejemplo, formas ajustadas de forma alternativa), y las variantes alélicas del polipéptido PRO364 que ocurren de forma natural. Los términos “polipéptido PRO364” y “PRO364”, cuando se usan en la presente invención, se refieren a los mismos polipéptido mencionados en la literatura como “GITR”. En una realización de la invención, el polipéptido PRO364 de secuencia nativa es un polipéptido PRO364 de secuencia nativa maduro o de longitud completa, que comprende los aminoácidos 1 to a 241 de la Figura 1 (SEC. N° ID.: 3). Las realizaciones adicionales se dirigen al polipéptido PRO364 que comprende los aminoácidos 26-241 de la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3). En aún otra realización de la invención, el polipéptido PRO364 de secuencia nativa es una secuencia de dominio extracelular de la proteína PRO364 de longitud completa, en donde el dominio transmembrana putativo de la proteína PRO364 de longitud completa incluye los aminoácidos 162-180 de la secuencia mostrada en la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3). Alternativamente, el polipéptido PRO364 se obtiene o puede obtenerse expresando el polipéptido codificado por el inserto de ADNc del vector DNA47365-1206, depositado como ATCC 209436. Por tanto, las realizaciones adicionales de la presente invención se dirigen a polipéptidos que comprenden los aminoácidos 1-161 ó 26-161 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3).

El término “dominio extracelular”, cuando se usa en referencia a un polipéptido PRO364, se refiere a una forma del polipéptido PRO364 que carece esencialmente de sus dominios transmembrana y citoplasmático. Ordinariamente, un ECD tendrá menos del 1% de tales dominios transmembrana y/o citoplásmicos, y preferiblemente tendrá menos del 0,5% de tales dominios. Se incluyen las variantes por supresión o los fragmentos de longitud completa o del ECD, en el cual se han suprimido uno o más aminoácidos de los extremos N- o C-terminal. Preferiblemente, tales variantes de supresión o fragmentos poseen una actividad deseadas, tal como se describe en la presente invención. Se sobreentenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para el polipéptido PRO364 de la presente invención se identifica siguiendo los criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probable es que en no más de 5 aminoácidos en cada extremo del dominio tal como se identificó inicialmente. En consecuencia, el ECD del polipéptido PRO364 puede incluir opcionalmente los aminoácidos Y a X de la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3), en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167 de la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3).

El término “variante”, cuando se usa en referencia a un polipéptido PRO364, se define más abajo como que tiene al menos una identidad de secuencia de aproximadamente el 80% con el polipéptido PRO364 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3), para un polipéptido PRO364 de secuencia nativa

de longitud completa o una secuencia de dominio extracelular del mismo. Tales variantes del polipéptido PRO364 incluyen, por ejemplo, los polipéptido PRO364 en donde uno o más residuos aminoácidos se han añadido a, o suprimido de los extremos N- o C-terminal de la secuencia de la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3). De forma ordinaria, una variante del polipéptido PRO364 tendrá al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3).

Tal como se usa en la presente, un “polipéptido PRO175” se usa para referirse a un polipéptido PRO175 de secuencia nativa que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido PRO175 (SEC. N° ID.: 14) derivado de la naturaleza. Tal polipéptido PRO175 de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término abarca específicamente las formas truncadas o secretadas de un PRO175 que ocurren de forma natural (por ejemplo, las formas solubles que contienen, por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas de variantes que ocurren de forma natural (por ejemplo, formas ajustadas de forma alternativa), y las variantes alélicas del polipéptido PRO175 que ocurren de forma natural. Los términos “polipéptido PRO175” y “PRO175”, cuando se usan en la presente invención, se refieren a los mismos polipéptido mencionados en la literatura como “GLITTER”. En una realización de la invención, el polipéptido de secuencia nativa codificado por el PRO175 es un polipéptido de secuencia nativa maduro o de longitud completa, que comprende los aminoácidos 1 to a 177 de la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14). En aún otra realización de la invención, el polipéptido PRO175 comprende los aminoácidos 52 a 177 de la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14). Opcionalmente, el polipéptido PRO175 se obtiene o puede obtenerse expresando el polipéptido codificado por el inserto de ADNc del vector depositado como ATCC 209466. Por tanto, las realizaciones adicionales de la presente invención se dirigen a polipéptidos que comprenden los aminoácidos 1 a 177 ó 52 a 177 de la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14).

El término “dominio extracelular”, cuando se usa en referencia a un polipéptido PRO175, se refiere a una forma del polipéptido PRO175 que carece esencialmente de sus dominios transmembrana y citoplasmático. Ordinariamente, un ECD tendrá menos del 1% de tales dominios transmembrana y/o citoplásmicos, y preferiblemente tendrá menos del 0,5% de tales dominios. Se incluyen las variantes por supresión o los fragmentos de longitud completa o del ECD, en el cual se han suprimido uno o más aminoácidos de los extremos N- o C-terminal. Preferiblemente, tales variantes de supresión o fragmentos poseen una actividad deseadas, tal como se describe en la presente invención. Se sobreentenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para el polipéptido PRO175 de la presente invención se identifica siguiendo los criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probable es que en no más de 5 aminoácidos en cada extremo del dominio tal como se identificó inicialmente. En consecuencia, el ECD del polipéptido PRO175 comprenderá los residuos aminoácidos X a 177 de la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14), en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57 de la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14).

El término “variante”, cuando se usa en referencia a un polipéptido PRO175, se define más abajo como que tiene al menos una identidad de secuencia de aproximadamente el 80% con el polipéptido PRO175 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14), para un polipéptido PRO175 de secuencia nativa de longitud completa o una secuencia de dominio extracelular del mismo. Una variante del polipéptido PRO175 incluirá, por ejemplo, un polipéptido PRO175 en donde uno o más residuos aminoácidos se han añadido a, o suprimido de los extremos N- o C-terminal de la secuencia de la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14). De forma ordinaria, una variante del polipéptido PRO175 tendrá al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencia, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencia, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente el 98% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14).

“Porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos”, en relación a las secuencias identificadas en la presente, se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia del polipéptido PRO364 o en la secuencia del polipéptido PRO175, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máxima porcentaje de identidad de la secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. Los alineamientos para los propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de varias formas que se hallan dentro de los conocimientos de la técnica. Alguien capacitados en la técnica pueden terminar los parámetros apropiados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmos necesarios para conseguir el alineamiento máximo a lo largo de las secuencias de longitud completa que se están comparando. Para los propósitos de la presente invención, los valores de porcentaje de identidad de aminoácidos pueden obtenerse usando el programa de ordenador para comparación de secuencias ALIGN-2, el cual fue creado por Genentech, Inc., y cuyo código fuente se ha registrado con la documentación para el usuario en la U.S. Copyright Office, Washington, DC, 20559, registrado con el n° de U.S. Copyright Registration TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, CA. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían. Los procedimientos para realizar el alineamiento de secuencias y determinar la identidad de secuencia son conocidos por el especialista capacitado, pueden realizarse sin excesiva experimentación, y los cálculos de los valores de % de identidad pueden obtenerse con certeza.

“Aislado,” cuando se usa para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los

componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos de el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria, o (2) hasta su

5 homogeneidad según SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del polipéptido ligando PRO364 o PRO175 no estará presente. Sin embargo, ordinariamente, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

10 Una molécula de ácido nucleico “aislada” del PRO364 o PRO175 es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la cual está ordinariamente asociada en la fuente natural del ácido nucleico del PRO364 o PRO175. Una molécula aislada de ácido nucleico del PRO364 o PRO175 es distinta a la forma o entorno en el cual se halla en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas del PRO364 o PRO175 se distinguen de las moléculas de ácido nucleico del PRO364 o PRO175 tal como

15 éstas existen en las células naturales. Sin embargo, la molécula de ácido nucleico aislada del PRO364 o PRO175 incluye las moléculas de ácido nucleico del PRO364 o PRO175 contenidas en las células que ordinariamente expresan el PRO364 o PRO175, en aquellos casos en los que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

20 El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión en un determinado organismo huésped de una secuencia codificante operativamente ligada. Las secuencias de control que son apropiadas para los procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión de ribosomas. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

25 El ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente al ADN para un polipéptido PRO364 o PRO175 si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión de ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificante si está ubicado de

30 tal forma que facilita la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se están uniendo son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en pauta de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen porque ser contiguos. La unión se consigue mediante la ligación en los sitios de restricción apropiados. Si tales sitios no existen, se usan adaptadores o engarces de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

35 La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación es determinada fácilmente por alguien con la formación ordinaria en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para un emparejamiento apropiado, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende

40 generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para emparejarse de nuevo, cuando las hebras complementarias están presentes en un entorno, por debajo de su temperatura de fusión. Como resultado, se concluye que la temperaturas relativas más elevadas tenderán a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas inferiores lo hacen menos. Como resultado, se concluye que la temperaturas relativas más elevadas tenderán a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas inferiores lo hacen menos. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, consultar Ausubel *et al.*, *Current*

45 *Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las “condiciones de rigurosidad” o “condiciones de elevada rigurosidad”, tal como se definen en la presente invención, pueden identificarse como aquéllas que: (1) emplean una baja fuerza iónica y una temperatura elevada

50 para el lavado; cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/0,1% de sulfato dodecilo de sodio a 50°C; (2) emplean un agente desnaturalizante, tal como la formamida, durante la hibridación, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con un 0,1% de albúmina de suero bovina/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean 50% de formamida, 5× SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1%, 5× solución de Denhardt,

55 ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), 0,1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2× SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y 50% de formamida a 55°C, seguido por un lavado de elevada rigurosidad consistente en 0,1× SSC que contiene EDTA a 55°C.

Las “condiciones de rigurosidad moderadas” pueden identificarse tal como las describieron Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas más arriba. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37°C en una solución que comprende: 20% de formamida, 5× SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5× solución de Denhardt, 10% de dextrano sulfato, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado

60 y desnaturalizado, seguido por un lavado con los filtros en 1× SSC a aproximadamente 37-50°C. El especialista capacitado reconocerá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar los factores tales como la longitud de la sonda y similares.

El modificador “etiquetado con epítipo”, cuando se usa en la presente invención, se refiere a un polipéptido químico que comprende un polipéptido PRO364 o PRO175 fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiquetado tiene bastantes residuos como para proporcionar un epítipo contra el que puede prepararse un anticuerpo, aunque lo bastante corto como para que no interfiera con la actividad del polipéptido al cual está fusionado. El polipéptido etiquetado preferiblemente es también bastante único, de forma que el anticuerpo no reaccione de forma cruzada sustancialmente con otros epítipos. Los polipéptidos etiquetados apropiados tienen generalmente al menos seis residuos aminoácidos, y usualmente entre 8 y 50 residuos aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos aminoácidos).

“Activo” o “actividad” en el contexto de las variantes del PRO364 o PRO175 se refiere a la forma o formas de las proteínas PRO364 o PRO175 que retienen las actividades biológica y/o inmunológica de un polipéptido PRO364 o PRO175 nativo o que ocurre de forma natural.

“Actividad biológica”, en el contexto de una molécula que antagoniza el polipéptido PRO364 o PRO175 que puede identificarse mediante los ensayos de búsqueda descrito en la presente invención (por ejemplo, una molécula orgánica o inorgánica pequeña, un péptido, etc.) se usa para referirse a la capacidad de tales moléculas para unirse o complejarse con el polipéptido PRO364 o PRO175 identificado en la presente invención, o para interferir de otro modo con la interacción del polipéptido PRO364 o PRO175 con otras proteínas celulares. La actividad biológica particularmente preferida incluye la hipertrofia cardíaca, la actividad que actúa sobre trastornos sistémicos que afectan a los vasos sanguíneos, tales como la diabetes mellitus, así como las enfermedades de las arterias, capilares, venas, y/o vasos linfáticos, y el cáncer.

El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que, parcial o completamente, bloquea, inhibe o neutraliza una o más de las actividades biológicas de un polipéptido PRO364 o PRO175 descrito en la presente invención, por ejemplo, si es aplicable, su actividad mitogénica o angiogénica. Los antagonistas del polipéptido PRO364 o PRO175 pueden actuar interfiriendo con la unión del polipéptido PRO364 o PRO175 a un receptor celular, incapacitando o matando las células que han sido activadas por el polipéptido PRO364 o PRO175, o interfiriendo con la activación de la célula endotelial vascular después de la unión del polipéptido PRO364 o PRO175 a un receptor celular. Todos esos puntos de intervención por parte de un antagonista de un polipéptido PRO364 o PRO175 deben considerarse equivalentes para los propósitos de esta invención. Los antagonistas inhiben la actividad mitogénica, angiogénica, o otra actividad biológica, de los polipéptidos PRO364 o PRO175, y son, por tanto, útiles para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por una neovascularización excesiva no deseable, incluyendo, a modo de ejemplo, los tumores, y especialmente los tumores malignos sólidos, la artritis reumatoide, la psoriasis, la aterosclerosis, las retinopatías diabéticas y otras, la fibroplasia retrolental, la degeneración macular relacionada con la edad, el glaucoma neovascular, los hemangiomas, las hiperplasias tiroideas (incluyendo la enfermedad de Graves (enfermedad de von Basedow)), los trasplantes de córnea y otros tejidos, y la inflamación crónica. Los antagonistas son útiles también para el tratamiento de enfermedades o trastornos caracterizados por una permeabilidad vascular excesiva no deseable, tales como el edema asociado con los tumores cerebrales, los ascitis asociados con los tumores malignos, el síndrome de Meig, la inflamación del pulmón, el síndrome nefrótico, la efusión pericárdica (tal como la asociada con la pericarditis), y la efusión pleural. De forma similar, el término “agonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido PRO364 o PRO175 nativo descrito en la presente invención. Las moléculas agonistas o antagonistas apropiadas incluyen específicamente los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, agonistas o antagonistas, o las variantes de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos PRO364 o PRO175 nativos.

Los “anticuerpos (Ab)” y las “inmunoglobulinas (Ig)” son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos exhiben una especificidad de unión por un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto los anticuerpos, como otras moléculas parecidas a los anticuerpos que carecen de especificidad por el antígeno. Los polipéptidos de este último tipo son producidos, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles incrementados por los mielomas. El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente, sin limitación, los anticuerpos monoclonales intactos, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y los fragmentos de anticuerpos, con tal que exhiban la actividad biológica deseada.

Los “anticuerpos nativos” y las “inmunoglobulinas nativas” son usualmente glicoproteínas tetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene también puentes disulfuro intracatenarios espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un cierto número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variables en un extremo (V_L), y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que determinados residuos aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia entre anticuerpos, y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo concreto a y a su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de los dominios variables de los an-

ticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables, tanto en los dominios variables de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas, comprenden cada uno de ellos cuatro regiones FR, que mayoritariamente adoptan una configuración de hoja- β , conectadas por tres CDR, los cuales forman bucles de conexión, y en algunos casos forman parte de la estructura de hoja- β . Los CDR en cada cadena se mantienen juntos en estrecha proximidad por las regiones FR y, con los CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión de antígeno de los anticuerpos. Consultar Kabat *et al.*, *NIH Publ.*, N° 91-3242, volumen 1, páginas 647-669 (1991). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región unidora de antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen el Fab, Fab', F(ab')₂, y los fragmentos Fv; los diacuerpos; los anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, *Protein Eng.*, 8(10):1057-1062 (1995)); las moléculas de anticuerpo de cadena única; y los anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos unidores de antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un único sitio de unión de antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con antígeno, y que es todavía capaz de entrecruzar el antígeno.

“Fv” es el mínimo fragmento de anticuerpo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión de antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. De forma conjunta, los seis CDR confieren al anticuerpo la especificidad de unión de antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprenda sólo tres CDR específicos para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unir antígeno, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión entero.

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

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

Dependiendo de la secuencias de aminoácidos del dominio constantes de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Los dominios constantes de las cadenas pesadas que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan, respectivamente α , δ , ϵ , λ , y μ . Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural, las cuales pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, y están dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales, las cuales típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos ya que se sintetizan en cultivos de hibridomas, sin contaminación por parte de otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo en el sentido que se obtiene a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe limitarse en el sentido de requerir la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento determinado. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser usados de acuerdo con la presente invención podrían prepararse mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), o podrían prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante (ver, por ejemplo, patente estadounidense n° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también podrían aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en la presente incluyen específicamente los anticuerpos (inmunoglobulinas) “químicos”, en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a, u homóloga de, las correspondientes

secuencias en anticuerpos derivados de una especie determinada, o pertenecientes a una determinada clase o subclase de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena o cadena son idénticas con, u homólogas de, las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de otra especie, o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, con tal que exhiban la actividad biológica deseada. Patente estadounidense nº 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984).

Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como los Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias unidoras de antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales se remplazan residuos procedentes de una CDR del receptor con residuos procedentes de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata o conejo, que tienen especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la FR del Fv se remplazan con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados podrían comprender residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR ni en las secuencias estructurales importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar aún más y maximizar las prestaciones del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en los cuales la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad o sustancialmente la totalidad de las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado preferiblemente comprenderá también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, consultar Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo Primatized™, en donde la región unidora de antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido inmunizando monos macacos con el antígeno de interés.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena simple” o “sFv” comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido de Fv comprende además un engarce polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los sFv consultar Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, volumen 113, Rosenberg y Moore, editores. (Springer-Verlag: Nueva York, 1994), pp. 269-315.

El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Mediante el uso de un engarce que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, se fuerza a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión de antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente e, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/1 1161; y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993).

Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y podrían incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En una realización preferida, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry, y más preferiblemente más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa rotatoria, o (3) hasta su homogeneidad según SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras, usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, puesto que al menos uno de los componentes del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, ordinariamente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

La palabra “marca” cuando se usa en la presente invención se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente al anticuerpo con objeto de generar un compuesto “marcado”. La marca podría ser detectable por sí misma (por ejemplo, marcas radiactivas o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, podría catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato, el cual es detectable.

Por “fase sólida” se quiere indicar una matriz no acuosa a la cual puede adherirse un anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas abarcados en la presente, incluyen aquéllos formados parcial o totalmente por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico, y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo en una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la patente estadounidense nº 4.275.149.

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos, la cual es útil para suministrar un fármaco (tal como el polipéptido PRO364 o PRO175, o los anticuerpos contra el mismo descritos en la presente invención) a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de membranas biológicas.

Tal como se usa en la presente, el término “inmuno adhesina” designa las moléculas parecidas a un anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, la cual es distinta del sitio de reconocimiento y unión del antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y una secuencia de un dominio constante de inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contigua, que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o de un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, la IgA (incluyendo la IgA-1 y la IgA-2), IgE, IgD, o IgM.

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Preparación de los polipéptidos PRO364 o PRO175

La presente invención utiliza secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos conocidos en la presente solicitud como PRO364 (también conocido como PRO687 o UNQ 319) y como PRO175. En particular, se han aislado y usado los ADNc que codifican los polipéptidos PRO364 y PRO175, tal como se describe con más detalle en los Ejemplos siguientes. Se destaca que, a las proteínas producidas en rondas de expresión distintas se les puede asignar diferentes números PRO, pero el número UNQ es único para cualquier ADN determinado y la proteína codificada, y no cambiará.

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción del polipéptido PRO364 y PRO175 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175. Por supuesto, se contempla la posibilidad que puedan emplearse procedimientos alternativos, bien conocidos en el estado de la técnica, para preparar PRO364 o PRO175. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido PRO364 o PRO175, o porciones de la misma, pueden producirse mediante la síntesis directa del péptido usando técnicas de fase sólida. Consultar, por ejemplo, Stewart *et al.*, *Solid-Phase Peptide Synthesis* (W.H. Freeman Co.; San Francisco, CA, 1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963). La síntesis proteica *in vitro* podría realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada podría conseguirse usando, por ejemplo, un Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Varias porciones de PRO364 o PRO175 pueden sintetizarse químicamente por separado, y combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido PRO364 o PRO175 de longitud completa.

Aislamiento del ADN que codifica PRO364 o PRO175

El ADN que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee el ARNm que codifica PRO364 o PRO175, y que lo expresa en un nivel detectable. En consecuencia, los ADN que codifican el PRO364 humano o el PRO175 humano pueden obtenerse convenientemente a partir de bibliotecas de ADNc preparadas a partir de tejidos humanos, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 puede obtenerse también a partir de una biblioteca genómica o mediante la síntesis del oligonucleótido.

Las bibliotecas pueden examinarse con sondas (tales como anticuerpos contra el polipéptido PRO364 o PRO175, u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por éste. El examen de la biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada podría llevarse a cabo usando procedimientos estándares, tales como los descritos en Sambrook *et al.*, ver más arriba. Un medio alternativo para aislar el gen que codifica PRO364 o PRO175 es usar la metodología de la PCR. Sambrook *et al.*, ver más arriba; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

Los ejemplos siguientes describen las técnicas para examinar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían tener la longitud suficiente, y ser lo suficientemente no ambiguas como para que los falsos positivos estén minimizados. El oligonucleótido está preferiblemente marcado, de tal forma que pueda detectarse a partir de su hibridación con el ADN de la biblioteca que se está examinando. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en el campo, e incluyen el uso de marcas radiactivas como el ATP marcado con ³²P, la biotilación o el marcado con enzimas. Las condiciones de hibridación, incluyendo las de rigurosidad moderada y elevada rigurosidad, se proporcionan en Sambrook *et al.*, ver más arriba.

Las secuencias identificadas en tales procedimientos de examen de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas, tales como el GenBank, u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de la secuencia (a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa, puede determinarse a través del alineamiento de la secuencia usando programas de ordenador tales como el ALIGN, el DNASTAR, y el INHERIT.

El ácido nucleico que tiene la secuencia que codifica la proteína podría obtenerse examinando bibliotecas de ADNc o genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente por primera vez, y, si es necesario, usando procedimientos convencionales de extensión del cebador según se describen en Sambrook *et al.*, ver más arriba, para detectar precursores y procesar los intermediarios del ARNm que podrían no haberse transcrito a la inversa en el ADNc.

Además del polipéptido PRO364 o PRO175 de secuencia nativa de longitud completa descrito en la presente invención, se contempla que puedan prepararse variantes del PRO364 o PRO175. Las variantes del PRO364 o PRO175 pueden prepararse mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ADN que codifica el PRO364 o PRO175, o mediante la síntesis del polipéptido PRO364 o PRO175 deseado. Los especialistas en la técnica apreciarán que los cambios de aminoácidos podrían alterar el procesamiento del polipéptido PRO364 o PRO175 posterior a la traducción, tal como cambiando el número o posición de los sitios de glicosilación o alterando las características del anclaje a la membrana.

Las variaciones en la secuencia nativa de longitud completa del PRO364 o PRO175, o en varios dominios del polipéptido PRO364 o PRO175 descritas en la presente invención, pueden hacerse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y guías para mutaciones conservadoras y no conservadoras establecida, por ejemplo, en la patente estadounidense n° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una supresión o inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido PRO364 o PRO175, lo que resulta en un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO364 o PRO175 cuando se compara con la secuencia nativa de PRO364 o PRO175. Opcionalmente, la variación se realiza mediante la sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido PRO364 o PRO175. La guía para determinar qué residuo aminoácido podría insertarse, sustituirse o suprimirse sin afectar de forma adversa la actividad deseada, puede hallarse comparando la secuencia del polipéptido PRO364 o PRO175 con la de moléculas de proteína que se sabe son homólogas, y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en regiones de elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como en la sustitución de una leucina con una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las inserciones o supresiones podrían estar opcionalmente en el rango de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia, y ensayando las variantes resultantes en función de su actividad en cualquiera de los ensayos *in vitro* descritos en los Ejemplos siguientes.

Las variaciones pueden hacerse usando procedimientos conocidos en el campos, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida contra un sitio), el barrido con alanina, y la mutagénesis con PCR. Las mutagénesis dirigida por el sitio [Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], la mutagénesis por inserción de un casete [Wells *et al.*, *Gene*, 34:315 (1985)], la mutagénesis de selección por restricción [Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A*, 317:415 (1986)], u otras técnicas conocidas pueden llevarse a cabo sobre el ADN clonado para producir el ADN variante que codifica PRO364.

El análisis de aminoácidos por barrido puede emplearse también para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos se encuentran los aminoácidos neutrales, relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen la alanina, la glicina, la serina y la cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo, por que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. La alanina también se prefiere típicamente porque es el aminoácido más común. Además, frecuentemente se halla tanto en posiciones enterradas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución con alanina no rinde cantidades adecuadas de la variante, entonces puede usarse un aminoácido isostérico.

Modificaciones de PRO364

Las modificaciones covalentes de los polipéptidos PRO364 o PRO175 se incluyen dentro del ámbito de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar los residuos aminoácidos diana de un polipéptido PRO364 o PRO175 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas, o con los residuos N- o C-terminales de un polipéptido PRO364 o PRO175. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para entrecruzar el PRO364 o PRO175 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua, para su uso en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO364 o -PRO175, y viceversa. Los agentes de entrecruzamiento usados comúnmente incluyen el 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, el glutaraldehído, los ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, los ésteres con el ácido 4-azidosalicílico, los imidoésteres homobifuncionales, incluyendo los ésteres de disuccinimidilo tales como el 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), las maleimidias bifuncionales tales como el bis-N-maleimido-1,8-octano, y agentes tales como el metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propionimidato.

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

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO364 o PRO175 de la invención incluida dentro del ámbito de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del polipéptido. "Alterar el patrón de glicosilación nativo" se pretende que signifique, para los propósitos en la presente invención, suprimir uno o más grupos carbohidratos hallados en el polipéptido PRO364 o PRO175 de secuencia nativa, y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa del polipéptido PRO364 o PRO175.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO364 o PRO175 puede conseguirse alterando la secuencia de aminoácidos del mismo. La alteración podría hacerse, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos serina o treonina en el polipéptido PRO364 o PRO175 de secuencia nativa (para los sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácido de PRO364 o PRO175 puede alterarse opcionalmente a través de cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 en bases preseleccionadas de tal forma que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de incrementar el número de grupos carbohidratos sobre el polipéptido PRO364 o PRO175 de la invención es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Tales procedimientos se describen en el ámbito de la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

La supresión de grupos carbohidratos presentes sobre el polipéptido PRO364 o PRO175 de la invención puede conseguirse química o enzimáticamente, o mediante sustitución por mutación de codones que codifican residuos aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación química son conocidas en el campo, y son descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La ruptura enzimática de los grupos carbohidratos sobre los polipéptidos puede conseguirse mediante el uso de una variedad de endo- y exoglicosidasas, tal como describen Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de PRO364 o PRO175 comprende unir el polipéptido PRO364 o PRO175 de la invención a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG), el polipropilenglicol, o los polioxisilquilenos, de la manera establecida en las patentes estadounidenses n° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

Los polipéptidos PRO364 o PRO175 de la presente invención podrían modificarse también de una determinada manera para formar moléculas quiméricas que comprenden el polipéptido PRO364 o PRO175 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. En una realización, tal molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido PRO364 o PRO175 con un polipéptido etiqueta, el cual proporciona un epítipo al cual puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta de epítipo se coloca generalmente en el extremo amino- o carboxi-terminal del polipéptido PRO364 o PRO175. La presencia de tales formas del polipéptido PRO364 o PRO175 etiquetadas con epítipo puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido etiquetado. También, la provisión de la etiqueta del epítipo permite que el polipéptido PRO364 o PRO175 sea fácilmente purificado mediante purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta del epítipo. En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido PRO364 o PRO175 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, tal fusión puede ser con la región Fc de una molécula de IgG. Opcionalmente, la molécula quimérica comprenderá una secuencia ECD de PRO364 o PRO175 fusionada a una región Fc de una molécula de IgG.

Varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en el campo. Los ejemplos incluyen las etiquetas polihistidina (poly-his) o la poli-histidina-glicina (poly-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc tag y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra la misma [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de la glicoproteína D (gD) del virus Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, *Protein Engineering*, 3 (6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido del epítipo de KT3 [Martin *et al.*, *Science*, 255:192-194 (1992)]; un péptido del epítipo de la α -tubulina [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; y la etiqueta de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

El polipéptido PRO364 o PRO175 de la presente invención puede modificarse también de una determinada manera para formar una molécula quimérica que comprende un polipéptido PRO364 o PRO175 fusionado a una cremallera de leucina. Se han descrito varios polipéptidos de cremallera de leucina en la técnica. Consultar, por ejemplo, Landschulz *et al.*, *Science*, 240:1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe *et al.*, *FEBS Letters*, 344:1991 (1994); Maniatis *et al.*, *Nature*, 341:24 (1989). Se cree que el uso de una cremallera de leucina fusionada a un polipéptido PRO364 o PRO175 puede ser deseable para ayudar en la dimerización o trimerización del polipéptido PRO364 o PRO175 soluble en solución. Los especialistas en la técnica apreciarán que la cremallera de leucina puede fusionarse en cualquiera de los extremos N- o C-terminal de la molécula de PRO364 o PRO175.

Selección y transformación de células huéspedes

Las células huéspedes se transfectan o transforman con los vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción de PRO364 o PRO175, y se cultivan en medio nutritivo convencional, modificado según sea apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones del cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, puede seleccionarse el especialista capacitado sin experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos de células pueden hallarse en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, editor M. Butler (IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1991), y Sambrook *et al.*, ver más arriba.

Los procedimientos de transfección son conocidos por el especialista ordinariamente capacitado, por ejemplo, el CaPO_4 y la electroporación. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándares apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro cálcico, tal como se describe en Sambrook *et al.*, ver más arriba, o la electroporación, generalmente se usan para los procariotas u otras células que contienen barreras sustanciales de pared celular. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describen Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983), y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin tales paredes celulares, puede emplearse el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-437 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas huéspedes de células de mamífero se han descrito en la patente estadounidense nº 4.399.216. Las transformaciones en levaduras típicamente se llevan a cabo de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Sin embargo, también podrían usarse otros procedimientos para introducir el ADN en las células, tales como mediante la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o los policones, por ejemplo, el polibreno o la poliornitina, etcétera. Para información sobre varias técnicas para transformar células de mamífero, consultar Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990), y Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Las células huéspedes apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente incluyen las células de procariota, de levadura o de eucariota superior. Los procariotas apropiados incluyen, pero no se limitan a las eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, enterobacterias tales como *E. coli*. Hay varias cepas de *E. coli* disponibles públicamente, tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); la cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325); y K5 772 (ATCC 53.635).

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son huéspedes de clonación o expresión apropiados para los vectores que codifican PRO364 o PRO175. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior comúnmente usado.

Las células huéspedes apropiadas para la expresión de ácidos nucleicos que codifican PRO364 o PRO175 glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células tales como la S2 de *Drosophila* y la Sf9 de *Spodoptera*, así como las células de plantas. Los ejemplos de líneas celulares huéspedes de mamífero útiles incluyen las células ováricas de hámster chino (CHO) y las células COS. Los ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 renal de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea renal embrionaria humana (células 293 ó 293 subclonadas para su crecimiento en cultivos en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); las células ováricas de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); las células sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); las células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); y de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se considera que se halla dentro del conocimiento de la técnica.

Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica el PRO364 o PRO175 puede insertarse en un vector replicable para su clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Hay varios vectores disponibles públicamente. El vector podría estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica, fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada podría insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en el sitio o sitios de endonucleasas de restricción apropiados usando técnicas conocidas en el campo. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a, una o más de una secuencia señal si debe secretarse la secuencia, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores apropiados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándares que son conocidas por el especialista capacitado.

El PRO364 o PRO175 pueden producirse de forma recombinante, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, el cual puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que tenga un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de PRO364 o PRO175 que está insertado en el vector. La secuencia de señal podría ser una secuencia de señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo formado por los líderes de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp, o la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de la levadura, el líder del factor alfa (incluyendo los líderes de los factores- α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, éste último descrito en la patente estadounidense nº 5.010.182), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (EP 362.179, publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, podrían usarse secuencias señal de mamífero para dirigir la secreción de la proteína, tales como las secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una especie relacionada, así como los líderes secretores víricos.

Ambos vectores, el de expresión y el de clonación, contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células huéspedes seleccionadas. Tales secuencias son bien conocidas para una variedad

de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es apropiado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es apropiado para levaduras, y varios orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

Los vectores de expresión y clonación típicamente contendrán un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) aportan nutrientes críticos no disponibles en el medio, por ejemplo, el gen que codifica la racemasa de D-alanina para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables apropiados para las células de mamífero son aquéllos que permiten la identificación de las células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el PRO364 o PRO175, tales como la DHFR o la quinasa de timidina. Una célula huésped apropiada, cuando se emplea la DHFR del tipo salvaje, es la línea CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada tal como describieron Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Un gen de selección apropiado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido YRp7 de levadura. Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper *et al.*, *Gene*, 10:157 (1980). El gen *trp1* proporciona un marcador seleccionable para una cepa mutante de levadura que carezca de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, la ATCC n° 44076 o la PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977).

Los vectores de clonación y expresión usualmente contienen un promotor, unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el PRO364 o PRO175, para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de células huéspedes potenciales son bien conocidos. Los promotores apropiados para su uso con huéspedes procariotas incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa y de la lactosa (Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)); de la fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptófano (*trp*) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36,776); y los promotores híbridos tal como el promotor *tac*, de Boer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983). Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el PRO364 o PRO175.

Los ejemplos de secuencias promotoras apropiadas para uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa, (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)) u otros enzimas glicolíticos (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)), tales como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la triosafosfato isomerasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de cultivo, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, del isocitocromo C, de la fosfatasa ácida, de los enzimas de degradación asociados con el metabolismo del nitrógeno, de la metalotioneína, de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y de los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y galactosa. Los vectores y promotores apropiados para uso en la expresión en levadura se describen adicionalmente en EP 73.657.

La transcripción del ácido nucleico de PRO364 o PRO175, a partir de vectores en células huésped de mamífero, está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como el virus del polioma, el virus de la viruela aviar (UK 2.211.504, publicada el 5 de julio de), el adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma de las aves, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 del mono (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, a condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

La transcripción de un ADN, que codifica el PRO364 o PRO175, por parte de eucariotas superiores, puede incrementarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos del ADN que actúan en cis, de forma habitual aproximadamente de 10 a 300 p.b., que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Se conocen muchas secuencias potenciadores procedentes de genes de mamíferos (de globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Sin embargo, típicamente se usarán un potenciador procedente de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (p.b. 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores de los adenovirus. El potenciador podría empalmarse dentro del vector en una posición 5' o 3' respecto la secuencia codificante de PRO364 o PRO175, pero preferiblemente se ubica en un sitio 5' respecto el promotor.

Los vectores de expresión usados en las células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanas, o células nucleadas procedentes de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están disponibles comúnmente a partir de las regiones 5', y ocasionalmente 3', no traducidas de los ADN o ADNc víricos eucariotas. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos que se transcriben como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica el PRO364 o PRO175.

Aún otros procedimientos, vectores y células huéspedes, apropiados para su adaptación a la síntesis de PRO364 o PRO175 en cultivos de células vertebradas recombinantes, se describen en Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060; y EP 117.058.

5 Detectando la amplificación/expresión del gen

La amplificación y/o expresión del gen puede medirse directamente en una muestra, por ejemplo, mediante una transferencia Southern convencional, una transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)), la transferencia en punto (análisis del ADN), o la hibridación *in situ*, usando una sonda marcada convenientemente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer duplexes específicos, incluyendo los duplexes de ADN, los duplexes de ARN, y los duplexes híbridos ADN-ARN o los duplexes ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos pueden estar marcados, y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está unido a la superficie, de forma que, a partir de la formación del dúplex sobre la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

La expresión del gen, alternativamente, puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de las células o de las secciones de tejido, y el ensayo del cultivo de células o de los fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto del gen. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de muestras fluidas pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. De forma conveniente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido PRO364 o PRO175 de secuencia nativa, o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención, o contra una secuencia exógena fusionada al ADN que codifica el PRO364 o PRO175 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

25 Purificación del polipéptido

Las formas de PRO364 o PRO175 pueden recuperarse del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si están unidos a la membrana, pueden liberarse de la membrana usando una solución detergente apropiada (por ejemplo, Triton-X™ 100) o mediante corte enzimático. Las células empleadas en la expresión del ácido nucleico que codifica el PRO364 o PRO175 pueden romperse mediante varios medios físicos o químicos, tales como un ciclo de congelación-descongelación, la sonicación, la rotura mecánica, o los agentes de lisado de células.

Podría ser deseable purificar el polipéptido PRO364 o PRO175 de otras proteínas o polipéptidos celulares recombinantes. Los procedimientos siguientes son ilustrativos de los procedimientos de purificación apropiados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; la precipitación con etanol; la HPLC de fase inversa; la cromatografía en columnas de sílice o de una resina de intercambio catiónico tal como la DEAE; el cromatoforo; la SDS-PAGE; la precipitación con sulfato amónico; la filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; las columnas de proteína A-Sepharose para retirar contaminantes tales como la IgG; y columnas quelantes de metales para unir las formas etiquetadas con epítipo del PRO364 o PRO175. Podrían emplearse varios procedimientos de purificación de proteínas, y tales procedimientos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). El paso o pasos de purificación seleccionados dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado en el PRO364 o PRO175 concreto producido.

45 Usos de los polipéptidos PRO364 o PRO175

i. Ensayos de actividad cardiovascular, endotelial, y angiogénica

50 Pueden usarse varios ensayos para ensayar la actividad cardiovascular, endotelial, y angiogénica del polipéptido de la presente invención. Tales ensayos incluyen los proporcionados en los Ejemplos siguientes.

Los ensayos para ensayar la actividad antagonista de endotelina, tal como se descubren en la patente estadounidense n° 5.773.414, incluyen un ensayo de unión al ventrículo de corazón de rata, en donde se ensaya la capacidad del polipéptido para inhibir la unión de la endotelina-1 yodada en un ensayo de receptor; un ensayo de unión al receptor endotelina para la unión a células intactas de la endotelina-1 radiomarcada, usando células del músculo liso vascular de la arteria renal de conejo; un ensayo de acumulación de inositol fosfato, en donde la actividad funcional se determina en células Rat-1 midiendo los niveles intracelulares de segundos mensajeros; un ensayo de liberación de ácido araquidónico, que mide la capacidad de los compuestos añadidos para reducir la liberación de ácido araquidónico del endotelio estimulado en músculos lisos vasculares cultivados; estudios *in vitro* (vasos sanguíneos aislados) usando endotelio procedente de conejos machos New Zealand, y estudios *in vivo* usando ratas Sprague-Dawley machos.

Los ensayos para la actividad de generación de tejido incluyen, sin limitación, los descritos en WO 95/16035 (hueso, cartílago, tendón); en WO 95/05846 (nervio, neuronal), y en WO 91/07491 (piel, endotelio).

65 Los ensayos de actividad cicatrizante de heridas incluyen, por ejemplo, los descritos en Winter, *Epidermal Wound Healing*, Maibach, HI y Rovee, DT, editores (Year Book Medical Publishers, Inc., Chicago), pp. 71-112, según fue modificado en el artículo de Eaglstein y Mertz, *J. Invest. Dermatol.*, 71:382-384 (1978).

Un ensayo para buscar una molécula de ensayo relacionada con un polipéptido PRO364 o PRO175, que se une a un polipéptido del receptor de endotelina B₁ (ETB₁) y modula la actividad de transducción de señal, implica proporcionar una célula huésped transformada con un ADN que codifica el polipéptido del receptor de endotelina B₁, exponer las células al candidato a ensayar, y medir la actividad de transducción de señal del receptor de endotelina B₁, según se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n° 5.773.223.

Hay varios ensayos de hipertrofia cardíaca. Los ensayos *in vitro* incluyen la inducción y propagación de los miocitos cardíacos de rata adulta. En este ensayo, se aíslan miocitos ventriculares a partir de una única rata (macho, Sprague-Dawley), siguiendo esencialmente una modificación del procedimiento descrito en detalle por Piper *et al.*, "Adult ventricular rat heart muscle cells" en *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*, H.M. Piper, editor (Berlín: Springer-Verlag, 1990), pp. 36-60. Este procedimiento permite el aislamiento de los miocitos ventriculares adultos, y el cultivo a largo plazo de estas células en el fenotipo con forma de vara. Se ha mostrado que la fenilefrina y la prostaglandina F_{2a} (PGF_{2a}) inducen una respuesta de propagación en estas células adultas. A continuación se ensaya la inhibición de la propagación de miocitos, inducida por la PGF_{2a} o lo análogos de la PGF_{2a} (por ejemplo, el fluprostenol) y la fenilefrina, por parte de varios inhibidores potenciales de la hipertrofia cardíaca.

Un ejemplo de un ensayo *in vivo* es un ensayo para inhibir la hipertrofia cardíaca inducida *in vivo* por el fluprostenol. Este modelo farmacológico ensaya la capacidad del polipéptido PRO364 o PRO175 para inhibir la hipertrofia cardíaca inducida en ratas (por ejemplo, machos de Wistar o Sprague-Dawley) mediante la inyección subcutánea de fluprostenol (un agonista análogo de la PGF_{2a}). Se sabe que las ratas con hipertrofia cardíaca patológica inducida por infarto de miocardio tienen niveles elevados crónicamente de PGF_{2a} extraíble en su miocardio. Lai *et al.*, *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 271: H2197-H2208 (1996). En consecuencia, los factores que puede inhibir los efectos del fluprostenol sobre el crecimiento del miocardio *in vivo* son potencialmente útiles para tratar la hipertrofia cardíaca. Los efectos del polipéptido PRO364 o PRO175 sobre la hipertrofia cardíaca se determinaron midiendo el peso del corazón, de los ventrículos, y del ventrículo izquierdo (normalizado por el peso corporal) en relación a ratas tratadas con fluprostenol que no recibían el polipéptido PRO364 o PRO175.

Otro ejemplo de ensayo *in vivo* es el ensayo de hipertrofia cardíaca por sobrecarga de presión. Para los ensayos *in vivo* es habitual inducir una hipertrofia cardíaca por sobrecarga de presión mediante la constricción de la aorta abdominal en los animales de ensayo. En un protocolo típico, las ratas (por ejemplo, machos Wistar o Sprague-Dawley) se tratan bajo anestesia, y la aorta abdominal de cada rata se estrecha justo por debajo del diafragma. Beznak M., *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33:985-94 (1955). La aorta se expone a través de una incisión quirúrgica, y se coloca una aguja roma cerca del vaso. La aorta se constriñe con un ligadura de hilo de seda alrededor de la aguja, la cual se retira inmediatamente, con lo que se reduce el lumen de la aorta al diámetro de la aguja. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en Rossi *et al.*, *Am. Heart J.*, 124:700-709 (1992) y O'Rourke and Reibel, *P.S.E.M.B.*, 200:95-100 (1992).

En aún otro ensayo *in vivo*, se mide el efecto sobre la hipertrofia cardíaca a continuación de un infarto de miocardio (MI) inducido experimentalmente. El MI agudo se induce en rata mediante la ligación de la arteria coronaria izquierda, y se confirma mediante examen electrocardiográfico. También se prepara un grupo de animales con una operación simulada como animales de control. Los primeros datos han mostrado que la hipertrofia cardíaca está presente en el grupo de animales con MI, tal como se evidencia por un incremento del 18% en el proporción de peso del corazón-peso corporal. Lai *et al.*, ver más arriba. El tratamiento de estos animales con bloqueadores candidatos de la hipertrofia cardíaca, por ejemplo, el polipéptido PRO364 o PRO175, proporciona valiosa información sobre el potencial terapéutico de los candidatos ensayados. Un ensayo adicional de este tipo para la inducción de la hipertrofia cardíaca se describe en la patente estadounidense n° 5.773.415, usando ratas Sprague-Dawley.

Para el cáncer, pueden usarse una variedad de modelos animales para comprender aún más el papel de los genes identificados en la presente invención en el desarrollo y patogénesis de los tumores, y para ensayar la eficacia de los agentes terapéuticos candidatos, incluyendo los anticuerpos y otros antagonistas de los polipéptidos PRO364 o PRO175 nativos, tales como los antagonistas de molécula pequeña. La naturaleza *in vivo* de tales modelos los hace particularmente predictivos de las respuestas en pacientes humanos. Los modelos animales de tumores y cánceres (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, etc.) incluyen tanto los animales no recombinantes como los recombinantes (transgénicos). Los modelos animales no recombinantes incluyen, por ejemplo, los roedores, por ejemplo, los modelos en muridos. Tales modelos pueden generarse introduciendo células tumorales en ratones singénicos usando técnicas estándares, por ejemplo, la inyección subcutánea, la inyección en la vena caudal, la implantación en el bazo, la implantación intraperitoneal, y la implantación bajo la cápsula renal, o la implantación *orthopin*, por ejemplo, células de cáncer de colon implantadas en tejido colónico. Consultar, por ejemplo, la publicación del PCT n° WO 97/33551, publicada el 18 de septiembre de 1997.

Probablemente, la especie animal usada más a menudo en estudios oncológicos es el ratón inmunodeficiente y, en particular, el ratón desnudo. La observación de que el ratón desnudo con hipo/aplasia tímica podía actuar exitosamente como un huésped para injertos de tumor humano ha conducido a su amplio uso para este propósito. El gen *nu* recesivo autosómico se ha introducido en una número muy elevado de distintas y genéticas cepas congénita de ratón desnudo, incluyendo, por ejemplo, las ASW, A/He, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, I/st, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII, y SJL. Además, se han criado una amplia variedad de otros animales con defectos inmunológicos heredados, distintos del ratón desnudo, y se han usado como receptores de trasplantes de tumor. Para más detalles consultar, por ejemplo, *The Nude Mouse in Oncology Research*, E. Boven y B. Winograd, editores. (CRC Press, Inc., 1991).

Las células introducidas en tales animales pueden derivarse de líneas celulares de tumor/cáncer, tales como cualquiera de las líneas celulares tumorales mencionadas más arriba, y, por ejemplo, la línea celular B104-1-1 (línea celular estable NIH-3T3, transfectada con el protooncogén neu); células NIH-3T3 transfectadas con ras; Caco-2 (ATCC HTB-37); o una línea celular de adenocarcinoma de color del grado II, moderadamente bien diferenciada, la HT-29 (ATCC HTB-38); o ha partir de tumores y cánceres. Las muestras de células de cáncer o tumorales pueden obtenerse de pacientes sometidos a cirugía, usando técnicas estándar que implican congelarlas y almacenarlas en nitrógeno líquido. Karmali *et al.*, *Br. J. Cancer*, 48:689-696 (1983).

Las células tumorales puede introducirse en animales tales como los ratones desnudos mediante una variedad de procedimientos. El espacio subcutáneo (s.c.) en los ratones es muy apropiado para la implantación de tumores. Los tumores pueden trasplantarse s.c. como bloques sólido, como biopsias de aguja mediante el uso de un trocar, o como suspensiones de células. Para una implantación de bloque sólido o con trocar, se introducen en el espacio s.c. fragmentos de tejido tumoral de tamaño apropiado. Las suspensiones de células se preparan inmediatamente a partir de tumores primarios o líneas celulares tumorales estables. Las células tumorales pueden inyectarse también como implantes subdérmicos. En esta ubicación, el inóculo se deposita entre la parte inferior del tejido conectivo dérmico y el tejido s.c.

Los modelos animales del cáncer de mama pueden generarse, por ejemplo, implantando células de neuroblastoma de rata (a partir de las cuales se aisló inicialmente el oncogén neu), o células NIH-3T3 transformada con neu, en ratones desnudos, esencialmente tal como describen Drebin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:9129-9133 (1986).

De forma similar, pueden generarse animales modelos de cáncer de colon transfiriendo células de cáncer de color a animales, por ejemplo, ratones desnudos, lo que conduce a la aparición de tumores en estos animales. Se ha descrito un modelo de trasplante ortotópico de cáncer de colon humano en ratones desnudos, por ejemplo, por Wang *et al.*, *Cancer Research*, 54:4726-4728 (1994) y Too *et al.*, *Cancer Research*, 55:681-684 (1995). Este modelo se basa en el denominado KMETAMOUSEK™ vendido por AntiCancer, Inc. (San Diego, California).

Los tumores que surgen en los animales pueden eliminarse y cultivarse *in vitro*. Las células procedentes de los cultivos *in vitro* deben transferirse entonces a los animales. Tales tumores pueden servir como dianas para el ensayo y búsqueda adicional de fármacos. Alternativamente, los tumores resultantes de la transferencia pueden aislarse, y puede analizarse el ARN de células pre-transferidas y células aisladas, después de una o más rondas de transferencia, en busca de la expresión diferencial de genes de interés. Tales técnica de transferencia pueden realizarse con cualquier línea celular de cáncer o tumor.

Por ejemplo, Meth A, CMS4, CMS5, CMS21, y WEHI-164 son fibrosarcomas de ratones hembra BALB/c (DeLeo *et al.*, *J. Exp. Med.*, 146:720 (1977)), lo cual proporciona un sistema modelo altamente controlable para estudiar las actividades anti-tumor de varios agentes. Palladino *et al.*, *J. Immunol.*, 138:4023-4032 (1987). En resumen, las células tumorales se propagan *in vitro* en cultivos de células. Antes de su inyección en los animales, las líneas celulares se lavan y resuspenden en tampón, a una densidad celular de aproximadamente 10×10^6 a 10×10^7 células/ml. A continuación se infectan los animales subcutáneamente con de 10 a 100 μ l de la suspensión de células, dejando de una a tres semanas para la aparición del tumor.

Además, el carcinoma de pulmón de Lewis (3LL), que es uno de los tumores experimentales más detalladamente estudiado, puede usarse como un modelo tumoral para investigación. La eficacia de este modelo tumoral se ha correlacionado con efectos beneficiosos en el tratamiento de pacientes humanos diagnosticados con un carcinoma de células pequeñas del pulmón (SCCL). Este tumor puede introducirse en ratones normales a partir de la inyección de fragmentos del tumor procedentes de un ratón afectado o de células mantenidas en cultivo. Zupi *et al.*, *Br. J. Cancer*, 41: suplem. 4. 30 (1980). La evidencia indica que los tumores pueden iniciarse a partir de la inyección de incluso una única célula, y que una proporción muy elevada de las células tumorales infectadas sobrevive. Para más información sobre este modelo de tumor consultar Zacharski, *Haemostasis*, 16:300-320 (1986).

Una forma de evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo en un animal model con un tumor implantado es medir el tamaño del tumor antes y después del tratamiento. Tradicionalmente, el tamaño de los tumores implantados se ha medido con un pie de rey en dos o tres dimensiones. La medida limitada a dos dimensiones no refleja con precisión el tamaño del tumor, por tanto, usualmente se convierte en el volumen correspondiente usando una fórmula matemática. No obstante, la medición del tamaño del tumor es bastante imprecisa. Los efectos terapéuticos de un candidato a fármaco pueden describirse mejor como un retraso en el crecimiento inducido oír el tratamiento, y un retraso en el crecimiento específico. Otra variable importante en la descripción del crecimiento tumoral es el tiempo de duplicación del volumen del tumor. Hay también disponibles programas de ordenador para el cálculo y descripción del crecimiento del tumor, tales como el programa descrito por Rygaard y Spang-Thomsen, *Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals*, Wu y Sheng, editores (Basel, 1989), p. 301. No obstante, se destaca que la necrosis y las respuestas inflamatorias a continuación del tratamiento pueden resultar en un incremento en el tamaño del tumor, al menos inicialmente. Por tanto, estos cambios tiene que monitorizarse cuidadosamente, mediante un combinación de métodos morfométricos y análisis por citometría de flujo.

Además, los modelos animales recombinantes (transgénicos) pueden manipularse mediante la introducción de la porción codificante de los genes de PRO364 o PRO175, identificados en la presente invención, dentro del genoma de los animales de interés, usando técnicas estándares para la producción de animales transgénicos. Los animales

que pueden servir como dianas de la manipulación transgénica incluyen, sin limitación, los ratones, gatos, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos, y los primates no humanos, por ejemplo, los babuinos, los chimpancés y los monos. Se conocen técnicas en el estado de la técnica para introducir un transgén dentro de tales animales, incluyendo la microinyección pronucleica (patente estadounidense nº 4.873.191); transferencia del gen, mediada por retrovirus, a la línea germinal (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:6148-615 (1985)); el apuntamiento de genes hacia células madre embrionarias (Thompson *et al.*, *Cell*, 56:313-321 (1989)); electroporación de embriones (Lo, *Mol. Cell. Biol.*, 3:1-803-1814 (1983)); y la transferencia mediada por esperma. Lavitrano *et al.*, *Cell*, 57:717-73 (1989). Para una revisión, consultar, por ejemplo, la patente estadounidense nº 4.736.866.

Los animales transgénicos de la presente invención incluyen aquellos que son portadores del transgén solamente en parte de sus células ("animales mosaico") El transgén pueden integrarse como un único transgén, o en concatámeros, por ejemplo, en tándems de cabeza con cabeza o de cabeza con cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula determinado es posible también siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6232-636 (1992).

La expresión del transgén en animales transgénicos puede monitorizarse mediante técnicas estándares. Por ejemplo, pueden usarse el análisis por transferencia Southern o la amplificación por PCR para verificar la integración del transgén. El nivel de expresión del ARNm puede analizarse entonces usando técnicas tales como la hibridación *in situ*, el análisis por transferencia Northern, la PCR, o la inmunocitoquímica. Los animales se examinan adicionalmente en busca de signos de tumores o de desarrollo del cáncer.

Alternativamente, pueden construirse animales "knockout" que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido PRO364 o PRO175 identificado en la presente invención, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175, y el ADN genómico alterado, que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica un determinado polipéptido PRO364 o PRO175 puede usarse para clonar ADN genómico que codifica ese polipéptido de acuerdo con técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica un determinado polipéptido PRO364 o PRO175 puede suprimirse o remplazarse con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede usarse para monitorizar la integración. Típicamente, se incluyen en el vector varios kilobases de ADN flanqueador inalterado (tanto en el extremo 5' como en el 3'). Consultar, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de los vectores recombinantes homólogos. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación), y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno. Consultar, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69:915 (1992). Las células seleccionadas se inyectan a continuación en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o rata) para formar quimeras de agregación. Consultar, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, editor. (IRL: Oxford, 1987), pp. 113-152. Un embrión quimérico puede implantarse a continuación en un animal nodriza hembra pseudopreñado, y el embrión se lleva a término para crear un animal "knockout". La progenie que alberga en sus células germinales el ADN recombinado homológamente puede identificarse mediante técnicas estándares, y se usa para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente. Los animales knockout pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse de ciertas condiciones patológicas, y por desarrollar condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido PRO364 o PRO175.

La eficacia de los anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos PRO364 o PRO175 identificados en la presente invención, y a otros fármacos candidatos, puede ensayarse también en el tratamiento de tumores animales espontáneos. Una diana apropiada para tales estudios es el carcinoma de células escamosas (SCC) orales de felino. El SCC oral felino es un tumor maligno, altamente invasor, y es el tumor maligno oral más común en los gatos, siendo responsable de más del 60% de los tumores orales descritos en esta especie. Raramente metastatiza a sitios distantes, aunque esta baja incidencia de metástasis puede ser simplemente un reflejo de los cortos tiempos de supervivencia de los gatos con este tumor. Estos tumores no son habitualmente susceptibles de cirugía, principalmente debido a la anatomía de la cavidad oral felina. Actualmente, no hay un tratamiento efectivo para este tumor. Antes de entrar en el estudio, cada gato se somete a un completo examen clínico y biopsia, y es escaneado mediante tomografía computarizada (CT). Los gatos diagnosticados con tumores de células escamosas orales sublinguales se excluyen del estudio. La lengua puede paralizarse a resultar de tal tumor, e, incluso si el tratamiento mata el tumor, los animales pueden no ser capaces de alimentarse por sí mismos. Cada gato se trata de forma repetida, a lo largo de un prolongado período de tiempo. Se tomarán fotografías de los tumores diariamente durante el período de tratamiento, y en cada examen subsiguiente. Después del tratamiento, cada gato se somete a otro examen de CT. Los exámenes de CT y los radiogramas torácicos se evaluaron cada 8 semanas a partir de entonces. Los datos se evaluaron en busca de diferencias en supervivencia, respuesta, y toxicidad en comparación con los grupos control. Las respuestas positivas pueden requerir evidencia de la regresión del tumor, preferiblemente con mejora de la calidad de vida y/o esperanza de vida incrementada.

Además, también pueden ensayarse otros tumores animales espontáneos, tales como el fibrosarcoma, el adenocarcinoma, el linfoma, el condroma, o el leiomioma de perros, gatos, babuinos. De estos, el adenocarcinoma mamario en perros y gatos es un modelo preferido, puesto que su aspecto y comportamiento es muy similar al de los humanos. No obstante, el uso de este modelo está limitado por el raro acontecimiento de este tipo de tumores en animales.

Otros ensayos cardiovasculares, endoteliales, y angiogenicos, *in vitro* e *in vivo*, conocidos en el estado de la técnica, son también apropiados en la presente invención.

ii. Distribución del tejido

Los resultados de los ensayos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos en la presente invención pueden verificarse mediante estudios adicionales, tales como mediante la determinación de la expresión del ARNm en varios tejidos humanos.

Tal como se ha mencionado previamente, la expresión del gen y/o la expresión del gen en varios tejidos puede medirse mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)), la transferencia en punto (análisis del ADN), o la hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer duplexes específicos, incluyendo los duplexes de ADN, los duplexes de ARN, y los duplexes híbridos ADN-ARN o los duplexes ADN-proteína.

La expresión del gen en varios tejidos puede medirse alternativamente mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo del cultivo de células o fluidos corporales para cuantificar directamente la expresión del producto del gen. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de muestras fluidas pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. De forma conveniente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido PRO364 o PRO175 de secuencia nativa, o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención, o contra una secuencia exógena fusionada al ADN que codifica el PRO364 o PRO175 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico. Las técnicas generales para generar anticuerpos, y los protocolos especiales para la hibridación *in situ* se proporcionan más abajo en la presente invención.

iii. Estudios de unión de anticuerpos

Los resultados del estudio cardiovascular, endotelial, y angiogénico pueden verificarse además mediante estudios de unión de anticuerpos, en los que se ensaya la capacidad de los anticuerpos anti-PRO364 o -PRO175 para inhibir el efecto de los polipéptidos PRO364 o PRO175 sobre las células endoteliales, u otras células usadas en los ensayos cardiovasculares, endoteliales, y angiogénicos. Los anticuerpos de ejemplo incluyen los anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados, cuya preparación se describirá más adelante en la presente invención.

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

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un estándar marcado para competir con el analito de la muestra de ensayo por la unión a un cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que pasa a estar unido a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que pasa a estar unido, los anticuerpos preferiblemente se insolubilizan antes o después de la competición, de forma que el estándar y el analito que están unidos a los anticuerpos puedan separarse convenientemente del estándar y analito que permanecen sin unir.

Los ensayos en sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica, o epítipo, diferente de la proteína a detectarse. En un ensayo en sándwich, el analito de la muestra de ensayo está unido a un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido, y a continuación un segundo anticuerpo se une al analito, formando de ese modo un complejo insoluble a tres bandas. Consultar, por ejemplo, la patente estadounidense n° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede estar él mismo marcado con un grupo detectable (ensayos en sándwich directos), o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo en sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo en sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es un enzima.

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

iv. Ensayos de tumor basados en células

Los ensayos basados en células y modelos animales para los trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos, tales como los tumores, pueden usarse para verificar los hallazgos de un ensayo cardiovascular, endotelial y angiogénico de la presente invención, y además para comprender la relación entre los genes identificados en la presente invención y el desarrollo y la patogénesis del crecimiento celular cardiovascular, endotelial y angiogénico no deseable. El papel de los productos de los genes identificados en la presente invención, en el desarrollo y patología del crecimiento celular cardiovascular, endotelial y angiogénico no deseable, por ejemplo, células tumorales, puede ensayarse usando células o líneas celulares que se ha identificado son estimuladas o inhibida por los polipéptido PRO364 o PRO175 en la presente invención. Tales células incluyen, por ejemplo, las detalladas en los Ejemplos siguientes.

En una estrategia diferente, las células de un tipo celular, que se sabe está implicado en un determinado trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico, se transfectan con los ADNc de la presente invención, y se analiza la capacidad de estos ADNc para inducir un crecimiento excesivo o para inhibir el crecimiento. Si el trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico es el cáncer, las células tumorales apropiadas incluyen, por ejemplo, las líneas celulares tumorales estables, tales como la línea celular B104-1-1 (línea celular estable NIH-3T3 transfectada con el protooncogén neu) y las células NIH-3T3 transfectadas con ras, las cuales pueden transfectarse con el gen deseado y monitorizarse su crecimiento tumorigénico. Tales líneas celulares transfectadas pueden usarse entonces para ensayar la capacidad de los anticuerpos poli- o monoclonales para ejercer una actividad citostática o citotóxica sobre el crecimiento de las células transformada, o por mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Las células transfectadas con las secuencias codificantes de los genes identificados en la presente invención pueden usarse además para identificar candidatos a fármacos para el tratamiento de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos, tales como el cáncer.

Además, los cultivos primarios derivados de tumores en animales transgénicos (tal como se describió más arriba) pueden usarse en los ensayos basados en células de la presente invención, aunque se prefieren las líneas celulares estables. Las técnicas para derivar líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos son bien conocidas en el campo. Consultar, por ejemplo, Small *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5:642-648 (1985).

v. Terapia génica

El polipéptido PRO364 o PRO175 en la presente invención, y los agonistas y antagonistas polipeptídicos, pueden emplearse mediante la expresión de tales polipéptidos *in vivo*, en lo que a menudo se denomina como terapia génica.

Hay dos estrategias principales para introducir el ácido nucleico (contenido opcionalmente en un vector) dentro de las células del paciente: *in vivo* y *ex vivo*. Para el suministro *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, usualmente en los sitios en los que se precisa el polipéptido PRO364 o PRO175, es decir, el sitio de síntesis del polipéptido PRO364 o PRO175, si se conoce, y el sitio (por ejemplo, la herida) en el que se precisa la actividad biológica del polipéptido PRO364 o PRO175. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en las células aisladas y las células modificadas se administran al paciente, bien directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas, las cuales se implantan dentro del paciente (consultar, por ejemplo, las patentes estadounidenses n° 4.892.538 y 5.283.187).

Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos dentro de células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro*, o si se transfiere *in vivo* a las células del huésped previsto. Las técnicas apropiadas para la transferencia del ácido nucleico dentro de células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, la electroporación, la microinyección, la transducción, la fusión celular, la DEAE-dextrano, el procedimiento de la precipitación con fosfato cálcico, etcétera. La transducción implica la asociación de una partícula vírica recombinante (preferiblemente retrovírica), con replicación defectuosa, con un receptor celular, seguido por la introducción del ácido nucleico contenido por la partícula en la célula. Los retrovirus son un vector usado comúnmente para el suministro *ex vivo* del gen.

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores víricos (tales como el adenovirus, lentivirus, el virus del *Herpes simplex* I, o los virus adeno-asociados) y los sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia del gen mediada por lípidos son, por ejemplo, el DOTMA, la DOPE y la DC-Chol; consultar, por ejemplo, Tonkinson *et al.*, *Cancer Investigation*, 14(1):54-65 (1996)). Los vectores más preferidos para su uso en la terapia génica son los virus, más preferiblemente los adenovirus, AAV, los lentivirus, o los retrovirus. Un vector vírico tal como un vector retrovírico incluye al menos un promotor/potenciador de la transcripción o elemento(s) definitorios del locus, u otros elementos que controlan la expresión génica por otros medios tales como el ajuste alternativo, la exportación de ARN nuclear, o la modificación del mensajero posterior a la traducción. Además, un vector vírico tal como un vector retrovírico incluye una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe en presencia de un gen que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175, está operativamente unida al mismo y actúa como una secuencia de iniciación de la traducción. Tales construcciones de vectores incluyen también una señal de empaquetado, repeticiones terminales largas (LTR) o porciones de las mismas, y sitios de unión de cebadores de la hebra positiva y negativa apropiados para el virus usado (si éstos no están presentes ya en el vector vírico). Además, tal vector incluye típicamente una secuencia señal para la secreción de polipéptido PRO364 o PRO175 a partir de una célula huésped en la cual está colocado. Preferiblemente, la secuencia señal para este propósito es una secuencia señal de mamífero, más preferiblemente la secuencia señal nativa para el polipéptido PRO364 o PRO175. Opcionalmente, la construcción del vector incluye también una señal que dirige la poliadenilación, así como uno o más sitios de restricción, y una secuencia de terminación de la traducción. A modo de ejemplo, tales vectores típicamente incluirán un LTR en 5', un sitio de unión del ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de la síntesis de la segunda hebra de ADN, y un LTR en 3' o una porción del mismo. Pueden usarse otros vectores que no son víricos, tales como los lípidos catiónicos, la polilisina, y los dendrímeros.

En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente del ácido nucleico con un agente que apunte hacia las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor sobre la célula diana, etcétera. Cuando se emplean liposomas, las proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con la endocitosis pueden usarse para apuntar y/o facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas que sean trópicos para un

tipo celular determinado, anticuerpos contra proteínas que experimentan internalización al ciclarse, y proteínas que apuntan a la localización intracelular y potencian la vida media intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por un receptor es descrita, por ejemplo, por Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de construcción de genes y terapia génica actualmente conocidos, consultar Anderson *et al.* *Science*, 256:808-813 (1992). Consultar también WO 93/25673 y las referencias citadas en la misma.

La terapia génica apropiada, y los procedimientos para preparar partículas retrovirales y proteínas estructurales pueden hallarse en, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.681.746.

vi. *Uso del gen como diagnóstico*

Esta invención se refiere también al uso del gen que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 como un diagnóstico. La detección de una forma mutada del polipéptido PRO364 o PRO175 permitirá una diagnosis de una enfermedad cardiovascular, endotelial, y angiogénica, o una susceptibilidad a una enfermedad cardiovascular, endotelial, y angiogénica, tal como un tumor, puesto que las mutaciones en el polipéptido PRO364 o PRO175 pueden causar tumores.

Los individuos portadores de mutaciones en los genes que codifica el polipéptido PRO364 humano o PRO175 humano pueden detectarse a nivel del ADN mediante una variedad de técnicas. Los ácidos nucleicos para la diagnosis pueden obtenerse a partir de las células del paciente, tales como a partir de la sangre, orina, saliva, biopsia de tejido, y material de autopsia. El ADN genómico puede usarse directamente para la detección, o puede amplificarse enzimáticamente usando la PCR (Saiki *et al.*, *Nature*, 324:163-166 (1986)) antes del análisis. El ARN o ADNc puede usarse también con el mismo propósito. Como un ejemplo, pueden usarse los cebadores de la PCR complementarios del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 para identificar mutaciones en el polipéptido PRO364 o PRO175. Por ejemplo, pueden detectarse supresiones e inserciones por un cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Las mutaciones localizadas pueden identificarse también hibridando ADN amplificado con ARN radiomarcado que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175, o, alternativamente, con secuencias de ADN antisentido radiomarcadas que codifican el polipéptido PRO364 o PRO175. Las secuencias perfectamente emparejadas pueden distinguirse de los duplexes mal emparejados mediante digestión con ARNasa A, o por diferencias en las temperaturas de fusión.

El ensayo genético basado en diferencias en la secuencia de ADN puede conseguirse mediante la detección de alteraciones en la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN en gel con o sin agentes desnaturizantes. Las pequeñas supresiones e inserciones en la secuencia pueden visualizarse mediante electroforesis en gel de alta resolución. Los fragmentos de ADN de secuencias diferentes pueden distinguirse en geles desnaturizantes con gradiente de formamida, en los cuales las movilidades de los diferentes fragmentos de ADN se retardan en el gel en diferentes posiciones de acuerdo con sus temperaturas de fusión o fusión parcial específicas. Consultar, por ejemplo, Myers *et al.*, *Science*, 230:1242 (1985).

Los cambios en la secuencia en ubicaciones específicas pueden relevarse también mediante ensayos de protección por nucleasa, tales como la ARNasa y la protección S1, o por el método de corte químico, por ejemplo, Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:4397-4401 (1985).

Por tanto, la detección de una secuencia de ADN específica puede conseguirse mediante procedimientos tales como la hibridación, la protección con ARNasa, el corte químico, la secuenciación directa del ADN, o el uso de enzimas de restricción, por ejemplo, polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), y la transferencia Southern del ADN genómico.

vii. *Uso para detectar los niveles de polipéptido PRO364 o PRO175*

Además de las más convencionales electroforesis en gel y secuenciación de ADN, las mutaciones pueden detectarse también mediante análisis *in situ*.

La expresión del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 puede asociarse a la enfermedad vascular o a la neovascularización asociada con la formación del tumor. Si el polipéptido PRO364 o PRO175 tiene una secuencia señal y el ARNm está altamente expresado en las células endoteliales, y con menor alcance en las células del músculo liso, esto indica que el polipéptido PRO364 o PRO175 está presente en el suero. En consecuencia, puede usarse un anticuerpo anti polipéptido PRO364 o PRO175 para diagnosticar la enfermedad vascular o la neovascularización asociada con la formación del tumor, puesto que un nivel alterado de este polipéptido PRO364 o PRO175 puede ser indicativo de tal trastorno.

Puede emplearse un ensayo de competición, en donde los anticuerpos específicos para el polipéptido PRO364 o PRO175 están unidos a un soporte sólido, y el polipéptido PRO364 o PRO175 marcado, y una muestra derivada del huésped, se hacen pasar sobre el soporte sólido, y la cantidad de marca detectada unida al soporte sólido puede correlacionarse con la cantidad de polipéptido PRO364 o PRO175 en la muestra.

viii. *Mapeado del cromosoma*

Las secuencias de la presente invención son también valiosas para la identificación del cromosoma. La secuencia está específicamente dirigida hacia, y puede hibridarse con una ubicación particular sobre un cromosoma humano individual. Más aún, hay una necesidad actual de identificar sitios determinados sobre el cromosoma. Actualmente, hay pocos reactivos marcadores de cromosoma, que se basen en los datos de secuencia actuales (polimorfismos de repetición), para marcar la ubicación cromosómica. El mapeado de los ADN sobre los cromosoma de acuerdo con la presente invención es un primer paso importante para correlacionar estas secuencias con genes asociados con enfermedades.

En resumen, la secuencias pueden mapearse sobre los cromosomas preparando cebadores de la PCR (preferiblemente 15-25 p.b.) a partir del ADNc. El análisis por ordenador de la región 3' no traducida se usa para seleccionar rápidamente cebadores que no abarquen más de un exón en el ADN genómico, complicando de este modo el proceso de amplificación. Estos cebadores se usan a continuación para el examen mediante la PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Sólo aquellos híbridos que contienen el gen humano correspondiente al cebador rendirán un fragmento amplificado.

El mapeado por PCR de híbridos de una célula somática es un procedimiento rápida para asignar un ADN particular a un cromosoma particular. Usando la presente invención con los mismos cebadores de oligonucleótidos, puede conseguirse la sublocalización con conjuntos de fragmentos procedentes de cromosomas específicos, o grupos de grandes clones genómicos, de una forma análoga. Otras estrategias de mapeado, que pueden usarse de forma similar para mapearlas sobre su cromosoma, incluyen la hibridación *in situ*, el pre-examen con cromosomas marcados ordenados mediante flujo, y la preselección por hibridación para construir bibliotecas de ADNc específicas de un cromosoma.

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) de un clon de ADNc con una extensión cromosómica de metafase puede usarse para proporcionar una ubicación cromosómica precisa en un único paso. Esta técnica puede usarse con ADNc que es tan corto como 500 ó 600 bases; sin embargo, los clones mayores de 2.000 p.b. tiene una mayor probabilidad de unirse a una ubicación cromosómica única con suficiente intensidad de señal para una detección simple. FISH requiere el uso de los clones de los cuales se derivó el gen que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175, y cuanto más largos mejor. Por ejemplo, 2.000 p.b. es bueno, 4.000 p.b. es mejor, y más de 4.000 probablemente no es necesario para conseguir buenos resultado un porcentaje razonable de las veces. Para una revisión de esta técnica, consultar Verma *et al.*, *Human Chromosomes: a Manual of Basic Technique* (Pergamon Press, Nueva York, 1988).

Una vez se ha mapeado una secuencia sobre una ubicación cromosómica precisa, la posición física de la secuencia sobre el cromosoma puede correlacionarse con datos del mapa genético. Tales datos se hallan, por ejemplo, en V. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man* (disponible en línea a través de la Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre los genes y las enfermedades que se han mapeado sobre la misma región cromosómica se identifica a continuación a través del análisis de la unión (coherencia de los genes físicamente adyacentes).

A continuación, es necesario determinar las diferencias en la secuencia de ADNc o genómico entre los individuos afectados y no afectados. Si la mutación se observa en algunos o todos los individuos afectados, pero no en ningún individuo normal, entonces es probable que la mutación sea el agente causante de la enfermedad.

Con la resolución actual de las técnicas de mapeado físico y mapeado genético, un ADNc ubicado precisamente sobre una región cromosómica asociada con la enfermedad puede ser uno de entre 50 a 500 genes causantes potenciales. (Esto asume una resolución de mapeado de 1 megabase y un gen por cada 20 kb).

ix: *Ensayos de exploración para candidatos a fármaco*

Esta invención abarca procedimientos de exploración de compuestos para identificar aquéllos que imitan el polipéptido PRO364 o PRO175 (agonistas) o que impiden el efecto del polipéptido PRO364 o PRO175 (antagonistas). Los ensayos de cribado en busca de candidatos de fármacos se diseñan para identificar compuestos que se unen o complejan con los polipéptidos PRO364 o PRO175 codificados por los genes identificados en la presente invención, o que interfieren de otro modo con la interacción de estos polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Tales ensayos de cribado incluirán los ensayos capaces de un cribado de elevado rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente apropiados para identificar pequeñas moléculas candidatas a fármaco.

Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, los ensayos de cribado bioquímicos, los inmunoensayos, y los ensayos basados en células, los cuales están bien caracterizados en el campo. Todos los ensayos para antagonistas tienen en común que buscan poner en contacto el candidato a fármaco con un polipéptido PRO264 o PRO175 codificado por un ácido nucleico identificado en la presente invención, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión, y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido PRO264 o PRO175, codificado por el gen identificado en la presente invención, o el candidato a fármaco se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microvaloración, mediante acoplamiento covalente o no covalente. El acoplamiento no covalente generalmente se consigue recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido PRO264 o PRO175 y secándola. Alternati-

vamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido PRO264 o PRO175 a inmovilizarse, puede usarse para anclarlo sobre una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, el cual podría marcarse mediante una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado es portador de una marca detectable, la detección de la marca inmovilizada sobre la superficie indica que ha ocurrido la formación del complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no es portador de una marca, la formación del complejo puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interacciona pero no se une a un polipéptido PRO364 o PRO175 particular codificado por un gen identificado en la presente invención, su interacción con ese polipéptido puede ensayarse mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Tales ensayos incluyen las estrategias tradicionales, tales como, por ejemplo, el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación, y la copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden monitorizarse usando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature (London)*, 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)) tal como descubrieron Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991). Muchos de los activadores de la transcripción, tales como el GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, actuando uno como dominio unidor de ADN, y funcionando el otro como dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones precedentes (generalmente denominado como el "sistema de dos híbridos") se aprovecha de esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana está fusionada al dominio unidor de ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas están unidas al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo control de un promotor GAL4-activado depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen los polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Un equipo completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos está disponible de Clontech. Este sistema puede extenderse también para mapear dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas, así como para señalar residuos aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen, que codifica un polipéptido de PRO364 o PRO175 identificado en la presente invención, y otros componentes intra- o extracelulares, puede ensayarse como sigue: usualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se corre en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, podría añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para servir como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se monitoriza como se ha descrito en la presente más arriba. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo, indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su pareja de reacción.

Si el polipéptido PRO364 o PRO175 tiene la capacidad de estimular la proliferación de las células endoteliales en presencia de co-mitógeno ConA, entonces un ejemplo de un procedimiento de cribado saca partido de esta capacidad. Específicamente, en el ensayo de proliferación, se obtienen células endoteliales de la vena umbilical humana, y se cultivan en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano (Costar, Cambridge, MA), y se suplementan con una mezcla de reacción apropiada para facilitar la proliferación de las células, conteniendo la mezcla Con-A (Calbiochem, La Jolla, CA). Se añaden Con-A y el compuesto a examinarse, y después de la incubación a 37°C, los cultivos se pulsan con (3-H)timidina y se recolectan sobre filtros de fibra de vidrio (pH; Cambridge Technology, Watertown, MA). La incorporación promedio de (3-H)timidina (c.p.m.) de tres cultivos triplicados se determina usando un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments, Irvine, CA). Una incorporación significativa de (3-H)timidina indica la estimulación de la proliferación de las células endoteliales.

Para ensayar en busca de antagonistas, se realiza el ensayo descrito más arriba; sin embargo, en este ensayo el polipéptido PRO364 o PRO175 se añade junto con el compuesto a examinar, y la capacidad del compuesto para inhibir la incorporación de (3H)timidina en presencia del polipéptido PRO364 o PRO175 indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO364 o PRO175. Alternativamente, los antagonistas pueden detectarse combinando el polipéptido PRO364 o PRO175 y un antagonista potencial, con receptores o receptores recombinantes del polipéptido PRO364 o PRO175 unidos a membrana, en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido PRO364 o PRO175 puede marcarse, tal como mediante radiactividad, de tal forma que el número de moléculas de polipéptido PRO364 o PRO175 unidas al receptor puede usarse para determinar la efectividad del antagonista potencial. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por aquellos capacitados en el estado de la técnica, por ejemplo, el cribado de ligando y la separación FACS. Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Chapter 5 (1991). Preferiblemente, la clonación de expresión se emplea cuando se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula que responde al polipéptido PRO364 o PRO175, y una biblioteca de ADNc, creada a partir de este ARN, se divide en lotes y se usa para transfectar células COS u otras células que no responden al polipéptido PRO364 o PRO175. Las células transfectadas, que se hacen crecer sobre portaobjetos de vidrio, se exponen a polipéptido PRO364 o PRO175 marcado. El polipéptido PRO364 o PRO175 puede marcarse mediante una variedad de medios, incluyen la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una quinas

de proteína específica de un sitio. A continuación de la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a análisis autorradiográfico. Se identifican los lotes positivos y se preparan sublotos y transfectan de nuevo usando un proceso interactivo de sub-división y re-examen, rindiendo eventualmente un único clon que codifica el receptor putativo.

Como una estrategia alternativa para la identificación del receptor, el polipéptido PRO364 o PRO175 marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana celular o extractos que expresan la molécula del receptor. El material entrecruzado se resuelve mediante PAGE y se expone a película de rayos-X. El complejo marcado que contiene el receptor puede extraerse, resolverse en fragmentos peptídicos, y someterse a microsecuenciación de proteína. La secuencia de aminoácidos obtenida de la microsecuenciación se usará para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degeneradas para examinar una biblioteca de ADNc para identificar los genes que codifican el receptor putativo.

En otro ensayo en busca de antagonistas, las células de mamífero, o una preparación de membrana, que expresan el receptor se incubarán con polipéptido PRO364 o PRO175 marcado en presencia del compuesto candidato. La capacidad del compuesto para potenciar o bloquear esta interacción pueden medirse entonces.

Las composiciones útiles para el tratamiento de los trastornos cardiovasculares, endoteliales, y angiogénicos incluyen, sin limitación, los anticuerpos, las moléculas orgánicas e inorgánicas pequeñas, los péptidos, los fosfopéptidos, las moléculas antisentido y los ribozimas, las moléculas de triple hélice, etc., que inhiben la expresión y/o actividad del producto del gen diana.

Los ejemplos más específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con el polipéptido PRO364 o PRO175, y, en particular, los anticuerpos, incluyendo, sin limitación, los anticuerpos poli- y monoclonales y los fragmentos de anticuerpo, los anticuerpos de cadena simple, los anticuerpos antiidiopáticos, las versiones quiméricas y humanizadas de tales anticuerpos o fragmentos, así como los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo humanos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, una forma mutada del polipéptido PRO364 o PRO175 que reconoce el receptor pero no transmite efecto alguno, inhibiendo competitivamente de ese modo la acción del polipéptido PRO364 o PRO175.

Otro antagonista potencial del polipéptido PRO364 o PRO175 es una construcción de ARN o ADN antisentido preparada usando tecnología antisentido, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN que actúa para bloquear directamente la traducción del ARNm hibridándose con el ARNm diana e impidiendo la traducción de la proteína. La tecnología antisentido puede usarse para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o a través del ADN o ARN antisentido, ambos procedimientos se basan en la unión de un polinucleótido al ADN o ARN. Por ejemplo, la porción codificante 5' de la secuencia de polinucleótido, la cual codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 maduros de la presente invención, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de desde aproximadamente 10 hasta 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario con una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice, consultar Lee *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science*, 241:456 (1988); Dervan *et al.*, *Science*, 251:1360 (1991)), impidiéndose de ese modo la transcripción y la producción de polipéptido PRO364 o PRO175. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo*, y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido PRO364 o PRO175 (antisentido - Okano, *Neurochem.*, 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos más arriba pueden también administrarse a células, de tal forma que el ARN o ADN antisentido puede expresarse *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido PRO364 o PRO175. Cuando se usa el ADN antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente -10 y +10 posiciones de cada secuencia de nucleótidos del gen diana.

Los antagonistas potenciales incluyen las moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, al sitio de unión al receptor, o al factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido PRO364 o PRO175, bloqueando de ese modo la actividad biológica normal del polipéptido PRO364 o PRO175. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, los péptidos pequeños o las moléculas similares a péptidos, los péptidos preferiblemente solubles, y los compuestos inorgánicos u orgánicos no peptídicos sintéticos.

Los ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar el corte específico del ARN. Los ribozimas actúan mediante hibridación específica para la secuencia con el ARN diana complementario, seguida por el corte endonucleolítico. Los sitios específicos de corte por ribozima con una diana potencial de ARN pueden identificarse mediante técnicas conocidas. Para más detalles consultar, por ejemplo, Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), y la publicación del PCT n° WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de hélice triple, usada para inhibir la transcripción, deberían ser de hebra simple y compuestas por desoxirribonucleótidos. La composición en bases de estos oligonucleótidos está diseñada de tal forma que promueve la formación de la hélice triple a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, lo que generalmente requiere tiradas considerables de purinas o pirimidinas sobre una hebra de un dúplex. Para más detalles consultar, por ejemplo, la publicación del PCT n° WO 97/33551, ver más arriba.

Todas estas moléculas pequeñas pueden identificarse mediante uno cualquiera, o más, de los ensayos de cribado discutidos más arriba en la presente invención, y/o mediante cualquier otras técnicas de cribado bien conocidas por expertos en la materia.

x. Tipos de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos a ser tratados

Los polipéptido PRO364 o PRO175, o los agonistas o antagonistas de los mismos, que tienen actividad en los ensayos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos descritos en la presente invención, y/o cuyos productos génicos se ha hallado que están ubicados en el sistema cardiovascular, es probable que tengan usos terapéuticos en una variedad de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos, incluyendo los trastornos sistémicos que afectan los vasos sanguíneos, tales como la diabetes mellitus. Su utilidad terapéutica puede incluir enfermedades de las arterias, capilares, venas, y/o vasos linfáticos. Los ejemplos de tratamientos a continuación incluyen el tratar la atrofia muscular, tratar la osteoporosis, ayudar en la fijación de implantes para estimular el crecimiento de células alrededor del implante y facilitar por tanto su anclaje en su sitio de destino, incrementar la estabilidad del IGF en tejidos o en suero, si es aplicable, e incrementar la unión al receptor del IGF (puesto que se ha observado que el IGF *in vitro* potencia el crecimiento de las células progenitoras granulocíticas y eritroideas en la médula humana).

Los polipéptido PRO364 o PRO175, o los agonistas o antagonistas de los mismos, pueden emplearse también para estimular la eritropoyesis o la granulopoyesis, para estimular la cicatrización de las heridas o la regeneración de tejidos, y las terapias asociadas concernientes al recrecimiento de tejidos, tales como el tejido conectivo, la piel, los huesos, el cartílago, el músculo, los pulmones, o los riñones, para promover la angiogénesis, para estimular o inhibir la migración de células endoteliales, y para proliferar el crecimiento del músculo liso vascular y la producción de células endoteliales. El incremento en la angiogénesis mediado por el polipéptido PRO364 o PRO175, o antagonistas, será beneficioso para los tejidos isquémicos, y para el desarrollo coronario colateral en el corazón subsiguiente a una estenosis coronaria. Los antagonistas se usan para inhibir la acción de tales polipéptidos, por ejemplo, para limitar la producción de un exceso de tejido conectivo durante la cicatrización de heridas o en la fibrosis pulmonar, si el polipéptido PRO364 o PRO175 promueve tal producción. Esto incluiría el tratamiento del infarto de miocardio agudo y del fallo cardíaco.

Además, la presente invención concierne al tratamiento de la hipertrofia cardíaca, con independencia de la causa subyacente, mediante la administración de una dosis terapéuticamente efectiva de polipéptido PRO364 o PRO175.

Si el objetivo es el tratamiento de los pacientes humanos, el polipéptido PRO364 o PRO175 preferiblemente es un polipéptido PRO364 o PRO175 recombinante humano (polipéptido rhPRO364 o rhPRO175). El tratamiento de la hipertrofia cardíaca puede realizarse en cualquiera de sus varias etapas, las cuales pueden resultar de una variedad de diversas condiciones patológicas, incluyendo el infarto de miocardio, la hipertensión, la cardiomiopatía hipertrófica, y la regurgitación valvular. El tratamiento se extiende a todas las etapas de la progresión de la hipertrofia cardíaca, con o sin lesión estructural del músculo cardíaco, con independencia del trastorno cardíaco subyacente.

La decisión de si usar la propia molécula o un agonista de la misma para cualquier indicación concreta, en oposición a un antagonista de la molécula, dependerá principalmente de si la molécula en la presente invención promueve la cardiovascularización, la génesis de células endoteliales, o la angiogénesis, o si inhibe estas condiciones. Por ejemplo, si la molécula promueve la angiogénesis, un antagonista de la misma será útil para el tratamiento de los trastornos en los que se desea limitar o prevenir la angiogénesis. Los ejemplos de tales trastornos incluyen los tumores vasculares tales como los hemangiomas, la angiogénesis de los tumores, la neovascularización en la retina, coroides o córnea, asociada con la retinopatía diabética o con la retinopatía del prematuro o con la degeneración macular y la vitreoretinopatía proliferativa, la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la aterosclerosis, la hiperestimulación ovárica, la psoriasis, la endometriosis asociada con la neovascularización, la reestenosis subsiguiente a la angioplastia con globo, la sobreproducción de tejido en cicatrizante, por ejemplo, la observada en un queloide que se forma después de cirugía, la fibrosis posterior al infarto de miocardio, o las lesiones fibróticas asociadas con la fibrosis pulmonar.

Sin embargo, si la molécula exhibe angiogénesis, se esperaría que se usara directamente para el tratamiento de las condiciones anteriores.

Por otra parte, si la molécula estimula la angiogénesis, se usará por sí misma (o un agonista de la misma) para las indicaciones en las que se desea la angiogénesis, tales como la enfermedad vascular periférica, la hipertensión, la vasculitis inflamatoria, la enfermedad de Reynaud y el fenómeno de Reynaud, los aneurismas, la reestenosis arterial, la tromboflebitis, la linfangitis, el linfedema, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos, la lesión por isquemia-reperusión, la angina (de pecho), el infarto de miocardio tales como los infartos de miocardio agudos, la insuficiencia cardíaca crónica, el fallo cardíaco tal como el fallo cardíaco congestivo, y la osteoporosis.

Sin embargo, si la molécula exhibe angiogénesis, se usará un antagonista de la misma para el tratamiento de aquellas condiciones en los que se desea la angiogénesis.

A continuación se describen tipos específicos de enfermedades, en las que el polipéptido PRO364 o PRO175 de la presente invención, o los antagonistas del mismo, pueden ser útiles como dianas de fármacos relacionados con los vasos, o como dianas terapéuticas para el tratamiento o prevención de los trastornos. La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por la acumulación de placa de engrosamiento de la íntima en las arterias, debida a la acumulación de lípidos, a la proliferación de células del músculo liso, y a la formación de tejido fibroso dentro de la pared arterial. La enfermedad puede afectar las arterias mayores, medias y pequeñas en cualquier órgano. Se sabe que los cambios en la función celular endotelial y del músculo liso vascular desempeñan un papel importante en la modulación de la acumulación y regresión de estas placas.

La hipertensión se caracteriza por un incremento en la presión vascular en los sistemas arterial, arterial pulmonar, o venoso portal sistémicos. La presión elevada puede ser el resultado de una función endotelial dada y/o de enfermedad vascular.

5 La vasculitis inflamatoria incluye la arteritis de células gigantes, la arteritis de Takayasy, la poliarteritis nodosa (incluyendo la forma microangiopática), la enfermedad de Kawasaki, la poliangitis microscópica, la granulomatosis de Wegener, y una variedad de trastornos vasculares relacionados con infecciones (incluyendo la púrpura de Henoch-Schonlein). Se ha observado que la función celular endotelial alterada es importante en estas enfermedades.

10 La enfermedad de Reynaud y el fenómeno de Reynaud se caracterizan por la alteración anormal intermitente de la circulación a través de las extremidades expuestas al frío. Se ha observado que la función celular endotelial alterada es importante en esta enfermedad.

15 Los aneurismas son dilataciones en forma de saco o fusiformes del árbol arterial o venoso, que están asociadas con células endoteliales y/o células del músculo liso vascular alteradas.

La reestenosis arterial (reestenosis de la pared arterial) puede ocurrir a continuación de la angioplastia a resultas de la alteración en la función y proliferación de las células del músculo liso vascular y endoteliales.

20 La tromboflebitis y la linfangitis son respectivamente trastornos inflamatorios de las venas y vasos linfáticos, que pueden resultar de, y/o en, la alteración de la función celular endotelial. De forma similar, el linfedema es una condición que implica los vasos linfáticos alterados que resulta de la función celular endotelial.

25 La familia de tumores vasculares benignos y malignos se caracteriza por la anormal proliferación y crecimiento de elementos celulares del sistema vascular. Por ejemplo, los linfangiomas son tumores benignos del sistema linfático que son malformaciones congénitas, a menudo císticas, de los vasos linfáticos, que ocurren usualmente en recién nacidos. Los tumores císticos tienden a crecer en tejidos adyacentes. Los tumores císticos usualmente ocurren en la región cervical y axilar. Pueden ocurrir también en el tejido blando de las extremidades. Los principales síntomas son vasos linfáticos dilatados, a veces reticulados, estructurados, y linfoquistes rodeados por tejido conectivo. Se asume que los linfangiomas están causados por vasos linfáticos embrionarios incorrectamente conectados, o por su carencia. 30 El resultado es un drenaje linfático local dañado. Griener *et al.*, *Lymphology*, 4:140-144 (1971).

Otro uso para los polipéptido PRO364 o PRO175 de la presente invención, o antagonistas de los mismos, es en la prevención de la angiogénesis tumoral, la cual implica la vascularización de un tumor para permitirle crecer y/o metastatizar. Este proceso depende del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. Los ejemplos de neoplasmas y enfermedades 35 relacionadas que implican la angiogénesis tumoral incluyen los carcinomas mamarios, los carcinomas de pulmón, los carcinomas gástricos, los carcinomas esofágicos, los carcinomas colorectales, los carcinomas de hígado, los carcinomas ováricos, los tecomas, los arrenoblastomas, los carcinomas de cuello de útero, el carcinoma endometrial, la hiperplasia endometrial, la endometriosis, los fibrosarcomas, el coriocarcinoma, el cáncer de cabeza y cuello, el carcinoma nasofaríngeo, los carcinomas laríngeos, el hepatoblastoma, el sarcoma de Kaposi, el melanoma, los carcinomas de la piel, el hemangioma, el hemangioma cavernoso, el hemangioblastoma, los carcinomas de páncreas, el retinoblastoma, el astrocitoma, el glioblastoma, el Schwannoma, el oligodendroglioma; el meduloblastoma, los neuroblastomas, el rabdomiosarcoma, el sarcoma osteogénico, los leiomiomas, los carcinomas del tracto urinario, los carcinomas de la tiroides, el tumor de Wilm, el carcinoma de célula renal, el carcinoma de próstata, la proliferación vascular anormal 45 asociada con la facomatosis, el edema (tal como el asociado con los tumores cerebrales), y el síndrome de Meigs.

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es una causa principal de pérdida visual grave en la población anciana. La forma exudativa de la AMD se caracteriza por una neovascularización coroidal y un desprendimiento de las células del epitelio pigmentado retinal. Puesto que la neovascularización coroidal está asociada con un empeoramiento dramático de la prognosis, se espera que los polipéptido PRO364 o PRO175, o los antagonistas de los 50 mismos, sean útiles para reducir la gravedad de la AMD.

La cicatrización de una lesión, tal como la curación de una herida y la reparación del tejido, es también un uso previsto de los polipéptido PRO364 o PRO175 de la presente invención, o de sus antagonistas. La formación y regresión 55 de nuevos vasos sanguíneos es esencial para la curación y reparación del tejido. Esta categoría incluye el crecimiento o regeneración del tejido óseo, cartilaginosos, de tendones, de ligamentos, y/o nervioso, así como la curación de heridas y la reparación y sustitución de tejido, y en el tratamiento de quemaduras, incisiones y úlceras. Un polipéptido PRO364 o PRO175, o un antagonista del mismo, que induce el crecimiento de cartílago y/o hueso en circunstancias en la que normalmente no se forma hueso, tiene aplicación en la curación de fracturas óseas y lesiones o defectos del cartílago en humanos y en otros animales. Una preparación tal empleando un polipéptido PRO364 o PRO175, o un antagonista del mismo, puede tener un uso profiláctico en la reducción de fracturas cerradas y abiertas, y también en la fijación mejorada de articulaciones artificiales. La formación *de novo* de hueso inducida por un agente osteogénico contribuye a la reparación de defectos craneofaciales congénitos, inducidos por trauma, oncológicos, o inducidos por resección, y es útil también en la cirugía plástica cosmética. 60

Los polipéptido PRO364 o PRO175, o los antagonistas de los mismos, pueden ser útiles también para promover un cierre mejor o más rápida de heridas no cicatrizantes, incluyendo sin limitación, las úlceras por presión, las úlceras asociadas con la insuficiencia vascular, las heridas quirúrgicas y traumáticas, y similares.

Se espera que un polipéptido PRO364 o PRO175, o un antagonista contra el mismo, puedan exhibir también actividad para la generación o regeneración de otros tejidos, tales como órganos (incluyendo, por ejemplo, el páncreas, el hígado, el intestino, el riñón, la piel, el endotelio), el músculo (liso, esquelético, o cardíaco), y el tejido vascular (incluyendo el endotelio vascular), o para la promoción del crecimiento de células que forma parte de tales tejidos.

- 5 Parte de los efectos deseados pueden conseguirse mediante la inhibición o modulación de la cicatrización fibrótica para permitir la regeneración del tejido normal.

- 10 Un polipéptido PRO364 o PRO175 en la presente invención, o un antagonista del mismo, pueden ser útiles también para la protección o regeneración del intestino y para el tratamiento de la fibrosis pulmonar o hepática, para la lesión por reperusión en varios tejidos, y en condiciones que resulten de la lesión sistémica de citocinas. También, el polipéptido PRO364 o PRO175, o los antagonistas del mismo, pueden ser útiles para promover o inhibir la diferenciación de tejidos descrita más arriba a partir de tejidos o células precursores, o para inhibir el crecimiento de los tejidos descrito más arriba.

- 15 Un polipéptido PRO364 o PRO175, o un antagonista del mismo, pueden usarse también en el tratamiento de enfermedades periodontales y en otros procesos de reparación dentales. Tales agentes pueden proporcionar un entorno para atraer las células formadoras de hueso, para estimular el crecimiento de las células formadoras de hueso, o para inducir la diferenciación de los progenitores de las células formadoras de hueso. Un polipéptido PRO364 o PRO175 de la presente invención, o un antagonista del mismo, puede ser útil también en el tratamiento de la osteoporosis u osteoartritis, tal como a través de la estimulación de la reparación del hueso y/o cartílago, o bloqueando la inflamación o los procesos de destrucción del tejido (actividad colagenasa, actividad de osteoclastos, etc.) mediados por procesos de inflamación, puesto que los vasos sanguíneos desempeñan una función importante en el crecimiento y regulación del recambio óseo.

- 25 Otra categoría de actividad de regeneración de tejido que puede ser atribuible al polipéptido PRO364 o PRO175 de la presente invención, o un antagonista del mismo, es la formación de tendón/ligamento. Una proteína que induzca la formación de tejido parecido a tendón/ligamento, u otro tejido, en circunstancias en las que normalmente no se forma tal tejido, tiene aplicación en la curación de roturas de tendón y ligamento, de deformidades, y otros defectos del ligamento en humanos y en otros animales. Una preparación tal puede tener un uso profiláctico para prevenir la lesión al tejido del tendón o ligamento, así como un uso en la fijación mejorada del tendón o ligamento al hueso y otros tejidos, y en la reparación de los defectos del tejido del tendón o ligamento. La formación *de novo* de tejido parecido a tendón/ligamento inducida por una composición del polipéptido PRO364 o PRO175 de la presente invención, o un antagonista del mismo, contribuye a la reparación de defectos congénitos, inducidos por trauma, u otros defectos con otro origen, y es útil también en la cirugía plástica cosmética para el anclaje o reparación de tendones y ligamentos. Las composiciones en la presente invención pueden proporcionar un entorno para atraer las células formadoras de tendón o ligamento, para estimular el crecimiento de las células formadoras de tendón o ligamento, o para inducir la diferenciación de los progenitores de las células formadoras de tendón o ligamento, o para inducir el crecimiento de las células de tendón/ligamento o sus progenitores *ex vivo* para su retorno *in vivo* para efectuar la reparación del tejido. Las composiciones en la presente invención pueden ser útiles también en el tratamiento de la tendinitis, del síndrome de túnel carpiano, y otros defectos de tendones o ligamentos. Las composiciones pueden incluir también una matriz y/o agente secuestrante apropiado como un portador, como es bien conocido en el estado de la técnica.

- 45 El polipéptido PRO364 o PRO175, o su antagonista, puede ser útil también para la proliferación de células neurales y para la regeneración del tejido nervioso y cerebral, es decir, para el tratamiento de las enfermedades y neuropatías del sistema nervioso central y periférico, así como de los trastornos traumáticos que implican la degeneración, muerte, o trauma de las células neurales o del tejido nervioso. Más específicamente, un polipéptido PRO364 o PRO175, o su antagonista, pueden usarse en el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso periférico, tales como las lesiones de los nervios periféricos, la neuropatía periférica y las neuropatías localizadas, y las enfermedades del sistema nervioso central, tales como el Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, y el síndrome de Shy-Drager. Otras condiciones que pueden tratarse de acuerdo con la presente invención incluyen los trastornos mecánicos y traumáticos, tales como los trastornos de la médula espinal, los traumas en la cabeza, y las enfermedades cerebrovasculares tales como la apoplejía. Las neuropatías periféricas que resultan de la quimioterapia o de otras terapias médicas pueden ser tratables también usando un polipéptido PRO364 o PRO175 de la presente invención, o un antagonista del mismo.

- La lesión por isquemia-reperusión es otra indicación. La disfunción de la célula endotelial puede ser importante tanto en el inicio, como en la regulación de la secuela de sucesos que ocurren a continuación de la lesión por isquemia-reperusión.

- 60 La artritis reumatoide es otra indicación. El crecimiento de los vasos sanguíneos y que sean diana de las células inflamatorias a lo largo de la vasculatura, es un componente importante en la patogénesis de las formas reumatoide y sero-negativa de la artritis.

- 65 El polipéptido PRO364 o PRO175, o su antagonista, pueden administrarse también profilácticamente a pacientes con hipertrofia cardíaca, para prevenir la progresión de esta condición, y evitar la muerte súbita, incluyendo la muerte de pacientes asintomáticos. Tal terapia preventiva está particularmente justificada en el caso de los pacientes diagnosticados con una hipertrofia cardíaca ventricular izquierda masiva (un grosor máximo de la pared de 35 mm o más en

adultos, o un valor comparable en niños), o en casos en los que la carga hemodinámica del corazón es particularmente intensa.

El polipéptido PRO364 o PRO175, o su antagonista, pueden ser útiles también en la gestión de la fibrilación atrial, la cual se desarrolla en un porcentaje sustancial de pacientes diagnosticados con cardiomiopatía hipertrófica. Las indicaciones adicionales incluyen la angina de pecho, los infartos de miocardio tales como los infartos de miocardio agudos, y el fallo cardíaco tal como la insuficiencia cardíaca congestiva. Las condiciones no-neoplásicas adicionales incluyen la psoriasis, la retinopatía diabética y otras retinopatías proliferativas, la fibroplasia retrolental, el glaucoma neovascular, las hiperplasias de tiroides (incluyendo la enfermedad de Grave), los trasplantes de córnea y otros tejidos, la inflamación crónica, la inflamación del pulmón, el síndrome nefrótico, la preclampsia, la ascitis, la efusión pericárdica (tal como la asociada con la pericarditis), y la efusión pleural.

En vista de lo anterior, los polipéptidos PRO364 o PRO175, o los agonistas o antagonistas de los mismos descritos en la presente invención, que se ha mostrado que alteran o impactan sobre la función, la proliferación, y/o forma celular endotelial, es probable que desempeñen un papel importante en la etiología y patogénesis de muchos o todos los trastornos mencionados más arriba, y como tales pueden servir como dianas terapéuticas para aumentar o inhibir estos procesos, o como dianas de fármacos relacionados con la vasculatura en estos trastornos.

xi. *Protocolos de administración, pauta, dosis y formulaciones*

Las moléculas en la presente invención, y los agonistas y antagonistas de las mismas, son farmacéuticamente útiles como agente profiláctico o terapéutico para varios trastornos y enfermedades, como se ha expuesto más arriba.

Las formulaciones terapéuticas de los polipéptidos PRO364 o PRO175, o de los agonistas o antagonistas, se preparan para su almacenamiento mezclando la molécula activa, que tiene el grado de pureza deseado, con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A. editor (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como el fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; el cloruro de hexametonio; el cloruro de benzalconio, el cloruro de bencetonio; el fenol, el alcohol butílico o bencílico; los alquilparabenos tales como el metil o propilparaben; el catecol; el resorcinol; el ciclohexanol; el 3-pentanol; y el m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina del suero, la gelatina, o las inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes tales como el EDTA; azúcares tales como la sacarosa, el manitol, la trehalosa o el sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como el sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como el TWEENTM, el PLURONICSTM o el polietilenglicol (PEG).

Los ejemplos adicionales de tales portadores incluyen los intercambiadores iónicos, la alumina, el estearato de aluminio, la lecitina, las proteínas del suero, tales como la albúmina del suero humana, las sustancias tamponantes, tales como los fosfatos, la glicina, el ácido sórbico, el sorbato potásico, las mezclas parciales de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, el agua, las sales, o electrolitos tales como el sulfato de protamina, el fosfato disódico, el fosfato potásico, el cloruro sódico, las sales de zinc, el silice coloidal, el trisilicato de magnesio, la polivinilpirrolidona, las sustancias basadas en la celulosa, y el polietilenglicol. Los portadores para las formas de los antagonistas tópicos o basadas en geles incluyen los polisacáridos tales como la carboximetilcelulosa sódica o la metilcelulosa, la polivinilpirrolidona, los poliacrilatos, los polímeros del bloque polioxitileno-polioxiisopropileno, el polietilenglicol, y los alcoholes de ceras de la madera. Las formas de depósito convencionales se usan de forma apropiada para todas las administraciones. Tales formas incluyen, por ejemplo, la microcápsulas, las nanocápsulas, los liposomas, los esparadrapos, las formas para inhalación, los atomizadores nasales, las tabletas sublinguales, y las preparaciones de liberación sostenida. Los polipéptidos PRO230, PRO216, o PRO302, o los agonistas o antagonistas, típicamente se formulará en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

Otra formulación comprende la incorporación del polipéptido PRO364 o PRO175, o de antagonistas de los mismos, en artículos conformados. Tales artículos pueden usarse en la modulación del crecimiento de las células endoteliales y de la angiogénesis. Además, la invasión tumoral y la metástasis pueden modularse con estos artículos.

El polipéptido PRO364 o PRO175, o el antagonista, a usarse para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o a continuación de su liofilización y reconstitución. El polipéptido PRO364 o PRO175 ordinariamente se almacenará en forma liofilizada, o en solución si se administra sistémicamente. En la forma liofilizada, el polipéptido PRO364 o PRO175, o el antagonista del mismo, se formula típicamente en combinación con otros ingredientes, para su reconstitución con un diluyente apropiado en el momento de su uso. Un ejemplo de formulación líquida de polipéptido PRO364 o PRO175, o antagonista, es una solución no conservada, incolora, transparente, estéril, introducida en un vial de dosis única para inyección subcutánea. Las composiciones farmacéuticas preservadas apropiadas para un uso repetido pueden contener, por ejemplo, dependiendo principalmente de la indicación y tipo del polipéptido:

- a) polipéptido PRO364 o PRO175, o agonista o antagonista del mismo;

- b) un tampón capaz de mantener el pH en un ragon de máxima estabilidad del polipéptido u otra molécula en solución, preferiblemente aproximadamente 4-8;
- c) un detergente/tensioactivo, principalmente para estabilizar el polipéptido o la molécula frente a la agregación inducida por la agitación;
- d) un isotonicante;
- e) un conservante seleccionado de entre el grupo del fenol, alcohol bencílico, y haluro de bencetonio, por ejemplo, cloruro; y
- f) agua.

Si los detergentes empleados son no iónicos, pueden ser, por ejemplo, polisorbatos (por ejemplo, POLYSORBATETM, TWEENTM 20, 80, etcétera) o poloxámeros (por ejemplo, POLOXAMERTM 188). El uso de tensioactivos no iónicos permite que la formulación esté expuesta a las tensiones de corte superficiales sin causar la desnaturalización del polipéptido. Además, tales formulaciones que contienen tensioactivos pueden emplearse en dispositivos de aerosoles, tales como los empleados en la dosificación pulmonar, y en las pistolas de inyección por chorro sin aguja (consultar, por ejemplo, EP 257.956).

Puede estar presente un isotonicante para asegurar la isotonicidad de una composición líquida del polipéptido PRO364 o PRO175, o agonista del mismo, e incluye los azúcares alcohol polihídricos, preferiblemente los azúcares alcohol trihídricos o superiores, tales como la glicerina, el eritritol, el arabitol, el xilitol, el sorbitol, y el manitol. Estos azúcares alcohol pueden usarse solos o en combinación. Alternativamente, puede usarse el cloruro sódico u otras sales inorgánicas apropiadas para hacer las soluciones isotónicas.

El tampón puede, por ejemplo, ser acetato, citrato, succinato, o tampón fosfato, dependiendo del pH deseado. El pH de un tipo de formulación líquida de esta invención está tamponada en el rango de aproximadamente 4 a 8, preferiblemente aproximadamente a pH fisiológico.

Los conservantes fenol, alcohol bencílico, y los haluros de bencetonio, por ejemplo, el cloruro, son conocidos agentes antimicrobianos que pueden emplearse.

Las composiciones de polipéptido PRO364 o PRO175 terapéuticas generalmente se colocan en un contenedor que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tienen un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Las formulaciones se administran preferiblemente como inyecciones intravenosas (i.v.), subcutáneas (s.c.), intramusculares (i.m.) repetidas, o como formulaciones en aerosol apropiadas para un suministro intranasal o intrapulmonar (para suministro intrapulmonar consultar, por ejemplo, la EP 257.956).

El polipéptido PRO364 o PRO175 pueden administrarse también en forma de preparaciones de liberación continuada. Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación sostenida incluyen las matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la proteína, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continuada incluyen los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, el poli(2-hidroxietil-metacrilato) tal como se describen en Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12:98-105 (1982), o el poli(vinilalcohol)), los poliláctidos (patente estadounidense nº 3.773.919, EP 58.481), los copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato (Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22:547-556 (1983)), el etilvinilacetato no degradable (Langer *et al.*, ver más arriba), los copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), y el ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

Mientras que los polímeros tales como el etilvinilacetato y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un largo período, podrían desnaturalizarse o agregarse a resultas de la exposición a humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y en posibles cambios de su inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización de las proteínas dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización podría conseguirse modificando los residuos sulfhidrido, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específica.

Las composiciones de liberación continuada de polipéptido PRO364 o PRO175 incluyen también el polipéptido PRO364 o PRO175 atrapado en liposomas. Los liposomas que contienen el polipéptido PRO364 o PRO175 se preparan mediante procedimientos conocidos por sí mismos: DE 3.218.121; Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; la solicitud de patente japonesa 83-118008; las patentes estadounidenses nº 4.485.045 y 4.544.545; y EP 102.324. Ordinariamente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800

Angstroms), en los que el contenido lipídico es mayor de aproximadamente 30% molar de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia óptima.

La dosis terapéuticamente efectiva de polipéptido PRO364 o PRO175, o antagonista contra el mismo, variará, por supuesto, dependiendo de factores tales como la condición patológica a tratarse (incluyendo la prevención), el procedimiento de administración, el tipo de compuesto que se está usando para el tratamiento, de cualquier terapia simultánea implicada, de la edad, peso, condición médica general, historia médica del paciente, etcétera, y su determinación se halla dentro de los conocimientos de un médico titulado. En consecuencia, será necesario para el médico ajustar la dosis y modificar la ruta de administración según se requiera para obtener el máximo efecto terapéutico. Si el polipéptido PRO364 o PRO175 tiene un estrecho rango de huéspedes, para el tratamiento de pacientes humanos se prefieren las formulaciones que comprenden el polipéptido PRO364 humano, o el PRO175 humano, más preferiblemente el polipéptido PRO364 humano, o PRO175 humano de secuencia nativa. El médico administrará el polipéptido PRO364 o PRO175 hasta que se alcance una dosis que consiga el efecto deseado para el tratamiento de la condición en cuestión. Por ejemplo, si el objetivo es el tratamiento del CHF, la cantidad será una que exhiba la hipertrofia cardíaca progresiva asociada con esta condición. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ecocardiografía. De forma similar, en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica, el polipéptido PRO364 o PRO175 puede administrarse sobre una base empírica.

Con las anteriores directrices, la dosis efectiva generalmente se hall dentro del rango de desde aproximadamente 0,001 hasta aproximadamente 1,0 mg/kg, más preferiblemente aproximadamente 0,01-1 mg/kg, lo más preferiblemente aproximadamente 0,01-0,1 mg/kg.

Para el uso no-oral en el tratamiento de la hipertensión adulta humana, es ventajoso administrar el polipéptido PRO364 o PRO175 en forma de una inyección de aproximadamente 0,01 a 50 mg, preferiblemente aproximadamente 0,05 a 20 mg, más preferiblemente de 1 a 20 mg, por kg de peso corporal. De 1 a 3 veces diariamente mediante inyección intravenosa. Para la administración oral, es preferible una molécula basada en el polipéptido PRO364 o PRO175, administrada a aproximadamente 5 mg a 1 g, preferiblemente aproximadamente de 10 a 100 mg, por kg de peso corporal. De 1 a 3 veces diariamente. Debería apreciarse que la contaminación de endotoxina debería mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína. Además, para la administración a humanos, las formulaciones preferiblemente cumplen con la esterilidad, pirogenicidad, seguridad general, y pureza requerida por la Office of Biologics Standards de la FDA.

El régimen de dosificación de una composición farmacéutica que contiene el polipéptido PRO364 o PRO175 a usarse en la regeneración del tejido se determinará considerando varios factores que modifican la acción del polipéptido, por ejemplo, la cantidad de peso de tejido que se desea formar, el sitio de la lesión, la condición del tejido dañado, el tamaño de la herida, el tipo de tejido lesionado (por ejemplo, hueso, la edad, sexo y dieta del paciente, y la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración, y otros factores clínicos. La dosis puede variar con el tipo de matriz usada en la reconstitución y con la inclusión de otras proteínas en la composición farmacéutica. Por ejemplo, la adición de otros factores de crecimiento conocidos, tales como el IGF-I, a la composición final puede afectar también la dosificación. El progreso puede monitorizarse mediante la evaluación del crecimiento y/o reparación del tejido/hueso, por ejemplo, mediante rayos X, determinaciones histomorfométricas, y etiquetado con tetraciclina.

La ruta de administración del polipéptido PRO364 o PRO175, o del antagonista o agonista, es acorde con procedimientos conocidos, por ejemplo, la inyección o infusión mediante rutas intravenosa, intramuscular, intracerebral, intraperitoneal, intracelular, subcutánea, intraocular, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por rutas de inhalación, o mediante sistemas de liberación continuada, tal como se mencionó más arriba. El polipéptido PRO364 o PRO175, o los antagonistas del mismo, puede administrarse convenientemente mediante ruta intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales así como sistémicos. Se espera que la ruta intraperitoneal sea particularmente útil, por ejemplo, en el tratamiento de los tumores de ovarios.

Si se emplea un péptido o molécula pequeña como un antagonista o agonista, éste preferiblemente se administra de forma oral o no oral, en forma de un líquido o sólido para mamíferos.

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables, de moléculas que forman sales y que son útiles a continuación, incluyen las sales de metal alcalino (por ejemplo, sal sódica, sal potásica), las sales de metales terrosos alcalinos (por ejemplo, sal de calcio, sal de magnesio), las sales de amonio, las sales de bases orgánicas (por ejemplo, la sal de piridina, la sal de trietilamina), las sales ácidas inorgánicas (por ejemplo, el sulfato de hidrocloreto, el nitrato), y las sales de ácidos orgánicos (por ejemplo, el acetato, oxalato, p-toluenesulfonato).

Para las composiciones en la presente invención que son útiles para la regeneración del hueso, cartílago, tendón, o ligamento, el procedimiento terapéutico incluye administrar la composición tópicamente, sistémicamente, o localmente, como un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica a usar está en una forma fisiológicamente aceptable, libre de pirógenos. Además, la composición puede encapsularse de forma deseable o inyectarse en una forma viscosa para su suministro en el sitio del daño del hueso, cartílago o tejido. La administración tópica puede ser apropiada para la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Preferiblemente, para la formación de hueso y/o cartílago, la composición incluirá una matriz capaz de suministrar la composición que contiene proteína en el sitio del daño del hueso y/o cartílago, proporcionando una estructura para el hueso y cartílago en des-

arrollo, y preferiblemente será capaz de ser resorbida en el cuerpo. Tales matrices pueden estar formadas por materiales actualmente en uso para otras aplicaciones médicas implantadas.

La elección del material se basa en la biocompatibilidad, biodegradabilidad, propiedades mecánicas, aspecto cos-
mético, y propiedades de interfaz. La aplicación particular de las composiciones definirá la formulación apropiada. Las matrices potenciales para las composiciones pueden ser de sulfato cálcico, fosfato tricálcico, hidroxiapatito, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y polianhídridos, biodegradables y químicamente definidas. Otros materiales potenciales son biodegradables y están biológicamente bien definidos, tales como el hueso y el colágeno dérmico. Otras matrices están formada por proteínas puras o componentes de la matriz extracelular. Otras matrices potenciales no son biodegradables y están biológicamente bien definidos, tales como el hidroxiapatito sinterado, el biovidrio, los aluminatos, u otras cerámicas. Las matrices pueden estar formadas por combinación de cualquiera de los tipos de materiales mencionados más arriba, tales como el ácido poliláctico y el hidroxiapatito, o el colágeno y el fosfato tricálcico. Las biocerámicas pueden alterarse en su composición, tal como en fosfato-aluminato de calcio, y procesarse para alterar el tamaño de poro, el tamaño de la partícula, la forma de la partícula, y la biodegradabilidad.

Una realización específica es un copolímero al 50:50 (peso molar) de ácido láctico y ácido glicólico, en forma de partículas porosas que tienen diámetros que oscilan desde 150 hasta 180 micrones. En algunas aplicaciones, será útil utilizar un agente secuestrante, tal como la carboximetil celulosa o un coágulo de sangre autólogo, para impedir que las composiciones de polipéptido se disocien de la matriz.

Una familia de agentes secuestrantes la constituyen los materiales celulósicos tales como las alquilcelulosas (incluyendo hidroxialquilcelulosas), incluyendo la metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y la carboximetilcelulosa, siendo una de las preferidas las sales catiónicas de carboximetilcelulosa (CMC). Otros agentes secuestrantes preferidos incluyen el ácido hialurónico, el alginato sódico, el poli (etilenglicol), el óxido de polioxietileno, el polímero de carboxivinilo, y el poli(alcohol vinílico). La cantidad de agente secuestrante útil en la presente invención es del 0,5-20% en peso, preferiblemente del 1-10% en peso, en base al peso total de la formulación, lo que representa la cantidad necesaria para impedir la desorción del polipéptido (o su antagonista) de la matriz de polímero, y para permitir la manipulación necesaria de las composiciones, aunque no tanto como para que las células progenitora no puedan infiltrar la matriz, proporcionando de ese modo al polipéptido (o su antagonista) la oportunidad de ayudar a la actividad osteogénica de las células progenitoras.

xii. *Terapias de combinación*

La efectividad del polipéptido PRO364 o PRO175, o de un agonista o antagonista del mismo, para prevenir o tratar el trastorno en cuestión puede mejorarse administrando el agente activo en serie, o en combinación con otro agente que es efectivo para estos propósitos, bien en la misma composición o como composiciones separadas.

Por ejemplo, para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca, la terapia con polipéptido PRO364 o PRO175 puede combinarse con la administración de inhibidor de factores conocidos de hipertrofia de miocitos cardíacos, por ejemplo, los inhibidores del agonista α -adrenérgico tales como la fenilefrina; los inhibidores de la endotelina-1 tales como el BOSENTANTM y el MOXONODINTM; los inhibidores de la CT-1 (patente estadounidense nº 5.679.545); los inhibidores de la LIF; los inhibidores del ACE; los inhibidores de la des-aspartato-angiotensina I (patente estadounidense nº 5.773.415), y los inhibidores de la angiotensina II.

Para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca asociada con la hipertensión, el polipéptido PRO364 o PRO175 puede combinarse con agentes bloqueadores del receptor β -adrenérgico, por ejemplo, el propranolol, timolol, tertalolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutolol, atenolol, metoprolol, o el carvedilol; los inhibidores del ACE, por ejemplo, el quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril, o lisinopril; los diuréticos, por ejemplo, la clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetazida, metilclotiazida, benzotiazida, diclorfenamida, acetazolamida, o indapamida; y/o los bloqueadores del canal de calcio, por ejemplo, el diltiazem, la nifedipina, el verapamil, y la nicardipina. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los agentes terapéuticos identificados en la presente invención por sus nombres genéricos están disponibles comercialmente, y deben administrarse siguiendo las instrucciones de los fabricantes para la dosificación, administración, efectos adversos, contraindicaciones, etcétera. Consultar, por ejemplo, *Physicians' Desk Reference* (Medical Economics Data Production Co.: Montvale, N.J., 1997), 51ª edición.

Los candidatos preferidos para la terapia de combinación en el tratamiento de la cardiomiopatía hipertrófica son los fármacos bloqueadores β -adrenérgicos (por ejemplo, el propranolol, timolol, tertalolol, carteolol, nadolol, betaxolol, penbutolol, acetobutolol, atenolol, metoprolol, o el carvedilol), el verapamil, la difedipina, o el diltiazem. El tratamiento de la hipertrofia cardíaca asociada con la presión elevada puede requerir el uso de terapia con fármacos antihipertensivos, usando bloqueadores del canal de calcio, por ejemplo, el diltiazem, la nifedipina, el verapamil, o la nicardipina; agentes bloqueadores β -adrenérgicos; diuréticos, por ejemplo, la clorotiazida, hidroclorotiazida, hidroflumetazida, metilclotiazida, benzotiazida, diclorfenamida, acetazolamida, o indapamida; y/o los inhibidores de ACE, por ejemplo, el quinapril, captopril, enalapril, ramipril, benazepril, fosinopril, o el lisinopril.

Para otras indicaciones, los polipéptido PRO364 o PRO175, o sus antagonistas, pueden combinarse con otros agentes beneficiosos para el tratamiento del defecto, herida o tejido de hueso y/o cartílago en cuestión. Estos agentes incluyen varios factores de crecimiento tales como el EGF, PDGF, TGF- α o TGF- β , IGF, FGF, y CTGF.

Además, los polipéptidos PRO364 o PRO175, o sus antagonistas, usados para tratar el cáncer pueden combinarse con agentes citotóxicos, quimioterapéuticos, o agentes inhibidores del crecimiento, según se han identificado más arriba. También para el tratamiento del cáncer, el polipéptido PRO364 o PRO175, o el antagonista del mismo, se administra de manera adecuada en serie o en combinación con tratamientos radiológicos, tanto si implican la irradiación o la administración de sustancias radiactivas.

Las cantidades efectivas de agentes terapéuticos administrados en combinación con el polipéptido PRO364 o PRO175, o antagonistas del mismo, estará a discreción del médico o veterinario. La administración y ajuste de la dosificación se hace para conseguir la máxima gestión de las condiciones a tratarse. Por ejemplo, para tratar la hipertensión, estas cantidades idealmente toman en consideración el uso de diuréticos o digitalis, y las condiciones tales como la hiper- o hipotensión, o la insuficiencia renal, etcétera. La dosis dependerá adicionalmente de tales factores como el tipo de agente terapéutico a usarse, y del paciente específico que se esté tratando. Típicamente, la cantidad empleada será la misma dosis que la usada si el agente terapéutico se administrara sin el polipéptido PRO364 o PRO175.

xiii. Artículos manufacturados

Un artículo manufacturado, tal como un equipo que contenga el polipéptido PRO364 o PRO175, o un antagonista del mismo, es útil para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos más arriba, y comprende al menos un contenedor y una etiqueta. Los contenedores apropiados incluyen, por ejemplo, las botellas, los viales, las jeringas y los tubos de ensayo. Los contenedores podrían estar formados por una variedad de materiales, tales como el vidrio o el plástico. El contenedor contiene una composición que es efectiva para diagnosticar o tratar la condición, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor podría ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el polipéptido PRO364 o PRO175, o un agonista o antagonista del mismo. La etiqueta sobre, o asociada con contenedor indica que la composición se usa para diagnosticar o tratar la condición escogida. El artículo manufacturado puede comprender además un segundo contenedor que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, una solución de Ringer, y una solución de dextrosa. Además, puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, e insertos del paquete con instrucciones para su uso. El artículo manufacturado puede comprender además un segundo o tercer contenedor con otro agente activo, tales como se describió más arriba.

C. Anticuerpos

Algunos de los candidatos a fármacos más prometedores, de acuerdo con la presente invención, son los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que pueden inhibir la producción o el producto del gen de los genes identificados en la presente invención, y/o reducir la actividad de los productos de genes.

i. Anticuerpos policlonales

Los procedimientos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos por el especialista capacitado. Los anticuerpos policlonales pueden generarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante, y, si se desea, de un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido PRO364 o PRO175 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se sabe es inmunogénica en el mamífero que se está inmunizando. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a, la hemocianina de lapa con forma de ojo de cerradura, la albúmina de suero, la tiroglobulina bovina, y el inhibidor de la tripsina de la semilla de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil-Lípido A o dicorinomicolato de trehalosa sintético). Alguien formado en el campo podría seleccionar el protocolo de inmunización sin experimentación excesiva.

ii. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos anti-PRO364 o PRO175 pueden, alternativamente, ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales podrían prepararse usando los procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, un hámster, u otro animal apropiado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para elicitar linfocitos que producen, o son capaces de producir, anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos podrían inmunizarse *in vitro*.

El agente inmunizante típicamente incluirá el polipéptido PRO364 o PRO175 o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, o se usan linfocitos de la sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de nódulo linfático si se desean fuentes de mamífero no humano. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión apropiado, tal como el polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (Nueva York: Academic Press, 1986), pp. 59-103. Las líneas celulares inmortalizadas son usualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de roedor, bovinas o de origen humano. Usualmente se emplean líneas celulares

de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma podrían cultivarse en un medio de cultivo apropiado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células progenitoras carecen del enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluye hipoxantina, aminopterina y timidina (“medio HAT”), sustancias que previenen el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan eficientemente, soportan la expresión estable a nivel elevado del anticuerpo por parte de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son las líneas de mieloma del ratón, las cuales pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito también las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano. Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) pp. 51-63.

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de híbrido puede ensayarse entonces en busca de la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PRO364 o PRO175. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determinará mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA). Tales técnicas y ensayos son conocidos en el campo. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de haberse identificado las células de hibridoma, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante procedimientos estándares. Goding, ver más arriba. Los medios de cultivo apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo, el medio de Eagle modificado por Dulbecco y el medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridomas pueden hacerse crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse a partir del medio de cultivo o del fluido de ascitis mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, la Proteína A-Sepharose, la cromatografía con hidroxilapatito, la electroforesis en gel, la diálisis, o la cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse también mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente estadounidense n° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de ratón). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, los cuales se transfectan a continuación a células huéspedes tales como las células COS de mono, las células de ovario de hámster chino (CHO), o las células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huéspedes recombinantes. El ADN también podría modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante con dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias homólogas murinas (patente estadounidense n° 4.816.567; Morrison, *et al.*, ver más arriba), o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina la totalidad o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de inmunoglobulina. Un polipéptido tal que no es de inmunoglobulina puede sustituirse en lugar de los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede sustituirse en lugar de los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en el campo. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada está truncada generalmente en cualquier punto de la región Fc con objeto de impedir el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos cisteína relevantes se sustituyen con otro residuo aminoácidos o se suprimen para prevenir el entrecruzamiento.

Los procedimientos *in vitro* son también apropiados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas rutinarias conocidas en el campo.

iii. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-PRO364 o -PRO175 pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, de roedor) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas, o fragmentos de las mismas (tales como los Fv, Fab, Fab’, F(ab’)₂, u otras subsecuencias unidoras de antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen las inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se sustituyen residuos de una CDR del receptor con residuos de una CDR de una especie que no es humana (anticuerpo donante) tal como un ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseada. En

algunos casos, los residuos estructurales del Fv de la inmunoglobulina humana se remplazan con los correspondientes residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados podrían comprender también residuos que no se hallan ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o estructurales importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad o al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los cuales todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina que no es humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquéllas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado preferiblemente comprenderá también al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Los procedimientos para humanizar anticuerpos que no son humanos son bien conocidos en el campo. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoácidos introducidos en él procedentes de una fuente que no es humana. Estos residuos aminoácidos no humanos a menudo se denominan como residuos "importados", los cuales se toman típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo CDR o secuencias de CDR en lugar de las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente estadounidense n° 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente procedente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR, y posiblemente algunos residuos de FR, se sustituyen con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos pueden producirse también usando varias técnicas conocidas en el campo, incluyendo las bibliotecas de exhibición en fago. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos. Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985), y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). De forma similar, los anticuerpos humanos pueden prepararse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo ratones, en los que los genes de la inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. A partir de su desafío, se observa la producción de anticuerpo humano, el cual se parece estrechamente al observado en humanos en todos los aspectos, incluyendo la reordenación del gen, el ensamblado y el repertorio del anticuerpo. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; and 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature*, 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995).

iv. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el caso presente, una de las especificidades de unión es por PRO364 o PRO175, la otra es por cualquier otro antígeno, y preferiblemente por una proteína de la superficie celular o un receptor o subunidad de receptor.

Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos son bien conocidos en el estado de la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes. Milstein y Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se consigue usualmente mediante pasos de cromatografía de afinidad. Se describieron procedimientos similares en WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, comprendiendo al menos parte de las regiones gozne, CH2 y CH3. Es preferible tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión distintos, y se co-transfectan en un organismo huésped apropiado. Para detalles adicionales sobre la generación de anticuerpos biespecíficos consultar, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

v. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune hacia células no deseadas (patente estadounidense n° 4.676.980), y para el tratamiento de la infección con VIH. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089. Se contempla que los anticuerpos podrían prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de proteí-

nas sintética, incluyendo aquéllos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, podrían construirse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos apropiados para este propósito incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato, y aquéllos descubiertos en la patente estadounidense n° 4.676.980.

vi. Ingeniería de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora con objeto de potenciar, por ejemplo, la efectividad del anticuerpo para tratar el cáncer. Por ejemplo, pueden introducirse residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede tener una capacidad de internalización mejorada, y/o una muerte celular mediada por complemento y una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementadas. Consultar Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176:1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral potenciada pueden prepararse también usando entrecruzadores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *et al.*, *Cancer Research*, 53:2560-2565 (1993). Alternativamente, puede diseñarse un anticuerpo que tiene regiones Fc duales y puede, por tanto, tener capacidades de ADCC y lisis por complemento potenciadas. Consultar Stevenson *et al.*, *AntiCancer Drug Design*, 3:219-230 (1989).

vii. Inmunoconjugados

La invención también pertenece a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de tales inmunoconjugados se han descrito más arriba. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que pueden usarse incluyen la cadena A de la difteria, los fragmentos activos no unidores de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modicina, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), el inhibidor de *Momordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina, y la tricotecenes. Hay disponibles una variedad de radionúcleos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen el ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , y ^{186}Re .

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando una variedad de agentes bifuncionales acopladores de proteína, tales como el N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), el iminotiolano (IT), los derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como el dimetil adipimidato HCl), los ésteres activos (tales como el disuccinimidil suberato), los aldehídos (tales como el glutaraldehído), los compuestos bis-azido (tales como la bis-(p-azidobenzoyl)hexanediamina), los derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoyl)-etilendiamina), los diisocianatos (tales como el tolien-2,6-diisocianato), y los compuestos de fluor bis-activos (tales como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un agente quelante ilustrativo para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Consultar WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse a un "receptor" (tal como la estreptoavidina) para su utilización para pre-apuntar a un tumor, en donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido por la eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente eliminador, y a continuación por la administración de un "ligando" (por ejemplo, la avidina) que está conjugada a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

viii. Inmunoliposomas

Los anticuerpos descritos en la presente invención pueden formularse también como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4030 (1980); y en las patentes estadounidenses n° 4.485.045 y 4.544.545. En la patente estadounidense n° 5.013.556 se describen liposomas con tiempo de circulación mejorado.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición de lípido que comprenda fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para rendir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención pueden conjugarse a los liposomas como se describe en Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257:286-288 (1982) a través de la reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, en el liposoma se contiene un agente quimioterapéutico (tal como la doxorubicina). Consultar Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.*, 81(19):1484 (1989).

ix. *Composiciones farmacéuticas de anticuerpos*

Los anticuerpos que unen específicamente al polipéptido PRO364 o PRO175 identificado en la presente invención, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos más arriba, pueden administrarse para el tratamiento de varios trastornos, tal como se ha mencionado más arriba y abajo, en forma de composiciones farmacéuticas.

Si el polipéptido PRO364 o PRO175 es intracelular, y se usan anticuerpos enteros como inhibidores, se prefiere la internalización de los anticuerpos. Sin embargo, también pueden usarse las lipofecciones o liposomas para suministrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, al interior de las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio unidor de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que retienen la capacidad para unir la secuencia de la proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante la tecnología del ADN recombinante. Consultar, por ejemplo, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7889-7893 (1993).

La formulación en la presente invención podrían contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación concreta que se está tratando, preferiblemente aquellas que complementan actividades que no se afectan desfavorablemente entre ellas. Alternativamente, o además, la composición podría comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citocina, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están convenientemente presentes en combinación, en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos pueden estar atrapados también en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, respectivamente microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), es sistemas coloidales de suministro de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, ver más arriba.

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

Pueden prepararse preparaciones de liberación continua. Los ejemplos apropiados de preparaciones de liberación continua incluyen las matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación continuada incluyen los poliésteres, los hidrogeles (por ejemplo, el poli(2-hidroxietil-metacrilato), o el poli(alcohol vinílico)), los poliláctidos (patente estadounidense n° 3.773.919), los copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, el etilenvinilacetato no degradable, los copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprólido), y el ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que los polímeros tales como el etilenvinilacetato y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo período, pueden desnaturalizarse o agregarse a resultas de la exposición a humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y en posibles cambios de su inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización de los anticuerpos dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización podría conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido en humedad, usando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específica.

x. *Procedimientos de tratamiento usando el anticuerpo*

Se contempla que los anticuerpos contra el polipéptido PRO364 o PRO175 pueden usarse para tratar varias condiciones cardiovasculares, endoteliales y angiogénicas, tal como se ha mencionado más arriba.

Los anticuerpos, se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continuada a lo largo de un período de tiempo, por rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por rutas de inhalación. La administración intravenosa del anticuerpo es la preferida.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración de los anticuerpos de la presente invención, tal como se mencionó más arriba. Por ejemplo, si los anticuerpos son para tratar el cáncer, el paciente a tratarse con tales anticuerpos puede recibir también terapia de radiación. Alternativamente, o en adición, puede administrarse al paciente un agente quimioterapéutico. La preparación y programación de la dosificación para los agentes quimioterapéuticos podría usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante, o según sea determinado empíricamente por el médico capacitado. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia se describen también en *Chemotherapy Service*, editor M.C. Perry (Williams & Wilkins: Baltimore, MD, 1992). El agente quimioterapéutico podría preceder, o seguir la administración del anticuerpo, o puede administrarse simultáneamente al mismo. El anti-

cuerpo puede combinarse con un compuesto anti-estrógeno como el tamoxifén, o EVISTA™, o una anti-progesterona tal como la onapristona (consultar, EP 616812) en dosis conocidas para tales moléculas.

Los anticuerpos se usan para tratar el cáncer, puede ser deseable administrar también anticuerpos contra otros antígenos asociados al tumor, tales como anticuerpos que se unen a uno o más de los receptores ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o VEGF. Esto incluye también los agentes mencionados más arriba. El anticuerpo también se administra de manera adecuada en serie o en combinación con tratamientos radiológicos, tanto si implican la irradiación o la administración de sustancias. Alternativamente, o además, podrían administrarse al pacientes dos o más anticuerpos que se unen al mismo o a dos o más antígenos diferentes descritos en la presente. A veces, podría ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente. En una realización preferida, los anticuerpos en la presente invención se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse primero, seguido por un anticuerpo de la presente invención. No obstante, también se contempla la administración simultánea o la administración primero del anticuerpo de la presente invención. Las dosificaciones apropiadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas actualmente usadas, y podrían disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y del polipéptido de la invención.

En una realización, la vascularización de los tumores se ataca con terapia de combinación. El anti-polipéptido PRO364 o PRO175 y otro anticuerpo (por ejemplo, el anti-VEGF) se administran a los pacientes portadores del tumor en dosis terapéuticamente efectivas según se determine, por ejemplo, observando la necrosis del tumor o de su foco metastático, si alguno. Esta terapia se continua hasta el momento en que no se observa ningún efecto beneficioso adicional, o hasta que el examen clínico no muestra trazas del tumor o de foco metastático alguno. Cuando se administra TNF, solo o en combinación con un agente auxiliar tal como el interferón alfa, beta o gamma, el anticuerpo anti-HER2, la heregulina, el anticuerpo anti-heregulina, el factor D, la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-2 (IL-2), el factor estimulador de la colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), o agentes que promueven la coagulación microvascular en tumores, tales como el anticuerpo anti-proteína C, el anticuerpo anti-proteína S, o la proteína unidora de C4b (consultar WO 91/01753, publicada el 21 de febrero de 1991), o el calor o la radiación.

Puesto que los agentes auxiliares variarán en su efectividad, es deseable comparar su impacto sobre el tumor mediante cribado de matriz de forma convencional. La administración de anticuerpo anti-polipéptido PRO364 o PRO175 y de TNF se repite hasta que se consigue el efecto clínico deseado. Alternativamente, el anticuerpo anti-polipéptido PRO364 o PRO175 se administra junto con el TNF y, opcionalmente, agente(s) auxiliar(es). En los casos en los que los tumores sólidos se hallan en las extremidades o en otras ubicaciones susceptibles de ser aisladas de la circulación general, los agentes terapéuticos descritos en la presente invención se administran al tumor u órgano aislado. En otras realizaciones, un antagonista del FGF o PDGF, tal como un anticuerpo neutralizante anti-FGF o anti-PDFG, se administra al paciente conjuntamente con el anticuerpo anti-polipéptido PRO364 o PRO175. El tratamiento con anticuerpos anti-polipéptido PRO364 o PRO175 preferiblemente puede suspenderse durante períodos de cicatrización de heridas o de neovascularización deseable.

Para la prevención o tratamiento del trastorno cardiovascular, endotelial y angiogénico, la dosificación apropiada de un anticuerpo de la presente invención dependerá del tipo de trastorno a tratarse, según se definió más arriba, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente, y de la respuesta al anticuerpo, y del criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra convenientemente al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosificación candidata inicial, para la administración al paciente, es aproximadamente de 1 µg/kg a 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) del anticuerpo, sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continuada. Una dosificación diaria típica podría oscilar desde aproximadamente 1 µg/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores antes mencionados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se repite o mantiene hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas del trastorno. Sin embargo, podrían ser útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se sigue fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales, incluyendo, por ejemplo, la visualización radiográfica del tumor.

xi. Artículos manufacturados con anticuerpos

Se proporciona también un artículo manufacturado que contiene un contenedor con el anticuerpo y una etiqueta. Tales artículos se describen más abajo, en donde el agente activo es un anticuerpo anti-PRO364 o anti-PRO175.

xii. Diagnósis y prognosis de tumores usando anticuerpos

Si la indicación para la que se usan los anticuerpos es el cáncer, aunque las proteínas de la superficie celular son proteínas, tales como receptores de crecimiento sobreexpresados en ciertos tumores, son dianas excelentes para los candidatos a fármacos o para el tratamiento del tumor (por ejemplo, cáncer), las mismas proteínas junto con los polipéptidos PRO364 o PRO175 hallan un uso adicional en el diagnóstico y prognosis de los tumores. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos PRO364 o PRO175 pueden usarse como diagnósticos o pronósticos del tumor.

Por ejemplo, los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de anticuerpo, pueden usarse cualitativa o cuantitativamente para detectar la expresión de genes, incluyendo el gen que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175. El anticuerpo está preferiblemente equipado con una marca detectable, por ejemplo, fluorescente, y la unión puede monitorizarse, por ejemplo, mediante microscopia óptica, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en la técnica. Tales ensayos de unión se realizan esencialmente tal como se han descrito más arriba.

La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos del gen marcador puede realizarse, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopia inmunoelectrónica. Para este propósito, se retira un espécimen histológico del paciente y se le aplica un anticuerpo marcado, preferiblemente depositando el anticuerpo sobre una muestra biológica. Este procedimiento permite también determinar la distribución del producto del gen marcador en el tejido examinado. Será evidente a los especialistas en la técnica que hay disponibles una amplia variedad de procedimientos histológicos para la detección *in situ*.

Los ejemplos siguientes se ofrecen sólo con propósitos ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención en modo alguno.

Los descubrimientos de todas las patentes y referencias de la literatura citadas en la presente memoria se incorporan por la presente por referencia en su totalidad.

20 Ejemplos

Los reactivos disponibles comercialmente mencionados en los Ejemplos se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. Las fuentes de aquellas células identificadas en los siguientes Ejemplos, y a lo largo de la memoria, por sus números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA. A menos que se indique lo contrario, la presente invención usa procedimientos estándares de tecnología de ADN recombinante, tales como los descritos más arriba y en los siguientes libros de texto: Sambrook *et al.*, ver más arriba; Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing Associates & Wiley Interscience, N.Y., 1989); Innis *et al.*, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Academic Press, Inc.: N.Y., 1990); Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor, 1988); Gait, *Oligonucleotide Synthesis* (IRL Press: Oxford, 1984); Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987; Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immunology*, 1991.

Ejemplo 1

35 Aislamiento de clones de ADNc que codifican el PRO364 humano

Se examinó una base de datos de ADN de secuencias de marcas expresadas (EST) (LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) y se identificó una EST (Incyte EST n° 3003460) que mostraba homología con miembros de la familia de polipéptidos del receptor del factor de necrosis del tumor (TNFR).

A continuación se ensambló una secuencia consenso de ADN relacionada con la Incyte 3003460 EST y otras secuencias EST usando ciclos repetidos de BLAST (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)) y "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, <http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>). Esta secuencia consenso se denomina en la presente invención "<consen01>" en las Figuras 3A-C. La secuencia consenso "<consen01>" (SEC. N° ID.: 4) mostrada en las Figuras 3A-C también se denomina en la presente invención como "DNA44825" (ver Figura 4; SEC. N° ID.: 4).

Basándose en las secuencias consenso DNA44825 y "<consen1>" mostradas en las Figuras 3-4, se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar mediante la PCR una biblioteca de ADNc que contuviera la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa del PRO364. Los cebadores de la PCR hacia adelante y hacia atrás generalmente oscilan de 20 a 30 nucleótidos, y a menudo se diseñan para proporcionar un producto de la PCR de aproximadamente 100-1000 p.b. de longitud. Las secuencias de las sonda tienen típicamente de 40-55 p.b. de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia consenso es mayor de aproximadamente 1-1,5 kpb. Con objeto de cribar varias bibliotecas en busca de un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante amplificación con la PCR, tal com en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, con el primer par de la PCR. A continuación se usó una biblioteca positiva para aislar clones que codificaban el gen de interés usando loa sonda de oligonucleótidos y uno de los pares de cebadores.

Se sintetizaron pares de cebadores de la PCR (hacia adelante y hacia atrás):

cebador hacia adelante de la PCR (44825.f1)

5'-CACAGCACGGGGCGATGGG-3'

(SEC. N° ID.: 6)

ES 2 295 040 T3

cebador hacia adelante de la PCR (44825.f2)

5'-GCTCTGCGTTCTGCTCTG-3'

(SEC. N° ID.: 11)

cebador hacia adelante de la PCR (44825.GITR.f)

5'-GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTT-3'

(SEC. N° ID.: 5)

cebador hacia atrás de la PCR (44825.r1)

5'-CTGGTCACTGCCACCTTCCTGCAC-3'

(SEC. N° ID.: 12)

cebador hacia atrás de la PCR (44825.r2)

5'-CGCTGACCCAGGCTGAG-3'

(SEC. N° ID.: 8)

cebador hacia atrás de la PCR (44825.GITR.r)

5'-GAAGGTCCCCGAGGCACAGTCGATACA-3'

(SEC. N° ID.: 10)

Adicionalmente, se construyeron sondas de hibridación de oligonucleótidos sintéticas, a partir de la secuencia consenso DNA44825, que tenían las siguientes secuencias de nucleótidos:

sonda de hibridación (44825.p1)

5'-GAGGAGTGCTGTTCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGC-3'

(SEC. N° ID.:9)

sonda de hibridación (44825.GITR.p)

5'-AGCCTGGGTCAGCGCCCCACCGGGGTCCCGGGTGCGGCC-3'

(SEC. N° ID.:7)

Con objeto de cribar varias bibliotecas en busca de una fuente de un clon de longitud completa, se examinó el ADN de las bibliotecas mediante PCR de amplificación con los pares de cebadores de la PCR identificados más arriba. A continuación se usó una biblioteca positiva para aislar clones que codificaban el gen del PRO364 usando la sonda de oligonucleótidos y uno de los pares de cebadores.

El ARN para la construcción de las bibliotecas de ADNc se aisló a partir de tejido de médula ósea humana. Las bibliotecas de ADNc usadas para aislar los clones de ADNc se construyeron mediante procedimientos estándares usando reactivos disponibles comercialmente, tales como los procedentes de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligo-dT que contenía un sitio NotI, se unió con extremo romo a adaptadores SalI hemiquinasados, se cortó con NotI, se calibró su tamaño convenientemente mediante electroforesis en gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación apropiado (tal como el pRKB o pRKD; el pRK5B es un precursor del pRK5D que no contiene el sitio SfiI; consultar, Holmes *et al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991), el los únicos sitios XhoI y NotI.

La secuenciación del ADN de los clones aislados tal como se describió más arriba proporcionó una única secuencia de ADN de longitud completa para PRO364 [denominada en la presente invención como UNQ319 (DNA47365-1206)] (SEC. N° ID.: 1) y la secuencia de proteína derivada para el PRO364.

La secuencia nucleotídica entera de UNQ319 (DNA47365-1206) se muestra en la Figura 1 (SEC. N° ID.: 1). El clon UNQ319 (DNA47365-1206) se ha depositado en la ATCC, y tiene asignado el n° de depósito en la ATCC: ATCC 209436. El clon UNQ319 (DNA47365-1206) contiene un único marco de lectura abierto con un sitio aparente de inicio de la traducción en las posiciones de nucleótidos 121-123 [Kozak *et al.*, ver más arriba], y que finaliza en el codón de paro en las posiciones de nucleótidos 844-846 (Figura 1; SEC. N° ID.: 1). El precursor polipeptídico predicho tiene 241 aminoácidos de longitud (Figura 2; SEC. N° ID.: 3). La proteína PRO364 de longitud completa (SEC. N° ID.:3) mostrada en la Figura 2 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 26.000 dalton, y un pI de aproximadamente 6,34. Existe un potencial sitio de N-glicosilación entre los aminoácidos 146 y 149 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3). El análisis de hidropatía (no se muestra) sugiere una tipología transmembrana del Tipo 1; hay una secuencia señal putativa que entre los aminoácidos 1 a 25, y existe un dominio transmembrana potencial entre los aminoácidos 162 y 180 de la secuencia mostrada en la Figura 2 (SEC. N° ID.: 3).

El análisis de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO364 de longitud completa sugiere que ciertas partes de él poseen homología con miembros de la familia del receptor del factor de necrosis del tumor, indicando por tanto que el PRO364 puede ser un nuevo miembro de la familia del receptor del factor de necrosis del tumor. El dominio intracelular de PRO364 contiene un motivo (en la región de los aminoácidos 207-214 de la Figura 2; SEC. N° ID.:3) similar al dominio mínimo dentro del receptor CD30, que se ha mostrado es necesario para la unión de TRAF2, y que también está presente dentro del TNFR2 [Lee *et al.*, ver más arriba, (1996)]. Hay tres dominios ricos en cisteínas, aparentemente extracelulares, característicos de la familia del TNFR [consultar, Naismith and Sprang, *Trends Biochem. Sci.*, 23:74-79 (1998)], de los cuales el tercer CDR tiene 3 cisteínas, en vez de las más típicas 4 a 6 de la familia del TNFR. En comparación con el GITR de ratón (descrito más abajo), la secuencia de aminoácidos de PRO364 tiene 8 cisteínas en el CRD1 respecto las 5 cisteína en el CRD1 del GITR del ratón, y la presencia de un sitio potencial de N-glicosilación en el ECD en comparación con los 4 sitios potenciales de N-glicosilación del GITR del ratón.

Una revisión detallada de la secuencia de aminoácidos putativa del polipéptido PRO364 nativo de longitud completa, y de la secuencia de nucleótido que los codifica, evidencia una homología de secuencia con la proteína GITR de ratón (mGITR) descrita por Nocentini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:6216-6221 (1997). Por tanto, es posible que el PRO364 represente la contrapartida humana, u ortólogo, de la proteína GITR de ratón descrita por Nocentini *et al.*

Ejemplo 2

Aislamiento del PRO175 humano

Los procedimientos descritos en Klein *et al.*, *PNAS*, 93:7108-7113 (1996) se emplearon con las siguientes modificaciones. La transformación de levadura se realizó con cantidades limitantes de ADN transformante con objeto de reducir el número de células de levadura transformadas múltiples veces. En vez del aislamiento del plásmido a partir de la levadura, seguida por la transformación de *E. coli* tal como se describe en Klein *et al.*, ver más arriba, el análisis mediante la PCR se realizó sobre colonias de levadura únicas. Esto se consiguió sembrando con estrías la colonia original positiva en sacarosa sobre medio de sacarosa fresco para purificar el clon positivo. A continuación se usó una única colonia purificada para la PCR usando los siguientes cebadores:

TGTAACGACGGCCAGTTTCTCTCAGAGAAACAAGCAAAAC

(SEC. N° ID.: 15) y

CAGGAAACAGCTATGACCGAAGTGGACCAAAGGTCTATCGCTA

(SEC. N° ID.: 16).

Los cebadores de la PCR son bipartitos con objeto de amplificar el inserto y una pequeña porción del gen de la invertasa (permitiendo determinar que el inserto estaba en pauta con la invertasa) y para añadir sitio de cebadores de secuenciación universal.

Una biblioteca de fragmentos de ADNc, derivados de células HUVEC humanas, fusionados con la invertasa se transformaron en levadura, y los transformante se seleccionaron sobre medio SC-URA. URA y los transformantes se sembraron por réplica sobre medio de sacarosa con objeto de identificar los clones que secretaban invertasa. Los clones positivos se ensayaron de nuevo, y los productos de la PCR se secuenciaron. Se determinó que la secuencia de un clon, DNA1840, contenía una secuencia que codifica un péptido señal. Se diseñaron cebadores y sondas de oligonucleótidos usando la secuencia de nucleótidos del DNA1840. Si tituló una biblioteca de plásmidos de longitud completa de ADNc procedente de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), y aproximadamente 100.000 cfu se sembraron en 192 grupos de 500 cfu/grupo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Los grupos se dejaron crecer durante la noche a 37°C con agitación (200 rpm). Se realizó la PCR sobre los cultivos individuales usando los cebadores específicos para el DNA1840. Se realizó la electroforesis en gel de agarosa, y los pocillos positivos se identificaron mediante la visualización de una banda del tamaño esperado. Los clones positivos individuales se obtuvieron mediante "colony lift" seguida por hibridación con oligonucleótido marcado con ³²P. Estos clones se caracterizaron mediante la PCR, se digestión de restricción, y análisis de transferencia Southern.

Se secuenciación un clon de ANDc (DNA 119355) en su totalidad. En la Figura 5A-B (SEC. N° ID.: 13) se muestra una secuencia de nucleótidos de PRO175. El clon PRO175-1150 contiene un único marco de lectura abierto, con un sitio aparente de inicio de la traducción en las posiciones de nucleótidos 21-23 [Kozak *et al.*, ver más arriba] (Figura 5; SEC. N° ID.: 13). El precursor polipeptídico predicho tiene 177 aminoácidos de longitud y tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 20.308 dalton. El análisis de hidropatía sugiere una tipología de proteína transmembrana del Tipo 11, con una región citoplasmática putativa (aminoácidos 1-25), una región transmembrana (aminoácidos 26-51), y una región extracelular (aminoácidos 52-177). Se han identificado dos sitios potenciales de glicosilación vinculada a N en la posición 129 (Asn) y en la posición 161 (Asn) de la secuencia mostradas en la Figura 5 (SEC. N° ID.: 14). El clon PRO175-1150 se ha depositado en la ATCC, y tiene asignado el n° de depósito en la ATCC: 209466. El polipéptido PRO175 se obtiene o puede obtenerse expresando la molécula codificada por el inserto de ADNc del vector depositado como ATCC 209466. La digestión del vector con los enzimas de restricción XbaI y NotI rendirá un fragmento de 1411 p.b. y un fragmento de 668 p.b.

En base al análisis de alineamiento de secuencias con BLAST y FastA (usando el programa de ordenador ALIGN) de la secuencia extracelular, PRO175 muestra una identidad de secuencia de aminoácidos con varios miembros de la familia de citocinas del TNF, y particularmente con la Apo-2L humana (19,8%), el Fas/Apo1-ligando (19,0%), el TNF-alfa (20,6%) y la linfotoxina- α (17,5%). La mayoría de la identidad de secuencia de aminoácidos se halla en las regiones correspondientes a las hebras- β en la estructura del cristal de TNF-alfa [Banner *et al.*, *Cell*, 73:431-435 (1993); Eck *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 264:17595-605 (1989); Lewit-Bentley *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 199:389-92 (1988)]. La secuencia de la hebra C está especialmente conservada en todos los miembros de la familia. La secuencia entre el dominio transmembrana putativo y la primera hebra-beta del polipéptido PRO175 es relativamente corta, incluyendo 5 residuos, en comparación con los aproximadamente 30 a aproximadamente 80 residuos en TNF-alfa, CD95L o el ligando de Apo-2.

Ejemplo 3

Análisis de PRO175 por transferencia Northern

La expresión del ARNm de PRO175 en tejidos humanos y en líneas de células tumorales se examinó mediante análisis de transferencia Northern (ver la Figura 8). Las transferencias de ARN humano se hibridaron con una sonda de ADN marcada con ^{32}P , de aproximadamente 700 p.b. de longitud, generada mediante la digestión del plásmido pRK5, que codifica el ADNc de PRO175 de longitud completa, con XbaI; esta sonda corresponde a la secuencia codificante entera más algunas secuencias flanqueadoras 5' y 3'.

Se incubaron transferencias de ARNm fetal humano, adulto, o de línea celular cancerosa (Clontech) con la sonda de ADN en tampón de hibridación (5× SSPE; 2× solución de Denhardt; 100 mg/mL de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado; 50% de formamida; 2% de SDS), durante 60 horas a 42°C. Las transferencias se lavaron varias veces en 2× SSC:0,05% de SDS durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido por un lavado de 30 minutos en 0,1× SSC; 0,1% de SDS a 50°C. Las transferencias se desarrollaron después de la exposición durante la noche mediante análisis con PhosphorImager (Fuji).

Tal como se muestra en la Figura 8, se detectó un transcrito de ARNm predominante de aproximadamente 3,2 kb en el riñón y pulmón fetal, y en el intestino delgado adulto. También se detectó la expresión en 6 de las 8 líneas celulares tumorales humanas ensayadas, las cuales mostraron aproximadamente el mismo transcrito de 3,2 kb, así como la expresión más débil de los transcritos de aproximadamente 1,5 y aproximadamente 5 kb.

Los resultados indican que la expresión del ARNm del polipéptido PRO175 está relativamente restringida en tejidos normales, pero que es claramente elevada en líneas celulares tumorales de origen linfóide y no linfóide.

Ejemplo 4

Ensayos para detectar la expresión del ARNm de PRO364 en células y tejidos humanos

Se llevaron a cabo ensayos para examinar la expresión del ARNm de PRO364 en tejidos humanos normales y en líneas celulares de cáncer.

Se ensayaron varios tejidos humanos y líneas celulares cancerosas (Clontech) mediante hibridación de la transferencia Northern para detectar transcritos de PRO364, pero no se detectó ninguno. Usando la PCR cuantitativa con transcriptasa inversa, se detectó ARNm de PRO364 en PBL, cerebro, médula ósea, bazo, timo y pulmón, y, a niveles relativamente inferiores, en riñón, corazón, intestino delgado y tejidos hepáticos (ver Figura 6). Los niveles relativos de expresión del ARNm se determinaron mediante PCR cuantitativa usando un instrumento Taqman (ABI), esencialmente tal como se describe en Heid *et al.*, *Genome Res.*, 6:986-94 (1996), usando cebadores y sondas fluorogénicas específicas del PRO364:

DNA47365.tm.f -

CCACTGAAACCTTGGACAGA

(SEC. N° ID.: 17)

DNA47365.tm.p -

CCCAGTTCGGGTTTCTCACTGTGTTC

5 (SEC. Nº ID.: 18)

DNA47365.tm.r -

10 ACAGCGTTGTGGGTCTTGTTTC

(SEC. Nº ID.: 19)

15 La autenticidad del producto de la PCR se confirmó mediante hibridación de la transferencia Southern con el ADNc correspondiente. Los niveles de expresión se normalizaron respecto el tejido del intestino delgado.

En un ensayo aparte, células T humanas primarias (aisladas a partir de sangre entera de un donante usando una columna de enriquecimiento en células T (R & D Systems)) y monocitos/macrófagos (aislados a partir de sangre entera de un donante mediante adherencia a frascos de cultivo de células) se mantuvieron en RPMI suplementado con 10% de FBS y glutamina 2 mM. Las células se trataron a continuación durante 24 horas con PHA (1 microgramo/ml; Sigma), anticuerpo anti-CD3 (1 microgramo/ml; Pharmingen), LPS (1 microgramo/ml; Sigma), TNF-alfa (1 microgramo/ml; preparados esencialmente tal como se describe en Pennica *et al.*, *Nature*, 312:724-729 (1984)), o el ligando PRO175 soluble (5 microgramos/ml). Los niveles relativos de expresión del ARNm se analizaron a continuación mediante el procedimiento Taqman descrito más arriba. Los niveles de expresión se normalizaron respecto a células T tratadas con tampón.

Los resultados se muestran en la Figura 7. Se observó una regulación sustancial del ARNm de PRO364 al alza en células T de sangre periférica aisladas, después de la estimulación con fitohemaglutinina (PHA) o con anticuerpo anti-CD3. Se observaron niveles de expresión elevados en monocitos/macrófagos aislados, y esta expresión se incrementó adicionalmente mediante LPS. (Ver Figura 7).

Ejemplo 5

35 *Expresión de PRO175 en E. coli*

La secuencia de ADN (Figura 5A-B; SEC. Nº ID.: 13) que codifica una región extracelular del polipéptido PRO175 (aminoácidos 52 a 177 de la Figura 5; SEC. Nº ID.: 14) se amplificó con cebadores de la PCR que contenían respectivamente sitios de restricción NdeI y XbaI flanqueadores: hacia adelante: 5'-GAC GAC AAG CAT ATG TTA GAG ACT GCT AAG GAG CCC TG-3' (SEC. Nº ID.: 20); hacia atrás: 5'-TAG CAG CCG GAT CCT AGG AGA TGA ATT GGG GATT-3' (SEC. Nº ID.: 21). La PCR se digirió y clonó en los sitios NdeI y XbaI del plásmido pET19B (Novagen), cadena abajo y en pauta de lectura con una secuencia Met Gly His₁₀ seguida por un sitio de corte de 12 aminoácidos para enteroquinasa (derivado del plásmido): Met Gly His His His His His His His His Ser Ser Gly His Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met (SEC. Nº ID.: 22).

45 El plásmido resultante se usó para transformar la cepa de *E. coli* JM109 (ATCC 53323) usando los procedimientos descritos en Sambrook *et al.*, ver más arriba. Los transformantes se identificaron mediante la PCR. Se aisló el ADN del plásmido y se confirmó mediante análisis de restricción y secuenciación del ADN.

50 Los clones seleccionados se cultivaron durante la noche en medio de cultivo líquido LB suplementado con antibióticos. El cultivo nocturno se usó subsiguientemente para inocular un cultivo a mayor escala. Las células se dejaron crecer hasta una densidad óptica deseada, durante el crecimiento el promotor de la expresión está activado.

Después de cultivar las células durante varias horas más, las células pueden ser recolectadas mediante centrifugación. El precipitado de células obtenido mediante la centrifugación se solubilizó, usando un microfluidizador, en un tampón que contenía Tris 0,1 M, NaCl 0,2 M, EDTA 50 mM, pH 8,0. La proteína PRO175 solubilizada se purificó usando cromatografía de afinidad con níquel-Sepharose.

La proteína PRO175 se analizó mediante SDS-PAGE, seguida por transferencia Western con peroxidasa de rábano silvestre conjugada con níquel, seguida por detección ECL (Boehringer Mannheim). Se detectaron tres bandas de proteína predominantes, las cuales corresponden en tamaño a las formas monoméricas, homodimérica y homotrimérica de la proteína (Figura 9). En base a este resultado, se cree que, en su forma nativa, en ausencia de desnaturalización por SDS, la proteína PRO175 soluble es capaz de formar homotrímeros.

65

Ejemplo 6

Especificidad de unión de PRO175 por el receptor de PRO364

5 Se realizaron ensayos para determinar si el polipéptido PRO175 (descrito en los EJEMPLOS 2, 3 y 5 anteriores) interactúa y se une específicamente con PRO364, el cual se cree que es un ortólogo humano del polipéptido GITR murino (mGITR) descrito en Nocentini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:6216-6221 (1997).

10 Para ensayar la unión, se expresó en células de insecto una proteína de fusión soluble de inmunoglobulina (inmunoadhesina) que incluía un dominio extracelular PRO364 (ver los aminoácidos 1-161 de la Figura 2, SEC. N° ID.:3). El ECD de PRO364 se expresó como una forma marcada extremo C-terminal de IgG-Fc en células de insecto usando Baculovirus. Se preparó un polipéptido PRO175 soluble expresando un ECD tal como se describió más arriba en el Ejemplo 5.

15 La molécula del ECD de PRO175 se marcó con ¹²⁵I para ensayar su capacidad para interactuar con la inmunoadhesina de PRO364. Para comparación, también se construyeron construcciones de inmunoadhesina de los siguientes miembros de la familia del receptor TNF: CD95, DR4, DR5, TNFR1, TNFR2, y Apo-3. Las inmunoadhesinas de CD95, DR4, DR5, TNFR1, TNFR2, y Apo-3 se prepararon fusionando cada ECD del receptor a la bisagra y porción Fc de la IgG humana, tal como se describió previamente para el TNFR1 [Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:10535-10539 (1991)]. Los respectivos miembros de la familia del receptor se describen (y se citan las referencias relevantes) en la sección "Antecedentes de la Invención".

20 Para el ensayo de coprecipitación, se incubó cada inmunoadhesina (5 microgramos) con polipéptido PRO175 soluble marcado con ¹²⁵I (1 microgramo), durante 1 hora a 24°C, seguido por proteína A-Sepharose durante 30 minutos sobre hielo. La mezcla de centrifugación se precipitó mediante centrifugación y se lavó varias veces en PBS, se hirvió en tampón de SDS-PAGE que contenía ditiotretol 20 mM, y a continuación se resolvió mediante SDS-PAGE y autorradiografía.

30 Los resultados se muestran en la Figura 9. La posición de los marcadores de peso molecular (kDa) se indica en la figura. El PRO364-IgG se unió al polipéptido PRO175 soluble radiyodado. Sin embargo, el PRO364-IgG no se unió a las construcciones de inmunoadhesina de CD95, DR4, DR5, TNFR1, TNFR2, o Apo-3.

35 En otro ensayo, se transfectaron transitoriamente células 293 humanas con PRO175 de longitud completa, y se determinó mediante análisis FACS la capacidad de las construcciones receptor-inmunoadhesina de PRO364, TNFR1, HVEM, y DcR1, para unirse a esas células transfectadas. Las células 293 se mantuvieron en medio DMEM con glucosa elevada, suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), glutamina 2 mM, 100 microgramos/ml de penicilina, y 100 microgramos/ml de estreptomycin. Las células transfectadas (1×10^5) se incubaron durante 60 minutos a 4°C en 200 microlitros de 2% FBS/PBS con 1 microgramo de las respectivas inmunoadhesinas de receptor o ligando. Las células se lavaron a continuación con 2% FBS/PBS, se tiñeron con anticuerpo de cabra anti-humano conjugado con R-ficoeritrina (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). A continuación, se analizaron las células mediante FACS. Para ensayar la unión de las respectivas inmunoadhesinas a las células transitoriamente transfectadas, se transfectó un vector de expresión (pRK5-CD4; Smith *et al.*, *Science*, 328:1704-1707 (1987)) para el CD4 con el vector de expresión de PRO175 (ver más arriba). A continuación se usó anti-CD4 conjugado con FITS (Pharmingen, San Diego, CA) para identificar y captar la población de células transfectadas en el análisis FACS.

45 Tal como se muestra en la Figura 11A, el PRO364-IgG se unió específicamente a la superficie de las células transfectadas con el plásmido de expresión que codificaba el PRO175 de longitud completa. No se observó tal unión para las inmunoadhesinas de TNFR1, HVEM o DcR1. El PRO364-IgG no se unió a las células transfectadas con un plásmido control (no se muestran los datos).

50 Los resultados demuestran una interacción específica del polipéptido PRO175 con el PRO364, y que el polipéptido PRO175 no interactúa con cualquiera de los otros miembros ensayados de la familia del receptor de TNF.

55 El polipéptido PRO175 se identificó en una biblioteca de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), y los transcritos del polipéptido PRO175 son fácilmente detectables en HUVEC mediante RT-PCR (no se muestran los datos). Se realizó un ensayo de análisis FACS para examinar si podía demostrarse la unión específica de PRO364-IgG con HUVEC mediante análisis FACS. Las HUVEC se compraron a Cell Systems (Kirkland, WA) y se cultivaron en un medio 50:50 mezcla de Ham's F12 y DMEM bajo en glucosa, que contenía un 10% de suero fetal bovino, L-glutamina 2 mM, Hepes 10 mM, y 10 ng/ml de FGF básico. Las células se clasificaron mediante FACS con PBS, PRO364-IgG, TNFR1-IgG o Fas-IgG como un anticuerpo primario y con F(ab')₂ de cabra anti-humano conjugado a ficoeritrina (CalTag, Burlingame, CA).

60 Se halló que PRO364-IgG se unía específicamente a HUVEC (ver Figura 11B). Ni la Fas-IgG ni la TNFR1-IgG mostraron unión específica a las células endoteliales.

65

Ejemplo 7

Mapeado cromosómico

La ubicación cromosómica del gen PRO175 humano se examinó mediante análisis de un conjunto de radiación híbrido (HR). El mapeado mediante RH se realizó con la PCR usando un conjunto híbrido de radiación celular ratón-humano (Research Genetics) y cebadores basados en la región codificante del ADNc de PRO175 [Gelb *et al.*, *Hum. Genet.*, 98:141 (1996)]. El análisis de los datos de la PCR usando la Stanford Human Genome Center Database indicó que PRO175 está unido al marcador de STS D1S2790 y al marcador de Genethon AFMb352xe9, y que se mapea sobre el cromosoma 1q23 humano. De forma notable, CD95L también se mapea sobre el cromosoma 1q23 [Takahashi *et al.*, *Int. Immunol.*, 6:1567-1574 (1994), mientras que el ligando OX40 se mapea sobre el cromosoma 1q25 [Baum *et al.*, *EMBO J.*, 13:3992-4001 (1994)]. En consecuencia, estos miembros de la familia del TNF pueden haber surgido por duplicación y divergencia de un gen ancestral común.

Ejemplo 8

Inducción de c-fos en células endoteliales

Este ensayo se realizó para determinar si PRO364 (GITR humano) mostraba la capacidad de inducir c-fos en células endoteliales.

Se sembraron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, Cell Systems) en medio de cultivo (50% de Ham's F12 sin GHT:bajo en glucosa, y 50% de DMEM sin glicina:con NaHCO_3 , 1% de glutamina, HEPES 10 mM, 10% de FBS, 10 ng/ml de β -FGF) en placas de microvaloración de 96 pocillos, a una densidad celular de 1×10^4 células/pocillo. El día siguiente a la siembra, las células se privaron de nutrientes retirando el medio de cultivo y añadiendo 100 μl /pocillo de medio de cultivo sin suero (medio de cultivo sin FBS o bFGF). Transcurridas 24 horas, se retiró el medio libre de suero. Las células se trataron con 100 μl /pocillo de muestras de ensayo y controles (control positivo: medio de cultivo; control negativo: HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, 4% (p/v) de manitol, pH 6.8). Las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C, en 5% de CO_2 . Se retiraron las muestras, y se siguió la primera parte del protocolo del equipo de β ADN (Chiron Diagnostics, cat. #6005-037), en donde cada reactivo/tampón listado en mayúsculas más abajo está disponible en el equipo.

En resumen, las cantidades de Tampón de Lisis TM y de Sondas necesarias para los ensayos se calcularon en base a la información proporcionada por el fabricante. Se añadieron al Tampón de Lisis TM las cantidades apropiadas de Sondas descongeladas. El Tampón de Hibridación de Captura se calentó hasta temperatura ambiente. Las tiras de β -ADN se prepararon sobre soportes de tiras metálicos, y se añadieron 100 μl de Tampón de Hibridación de Captura a cada pocillo de β -ADN necesario, seguido por la incubación durante al menos 30 minutos. Las placas de ensayo con las células se retiraron del incubador, y el medio se retiró delicadamente usando el colector de vacío. Rápidamente se pipetearon 100 μl de Tampón de Hibridación de Lisis con Sondas en cada pocillo de las placas de microvaloración. Las placas se incubaron a continuación a 55°C durante 15 minutos. Después de retirarlas del incubador, las placas se colocaron sobre un agitador de vórtice con el cabezal adaptador de placas de microvaloración, y se agitaron con el regulador en la posición #2 durante un minuto. Se retiraron 80 μl del lisado, y se añadieron a los pocillos de β ADN que contenían el Tampón de Hibridación de Captura, y se pipetearon arriba y abajo para mezclarlos. Las placas se incubaron a 53°C durante al menos 16 horas.

Al día siguiente, se siguió la segunda parte del protocolo del equipo de β ADN. Específicamente, se retiraron las placas del incubador y se colocaron sobre la mesa de laboratorio, para enfriarlas, durante 10 minutos. Los volúmenes de las adiciones necesarias se calcularon en base a la información proporcionada por el fabricante. Se preparó una Solución de Trabajo Amplificadora preparando una dilución 1:100 del Concentrado Amplificador (20 fm/ μl) en Tampón de Hibridación AL. Se retiró la mezcla de hibridación de las placas y se lavaron dos veces con Lavado A. Se añadieron 50 μl de Solución de Trabajo Amplificador a cada pocillo, y los pocillos se incubaron a 53°C durante 30 minutos. A continuación se retiraron las placas del incubador y se dejaron enfriar durante 10 minutos. La Solución de Trabajo de Sonda Marcadora se preparó haciendo una dilución 1:100 del Concentrado de Marcado (40 $\mu\text{moles}/\mu\text{l}$) en Tampón de Hibridación AL. Después del período de enfriamiento de 10 minutos, se retiró la mezcla de hibridación amplificadora y se lavaron las placas dos veces con Lavado A. Se añadieron 50 μl de Solución de Trabajo de Sonda Marcadora a cada pocillo, y se incubaron los pocillos a 53°C durante 15 minutos. La Solución de Sustrato se preparó haciendo una dilución 1:100 del Potenciador de Sustrato en Tampón de Sustrato. Se dejaron enfriar las placas durante 10 minutos, se eliminó la mezcla de hibridación, y se lavaron dos veces las placas con Lavado A y tres veces con Lavado D. Se añadieron 50 μl de la Solución de Sustrato con Potenciador a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 30 minutos a 37°C y se leyó la RLU en un luminómetro apropiado.

Los replicados se promediaron y se determinó el coeficiente de variación. La medición de la actividad como el número de veces de incremento respecto el valor del control negativo (tampón HEPES descrito más arriba) se indicó mediante unidades de quimioluminiscencia (RLU). Las muestras que presentaban un valor de al menos dos veces por encima del valor del control negativo se consideraron positivas.

ES 2 295 040 T3

Resultados del ensayo de PRO364:

1. Control negativo = 2,57 RLU

Control positivo = 29,57 RLU

PRO364 al 0,01% = 8,60 RLU

PRO364 al 0,1% = 9,66 RLU

PRO364 al 1% = 3,44 RLU

2. Control negativo = 3,19 RLU

Control positivo = 18,22 RLU

PRO364 al 0,01% = 3,51 RLU

PRO364 al 0,1% = 4,54 RLU

PRO364 al 1% = 6,98 RLU

Tal como se muestra más arriba, el PRO364 dio dos veces positivo en el ensayo, indicando su capacidad para inducir la expresión de c-fos en células endoteliales.

Ejemplo 9

Este ensayo se realizó para determinar si PRO175 (hGLITTER) mostraba la capacidad de inducir c-fos en pericitos.

El día 1, se recibieron 4 frascos de cultivo de tejidos T-25 de pericitos bovinos (VEC Technologies) en medio de cultivo. Excepto 5 ml, el resto de medio se eliminó, y los frascos se colocaron en un incubador a 37°C en 5% de CO₂. El día 2, los pericitos se tripsinizaron, se centrifugaron, se resuspendieron en medio de cultivo (DMEM bajo en glucosa con 20% de FBS, 1× penicilina y estreptomina, y 1× fungizona), y se sembraron sobre placas de microvaloración de 96 pocillos. El día 7, se retiró el medio, y los pericitos se trataron con 100 µl de las muestras de ensayo y controles (diluyente del ensayo: DMEM + 5% de FBS; control positivo: DMEM + 5% de suero ± PDGF@50 ng/ml; control negativo: proteína 32). Las células se incubaron durante 30 minutos en 5% de CO₂. Las muestras se eliminaron, y se siguió la primera parte del protocolo del Equipo del βADN (Chiron).

Se añadieron sondas para c-fos al Tampón de Lisis incluido en el Equipo de βADN. Después de la incubación de 30 minutos, se aspiró el medio de las células y se añadieron a cada pocillo 100 µl de Tampón de Lisis conteniendo las sondas c-fos. Las placas se incubaron a continuación durante 15 minutos a 55°C. Durante este tiempo, se añadieron 100 µl del Tampón de Hibridación de Captura, incluido en el Equipo, a la Placa de βADN. Al final de los 15 minutos, se retiraron las células del incubador, y se agitaron con vórtice en un agitador de placas de microvaloración durante 1 minuto. Se retiraron 85 µl del lisado de células, y se añadieron a 100 µl de Tampón de Hibridación de Captura en la Placa de βADN. Las placas se incubaron entonces a 53°C durante al menos 16 horas.

Al día siguiente, se siguió la segunda parte del protocolo del Equipo βADN. Se eliminaron todos los reactivos del equipo y se dejó que alcanzara la temperatura ambiente. Se retiraron las placas del incubador y se colocaron sobre la mesa de laboratorio para que se enfriaran durante 10 minutos. El Amplificador se diluyó 1:100 en Diluyente de Amplificador/Sonda Marcada. Transcurridos 10 minutos, se aspiró la mezcla de hibridación de las placas, y se lavaron los pocillos dos veces con Tampón de Lavado A. Se añadieron 50 µl de amplificador diluido a cada uno de los pocillos, y se incubaron las placas durante 30 minutos a 53°C. A continuación se retiraron las placas del incubador y se dejaron enfriar durante 10 minutos. La Sonda Marcada se diluyó 1:100 en Diluyente de Amplificador/Sonda Marcada. Transcurridos 10 minutos, se aspiró el amplificador, y las placas se lavaron de nuevo dos veces con Tampón de Lavado A. Se añadieron 50 µl de la Sonda Marcada a cada uno de los pocillos, y se incubaron las placas durante 15 minutos a 53°C. A continuación se retiraron las placas del incubador y se dejaron enfriar durante 10 minutos. En este instante, se preparó la solución de sustrato añadiendo 3 µl de Potenciador de Sustrato a cada ml de Sustrato necesario para este ensayo. La mezcla de la sonda marcada se aspiró a continuación de los pocillos, y se lavaron las placas dos veces con Tampón de Lavado A, y tres veces con Tampón de Lavado B. Se añadieron 50 µl de solución de sustrato a cada pocillo, y se incubaron las placas a 37°C durante 30 minutos. A continuación se leyó la quimioluminiscencia de las placas usando un luminómetro.

Los replicados se promediaron y se determinó la desviación estándar/coeficiente de variación. La medición de la actividad como el número de veces de incremento respecto el valor del control negativo (Proteína 32) se indicó mediante unidades de quimioluminiscencia (RLU). Las muestras que presentaban al menos un valor dos veces por encima del valor del control negativo se consideraron positivas. Los resultados de estos análisis se muestran en la Figura 12.

Tal como se muestra en la Figura 12. PRO175 dio positivo en los ensayos de inducción de la expresión de c-fos en pericitos bovinos.

Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia USA (ATCC):

Material	Nº dep. ATCC	Fecha del depósito
DNA47365-1206	ATCC 209436	7 de noviembre de 1997
DNA19355-1150	ATCC 209466	7 de noviembre de 1997

Este depósito se hace bajo las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes, y las Regulaciones bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito se hará asequible por parte de la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sometido a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que asegura una disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito al público a partir de la concesión de la pertinente patente estadounidense o a partir de la exposición al público de cualquier solicitud de patente estadounidense o de país extranjero, cualquiera que suceda primero, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por el U.S. Commissioner of Patents and Trademarks como con derecho a la misma de acuerdo con los artículos 35 y 112 de la USC y las normas del Commissioner en relación a lo mismo (incluyendo el 37 CFR 1.14, con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente aplicación ha aceptado que, si un cultivo de los materiales en depósito muriese o se perdiera o fuera destruido cuando se cultiva en condiciones apropiadas, los materiales serán remplazados con prontitud, a partir de la notificación, con otros del mismo tipo. La disponibilidad del material de depósito no debe considerarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

La memoria escrita precedente se considera que es suficiente para permitir que un especialista en el campo practique la invención. La presente invención no debe limitarse en su ámbito por la construcción o construcciones depositadas, puesto que la realización o realizaciones depositadas se pretende que sean una sencilla ilustración de ciertos aspectos de la invención, y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente se halla dentro del ámbito de esta invención. El material o materiales depositados de la presente invención no constituye una aceptación de que la descripción escrita en la presente invención es inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe considerarse como limitante del ámbito de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que éste representa.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante sólo es para provecho del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha tenido sumo cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones, y la EPO rechaza cualquier responsabilidad en este aspecto.

Documentos de patentes citados en la descripción

- US 5573762 A [0009]
- US 5624806 A [0014]
- US 5661122 A [0014]
- US 5610134 A [0014]
- WO 9528173 A [0014]
- US 5773414 A [0015] [0169]
- JP 31302991991 B [0015]
- EP 457195 A [0015]
- EP 460679 A [0015]
- EP 552489 A [0015]

ES 2 295 040 T3

- US 5773223 A [0015] [0172]
- EP 471754 B [0020]
- 5 • EP 370989 A [0021]
- EP 817648 A [0027]
- US 9806724 W [0027]
- 10 • WO 9617931 A [0029]
- WO 9701633 A [0032]
- 15 • WO 9725428 A [0032]
- EP 417563 A [0033]
- US 5650282 A [0074]
- 20 • US 4675187 A [0079]
- WO 9101753 A [0080] [0339]
- 25 • WO 8906692 A [0080]
- WO 9222653 A [0080]
- US 4816567 A [0116] [0117] [0312] [0312] [0316]
- 30 • EP 404097 A [0120]
- WO 9311161 A [0120]
- 35 • US 4275149 A [0123]
- US 5364934 A [0134]
- WO 8705330 A [0141]
- 40 • US 4640835 A [0143]
- US 4496689 A [0143]
- 45 • US 4301144 A [0143]
- US 4670417 A [0143]
- US 4791192 A [0143]
- 50 • US 4179337 A [0143]
- WO 9410308 A [0146]
- 55 • WO 8905859 A [0148]
- US 4399216 A [0148]
- US 5010182 A [0153]
- 60 • EP 362179 A [0153]
- WO 9013646 A [0153]
- 65 • EP 36776 A [0157]
- EP 73657 A [0159]

ES 2 295 040 T3

- GB 2211504 A [0160]
- EP 117060 A [0163]
- 5 • EP 117058 A [0163]
- WO 9516035 A [0170]
- WO 9505846 A [0170]
- 10 • WO 9107491 A [0170]
- US 5773415 A [0176] [0297]
- 15 • WO 9733551 A [0177] [0239] [0240]
- US 4873191 A [0187]
- US 4736866 A [0187]
- 20 • US 4376110 A [0200]
- US 4892538 A [0206]
- 25 • US 5283187 A [0206]
- WO 9325673 A [0209]
- US 5681746 A [0210]
- 30 • EP 257956 A [0277] [0281]
- US 3773919 A [0282] [0334]
- 35 • EP 58481 A [0282]
- EP 133988 A [0282]
- DE 3218121 [0284]
- 40 • EP 52322 A [0284]
- EP 36676 A [0284]
- 45 • EP 88046 A [0284]
- EP 143949 A [0284]
- EP 142641 A [0284]
- 50 • JP 58118008 A [0284]
- US 4485045 A [0284] [0327]
- 55 • US 4544545 A [0284] [0327]
- EP 102324 A [0284]
- US 5679545 A [0297]
- 60 • US 5545807 A [0317]
- US 5545806 A [0317]
- 65 • US 5569825 A [0317]
- US 5625126 A [0317]

- US 5633425 A [0317]
- US 5661016 A [0317]
- 5 • WO 9308829 A [0319]
- US 4676980 A [0321] [0321]
- WO 9100360 A [0321]
- 10 • WO 92200373 A [0321]
- EP 03089 A [0321]
- 15 • WO 9411026 A [0325]
- US 5013556 A [0327]
- EP 616812 A [0337]
- 20

Literatura, que no son patentes, citada en la descripción

- **EICHHORN**. *American Journal of Medicine*, 1998, vol. 104, 163-169 [0004]
- 25 • **BROWN; VAUGHAN**. *Circulation*, 1998, vol. 97, 1411-1420 [0004]
- **WEBER**. *Circulation*, 1998, vol. 96, 4065-4082 [0004]
- **MORGAN; BAKER**. *Circulation*, 1991, vol. 83, 13-25 [0005]
- 30 • Heart Failure. **KATZ**. *Physiology of the Heart*. *Raven Press*, 1992, 638-668 [0007]
- **KATZ**. *Trends Cardiovasc. Med.*, 1995, vol. 5, 37-44 [0007]
- 35 • Pathophysiology of Heart Failure. *Heart Disease*. A Textbook of Cardiovascular Medicine. W.B. Saunders Co, 1988 [0007]
- **CHIEN et al.** *FASEB J.*, 1991, vol. 5, 3037-3046 [0008]
- 40 • **CHIEN et al.** *Annu. Rev. Physiol.*, 1993, vol. 55, 77-95 [0008]
- **CASPARI et al.** *Cardiovasc. Res.*, 1977, vol. 11, 554-558 [0008]
- **SCHWARZ et al.** *Am. J. Cardiol.*, 1978, vol. 42, 895-903 [0008]
- 45 • **HESS et al.** *Circulation*, 1981, vol. 63, 360-371 [0008]
- **PEARLMAN et al.** *Lab. Invest.*, 1982, vol. 46, 158-164 [0008]
- 50 • **METCALF**. *Growth Factors*, 1992, vol. 7, 169-173 [0009]
- **KURZROCK et al.** *Endocrine Reviews*, 1991, vol. 12, 208-217 [0009]
- **INOUE et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 2863-2867 [0009]
- 55 • **YANAGISAWA; MASAKI**. *Trends Pharm. Sci.*, 1989, vol. 10, 374-378 [0009]
- **PENNICA et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, 1142-1146 [0009]
- 60 • **THOMPSON et al.** *Br. Heart J.*, 1980, vol. 44, 488-98 [0010]
- **HARRISON et al.** *Circulation*, 1964, vol. 29, 84-98 [0010]
- **BONOW et al.** *Circulation*, 1985, vol. 72, 853-64 [0010]
- 65 • **LORELL et al.** *Circulation*, 1982, vol. 65, 499-507 [0011]
- **BETOCCHI et al.** *Am. J. Cardiol.*, 1996, vol. 78, 451-457 [0011]

- **POLLOCK**. *N. Engl. J. Med.*, 1982, vol. 307, 997-999 [0011]
- **WIGLE et al.** *Circulation*, 1995, vol. 92, 1680-1692 [0011] [0073]
- 5 • **SZLACHCIC et al.** *Am. J. Cardiol.*, 1989, vol. 63, 198-201 [0013]
- **SHAHI et al.** *Lancet*, 1990, vol. 336, 458-461 [0013]
- 10 • **ROSSI et al.** *Am. Heart J.*, 1992, vol. 124, 700-709 [0013] [0175]
- **MASSIE**. *Curr. Op. in Cardiology*, 1997, vol. 12, 209-217 [0014]
- **REDDY et al.** *Curr. Opin. Cardiol.*, 1997, vol. 12, 233-241 [0014]
- 15 • **YANAGISAWA et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 411-415 [0015]
- **KRAMER et al.** *Circulation*, 1983, vol. 67 (4), 807-816 [0016]
- Captopril Multicenter Research Group. *J.A.C.C.*, 1983, vol. 2 (4), 755-763 [0016]
- 20 • The CONSENSUS Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 1987, vol. 316 (23), 1429-1435 [0016]
- The SOLVD Investigators. *Engl. J. Med.*, 1991, vol. 325 (5), 293-302 [0016]
- 25 • The CONSENSUS Trial Study Group. *N. Engl. J. Med.*, 1987, vol. 316 (23), 1429-1435 [0017]
- The SOLVD Investigators. *N. Engl. J. Med.*, 1991, vol. 325 (5), 293-302 [0017]
- **COHN et al.** *N. Engl. J. Med.*, 1991, vol. 325 (5), 303-310 [0017]
- 30 • The Captopril-Digoxin Multicenter Research Group. *JAMA*, 1988, vol. 259 (4), 539-544 [0017]
- **HARADA et al.** *Circulation*, 1998, vol. 97, 1952-1959 [0018]
- 35 • **HOMEY**. *Circulation*, 1998, vol. 97, 1890-1892 [0018]
- **TOPOL et al.** *Am. J. Cardiol.*, 1988, vol. 61, 723-728 [0019]
- **NEUHAUS et al.** *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1988, vol. 12, 581-587 [0019]
- 40 • **NEUHAUS et al.** *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1989, vol. 14, 1566-1569 [0019]
- **TOPOL**. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1990, vol. 15, 922-924 [0019]
- 45 • **TEBBE et al.** *Am. J. Cardiol.*, 1989, vol. 64, 448-453 [0019]
- **KEYT et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 3670-3674 [0019] [0085]
- **BURGESS ; MACIAG**. *Annual Rev. Biochem.*, 1989, vol. 58, 575 [0020]
- 50 • **ISHIKAWA et al.** *Nature*, 1989, vol. 338, 557 [0020]
- **LEUNG et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1306 [0020]
- 55 • **FERRARA; HENZEL**. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 161, 851 [0020]
- **TISCHER et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1989, vol. 165, 1198 [0020]
- **HOUCK et al.** *Mol. Endocrin.*, 1991, vol. 5, 1806 [0021]
- 60 • **FERRARA et al.** *J. Cell. Biochem.*, 1991, vol. 47 [0021]
- **FERRARA et al.** *Endocrine Reviews*, 1992, vol. 13, 18 [0021]
- 65 • **KECK et al.** *Science*, 1989, vol. 246, 1309 [0021]
- **CONNOLLY et al.** *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 20017 [0021]

ES 2 295 040 T3

- **FOLKMAN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 10931-10934 [0022]
- **KLAGSBRUN** *et al. Annu. Rev. Physiol.*, 1991, vol. 53, 217-239 [0022]
- 5 • Vascular diseases. **GARNER A.** Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach. *Marcel Dekker*, 1994, 1625-1710 [0022]
- **FOLKMAN** *et al. Nature*, 1989, vol. 339, 58 [0023]
- 10 • **WEIDNER** *et al. N Engl J Med*, 1991, vol. 324, 1-6 [0023]
- **HORAK** *et al. Lancet*, 1992, vol. 340, 1120-1124 [0023]
- **MACCHIARINI** *et al. Lancet*, 1992, vol. 340, 145-146 [0023]
- 15 • **GOOD** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1990, vol. 87, 6624-6628 [0024]
- **CLAPP** *et al. Endocrinology*, 1993, vol. 133, 1292-1299 [0024]
- 20 • **O'REILLY** *et al. Cell*, 1994, vol. 79, 315-328 [0024]
- **O'REILLY** *et al. Cell*, 1996, vol. 88, 277-285 [0024]
- **FERRARA** *et al. Endocr. Rev.*, 1997, vol. 18, 4-25 [0025]
- 25 • **BERKMAN** *et al. J Clin Invest*, 1993, vol. 91, 153-159 [0025]
- **BROWN** *et al. Human Pathol.*, 1995, vol. 26, 86-91 [0025]
- 30 • **BROWN** *et al. Cancer Res.*, 1993, vol. 53, 4727-4735 [0025]
- **MATTERN** *et al. Brit. J. Cancer*, 1996, vol. 73, 931-934 [0025]
- **DVORAK** *et al. Am J. Pathol.*, 1995, vol. 146, 1029-1039 [0025]
- 35 • **AIELLO** *et al. N. Eng. J. Med.*, 1994, vol. 331, 1480-1487 [0026]
- **LOPEZ** *et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1996, vol. 37, 855-868 [0026]
- 40 • **KIM** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 841-844 [0027]
- **WARREN** *et al. J. Clin. Invest.*, 1995, vol. 95, 1789-1797 [0027]
- **BORGSTRÖM** *et al. Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 4032-4039 [0027]
- 45 • **MELNYK** *et al. Cancer Res.*, 1996, vol. 56, 921-924 [0027]
- **ADAMIS** *et al. Arch. Ophthalmol.*, 1996, vol. 114, 66-71 [0027]
- 50 • **LAU; NATHANS.** *Molecular Aspects. of Cellular Regulation*, 1991, vol. 6, 165-202 [0028]
- **RYSECK** *et al. Cell Growth Differ.*, 1991, vol. 2, 235-233 [0028] [0029]
- 55 • **SIMMONS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 1178-1182 [0029]
- **O'BRIEN** *et al. Mol. Cell Biol.*, 1990, vol. 10, 3569-3577 [0029]
- **BRADHAM** *et al. J. Cell. Biol.*, 1991, vol. 114, 1285-1294 [0029]
- 60 • **JOLOIT** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1992, vol. 12, 10-21 [0029]
- **CLEMMONS** *et al. J. Clin. Invest.*, 1986, vol. 77, 1548 [0031]
- **ZAPF** *et al. J. Clin. Invest.*, 1979, vol. 63, 1077 [0031]
- 65 • **GRUSS; DOWER.** *Blood*, 1995, vol. 85, 3378-3404 [0032]

- **PITTI** *et al. J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271, 12687-12690 [0032]
- **WILEY** *et al. Immunity*, 1995, vol. 3, 673-682 [0032]
- 5 • **BROWNING** *et al. Cell*, 1993, vol. 72, 847-856 [0032]
- **ARMITAGE** *et al. Nature*, 1992, vol. 357, 80-82 [0032]
- **HOHMAN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 14927-14934 [0033]
- 10 • **BROCKHAUS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, vol. 87, 3127-3131 [0033]
- **LOETSCHER** *et al. Cell*, 1990, vol. 61, 351 [0033]
- 15 • **SCHALL** *et al. Cell*, 1990, vol. 61, 361 [0033]
- **SMITH** *et al. Science*, 1990, vol. 248, 1019-1023 [0033]
- **LEWIS** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, vol. 88, 2830-2834 [0033]
- 20 • **GOODWIN** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1991, vol. 11, 3020-3026 [0033]
- **TAKAO** *et al. Immunogenetics*, 1993, vol. 37, 199-203 [0033]
- 25 • **NOPHAR, Y.** *et al. EMBO J.*, 1990, vol. 9, 3269 [0033]
- **KOHNO, T.** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1990, vol. 87 [0033]
- **HALE** *et al. J. Cell. Biochem. Supplement 15F*, 1991, 113 [0033]
- 30 • **BANNER** *et al. Cell*, 1993, vol. 73, 431-435 [0034] [0363]
- **JOHNSON** *et al. Cell*, 1986, vol. 47, 545 [0035]
- 35 • **RADEKE** *et al. Nature*, 1987, vol. 325, 593 [0035]
- **STAMENKOVIC** *et al. EMBO J.*, 1989, vol. 8, 1403 [0035]
- **MALLET** *et al. EMBO J.*, 1990, vol. 9, 1063 [0035]
- 40 • **ITO** *et al. Cell*, 1991, vol. 66, 233-243 [0035]
- **UPTON** *et al. Virology*, 1987, vol. 160, 20-29 [0035]
- 45 • **SMITH** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1991, vol. 176 [0035]
- **UPTON** *et al. Virology*, 1991, vol. 184, 370 [0035]
- **WELCHER, A.A.** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 159-163 [0035]
- 50 • **YAN, H.; CHAO, M.V.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 12099-12104 [0035]
- **PEETRE, C.** *et al. Eur. J. Hematol.*, 1988, vol. 41, 414-419 [0035]
- 55 • **SECKINGER, P.** *et al. J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 11966-11973 [0035]
- **BROJATSCH** *et al. Cell*, 1996, vol. 87, 845-855 [0037]
- **MONTGOMERY** *et al. Cell*, 1996, vol. 87, 427-436 [0037]
- 60 • **MARSTERS** *et al. J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 14029-14032 [0037]
- **SIMONET** *et al. Cell*, 1997, vol. 89, 309-319 [0037]
- 65 • **NOCENTINI** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 6216-6221 [0038] [0359]
- **MARSTERS** *et al. Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, 750 [0039]

- **MARSTERS** *et al. Curr. Biol.*, 1996, vol. 6, 1669 [0039]
- **CHINNAIYAN** *et al. Science*, 1996, vol. 274, 990 [0039]
- 5 • **KITSON** *et al. Nature*, 1996, vol. 384, 372 [0039]
- **BODMER** *et al. Immunity*, 1997, vol. 6, 79 [0039]
- **PAN** *et al. Science*, 1997, vol. 276, 111-113 [0040]
- 10 • **SHERIDAN** *et al. Science*, 1997, vol. 277, 818-921 [0041]
- **PAN** *et al. Science*, 1997, vol. 277, 815-818 [0041]
- 15 • **FOUAD** *et al. J. Am. Coll. Cardiol.*, 1984, vol. 4, 1500-1506 [0072]
- **SMITH** *et al. J. Am. Coll. Cardiol.*, 1985, vol. 5, 869-874 [0072]
- **HARTFORD** *et al. Hypertension*, 1984, vol. 6, 329-338 [0072]
- 20 • **INOUE** *et al. Am. J. Cardiol.*, 1984, vol. 53, 1583-7 [0072]
- **MARON** *et al. N. Engl. J. Med.*, 1987, vol. 316, 780-789 [0073]
- 25 • **SPIRITO** *et al. N. Engl. J. Med.*, 1989, vol. 320, 749-755 [0073]
- **LOUIE; EDWARDS**. *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 1994, vol. 36, 275-308 [0073]
- **SPIRITO** *et al. N. Engl. J. Med.*, 1997, vol. 336, 775-785 [0073]
- 30 • **WATKINS** *et al. N. Engl. J. Med.*, 1992, vol. 326, 1108-1114 [0073]
- **SCHWARTZ** *et al. Circulation*, 1995, vol. 91, 532-540 [0073]
- 35 • **MARIAN; ROBERTS**. *Circulation*, 1995, vol. 92, b1336-1347 [0073]
- **THIERFELDER** *et al. Cell*, 1994, vol. 77, 701-712 [0073]
- **WATKINS** *et al. Nat. Gen.*, 1995, vol. 11, 434-437 [0073]
- 40 • **MALIK; WATKINS**. *Curr. Opin. Cardiol.*, 1997, vol. 12, 295-302 [0073]
- Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI** *et al. The Molecular Basis of Cancer*. 1995, 13 [0080]
- 45 • **AUSUBEL** *et al. Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience Publishers, 1995 [0100]
- **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0102]
- 50 • **KABAT** *et al. NIH Publ. No.91-3242.*, 1991, vol. 1, 647-669 [0109]
- **ZAPATA** *et al. Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0110]
- **KOHLER** *et al. Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0116]
- 55 • **CLACKSON** *et al. Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0116]
- **MARKS** *et al. J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0116]
- 60 • **MORRISON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0117]
- **JONES** *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0118] [0315] [0316]
- **REICHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0118]
- 65 • **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0118] [0315]
- *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0119]

ES 2 295 040 T3

- **HOLLINGER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0120]
- **STEWART** *et al. Solid-Phase Peptide Synthesis*. W.H. Freeman Co, 1969 [0127]
- 5 • **MERRIFIELD**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0127]
- **DIEFFENBACH** *et al. PCR Primer A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1995 [0129]
- **CARTER** *et al. Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 13, 4331 [0135]
- 10 • **ZOLLER** *et al. Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 10, 6487 [0135]
- **WELLS** *et al. Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0135]
- 15 • **WELLS** *et al. Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 1986, vol. 317, 415 [0135]
- **CREIGHTON**. *The Proteins* [0136]
- **CHOTHIA**. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0136]
- 20 • **T.E. CREIGHTON**. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W.H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0138]
- **APLIN; WRISTON**. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0141]
- 25 • **HAKIMUDDIN** *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0142]
- **EDGE** *et al. Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0142]
- **THOTAKURA** *et al. Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0142]
- 30 • **FIELD** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2165 [0145]
- **EVAN** *et al. Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0145]
- 35 • **PABORSKY** *et al. Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0145]
- **HOPP** *et al. BioTechnology*, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0145]
- **MARTIN** *et al. Science*, 1992, vol. 255 [0145]
- 40 • **SKINNER** *et al. J. Biol. Chem*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0145]
- **LUTZ-FREYERMUTH** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0145]
- 45 • **LANDSCHULZ** *et al. Science*, 1988, 240-1759 [0146]
- **HOPPE** *et al. FEBS Letters*, 1994, 344-1991 [0146]
- **MANIATIS** *et al. Nature*, 1989, vol. 341, 24 [0146]
- 50 • **Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach**. IRL Press, 1991 [0147]
- **SHAW** *et al. Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0148]
- 55 • **GRAHAM; VAN DER EB**. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-437 [0148]
- **VAN SOLINGEN** *et al. J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0148]
- **HSIAO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, vol. 76, 3829 [0148]
- 60 • **KEOWN** *et al. Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0148]
- **MANSOUR** *et al. Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0148]
- 65 • **GRAHAM** *et al. J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0151]
- **URLAUB; CHASIN**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0151]

- **MATHER.** *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0151]
- **URLAUB et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0156]
- 5 • **STINCHCOMB et al.** *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0156]
- **KINGSMAN et al.** *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0156]
- **TSCHEMPER et al.** *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0156]
- 10 • **JONES.** *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0156]
- **CHANG et al.** *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0157]
- 15 • **GOEDDEL et al.** *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0157]
- **GOEDDEL.** *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0157]
- **DEBOER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0157]
- 20 • **HITZEMAN et al.** *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0158]
- **HESS et al.** *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7 [0158]
- 25 • **HOLLAND.** *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0158]
- **GETHING et al.** *Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0163]
- **MANTEI et al.** *Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0163]
- 30 • **THOMAS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0164] [0195]
- **DEUTSCHER.** *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 182 [0167]
- 35 • **WINTER.** *Epidermal Wound Healing.* Year Book Medical Publishers, Inc, 71-112 [0171]
- **EAGLSTEIN; MERTZ.** *J. Invest. Dermatol.*, 1978, vol. 71, 382-384 [0171]
- 40 • Adult ventricular rat heart muscle cells. **PIPER et al.** *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research.* Springer-Verlag, 1990, 36-60 [0173]
- **LAI et al.** *Am. J. Physiol. (Heart Circ. Physiol.)*, 1996, vol. 271, H2197-H2208 [0174]
- **BEZNAK M.** *Can. J. biochem. Physiol.*, 1955, vol. 33, 985-94 [0175]
- 45 • **O'ROURKE; REIBEL.** *P.S.E.M.B.*, 1992, vol. 200, 95-100 [0175]
- The Nude Mouse in Oncology Research. *CRC Press*, Inc, 1991 [0178]
- 50 • **KARMALI et al.** *Br. J. Cancer*, 1983, vol. 48, 689-696 [0179]
- **DREBIN et al.** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 9129-9133 [0181]
- **WANG et al.** *Cancer Research*, 1994, vol. 54, 4726-4728 [0182]
- 55 • **TOO et al.** *Cancer Research*, 1995, vol. 55, 681-684 [0182]
- **DELEO et al.** *J. Exp. Med.*, 1977, vol. 146, 720 [0184]
- 60 • **PALLADINO et al.** *J. Immunol.*, 1987, vol. 138, 4023-4032 [0184]
- **ZUPI et al.** *Br. J. Cancer*, 1980, vol. 41, 30 [0185]
- **ZACHARSKI.** *Haemostasis*, 1986, vol. 16, 300-320 [0185]
- 65 • **SPANG-THOMSEN.** *Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals.* 1989, 301 [0186]
- **PUTTEN et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 6148-615 [0187]

ES 2 295 040 T3

- **THOMPSON** *et al. Cell*, 1989, vol. 56, 313-321 [0187]
- **LO.** *Mol. Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 1-8031814 [0187]
- 5 • **LAVITRANO** *et al. Cell*, 1989, vol. 57 [0187]
- **LASKO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6232-636 [0188]
- **THOMAS; CAPECCHI.** *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0190]
- 10 • **LI** *et al. Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0190]
- **BRADLEY.** *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach.* 1987, 113-152 [0190]
- 15 • **ZOLA.** *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 1987, 147-158 [0198]
- **SMALL** *et al. Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 642-648 [0204]
- **TONKINSON** *et al. Cancer Investiation*, 1996, vol. 14 (1), 54-65 [0208]
- 20 • **WU** *et al. J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, 4429-4432 [0209]
- **WAGNER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0209]
- 25 • **ANDERSON** *et al. Science*, 1992, vol. 256, 808-813 [0209]
- **SAIKI** *et al. Nature*, 1986, vol. 324, 163-166 [0212]
- **MYERS** *et al. Science*, 1985, vol. 230, 1242 [0213]
- 30 • **COTTON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 85, 4397-4401 [0214]
- **VERMA** *et al. Human Chromosomes: a Manual of Basic Technique.* Pergamon Press, 1988 [0222]
- 35 • **FIELDS; SONG.** *Nature* (London), 1989, vol. 340, 245-246 [0229]
- **CHIEN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0229]
- **CHEVRAY; NATHANS.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 89, 5789-5793 [0229]
- 40 • **COLIGAN** *et al. Current Protocols in Immun.* 1991, vol. 1 [0232]
- **LEE** *et al. Nucl. Acids Res.*, 1979, vol. 6, 3073 [0237]
- 45 • **COONEY** *et al. Science*, 1988, vol. 241, 456 [0237]
- **DERVAN** *et al. Science*, 1991, vol. 251, 1360 [0237]
- **OKANO.** *Neurochem*, 1991, vol. 56, 560 [0237]
- 50 • Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression. *CRC Press*, 1988 [0237]
- **ROSSI.** *Current Biology*, 1994, vol. 4, 469-471 [0239]
- 55 • **GRIENER** *et al. Lymphology*, 1971, vol. 4, 140-144 [0257]
- *Remington's Pharmaceutical Sciences.* 1980 [0273]
- **LANGER** *et al. J. Biomed. Mater. Res.*, 1981, vol. 15, 167-277 [0282]
- 60 • **LANGER.** *Chem. Tech.*, 1982, vol. 12, 98-105 [0282]
- **SIDMAN** *et al. Biopolymers*, 1983, vol. 22, 547-556 [0282]
- 65 • **EPSTEIN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688-3692 [0284]
- **HWANG** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030-4034 [0284]

- Physicians' Desk Reference. *Medical Economics Data Production Co*, 1997 [0298]
- KOHLER; MILSTEIN. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0306]
- 5 • GODING. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0307]
- KOZBOR. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0308]
- 10 63 • BRODEUR *et al.* *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0308]
- MUNSON; POLLARD. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0309]
- 15 • RIECHMANN *et al.* *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0315]
- RIECHMANN *et al.* *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0316]
- VERHOEYEN *et al.* *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0316]
- 20 • HOOGENBOOM; WINTER. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0317]
- MARKS *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0317]
- 25 • COLE *et al.* *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*. 1985, 77 [0317]
- BOERNER *et al.* *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0317]
- MARKS *et al.* *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0317]
- 30 • LONBERG *et al.* *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859
- MORRISON. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-813 [0317]
- 35 • FISHWILD *et al.* *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-851 [0317]
- NEUBERGER. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0317]
- HUSZAR. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0317]
- 40 • MILSTEIN; CUELLO. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0319]
- TRAUNECKER *et al.* *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0319]
- 45 • SURESH *et al.* *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0320]
- CARON *et al.* *J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0322]
- SHOPES. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0322]
- 50 • WOLFF *et al.* *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0322]
- STEVENSON *et al.* *AntiCancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0322]
- 55 • VITETTA *et al.* *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0325]
- EPSTEIN *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0327]
- HWANG *et al.* *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0327]
- 60 • MARTIN *et al.* *J. Biol. Chem*, 1982, vol. 257, 286-288 [0328]
- GABIZON *et al.* *J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0328]
- 65 • MARASCO *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0330]
- AUSUBEL *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Associates and Wiley Interscience, 1989 [0349]

ES 2 295 040 T3

- **INNIS** *et al.* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press. Inc.*, 1990 [0349]
- **HARLOW** *et al.* Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Press*, 1988 [0349]
- 5 • **GAIT**. *Oligonucleotide Synthesis*. IRL Press, 1984 [0349]
- **FRESHNEY**. *Animal Cell Culture*, 1987 [0349]
- **COLIGAN** *et al.* *Current Protocols in Immunology*, 1991 [0349]
- 10 • **ALTSHUL** *et al.* *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0351]
- **HOLMES** *et al.* *Science*, 1991, vol. 253, 1278-1280 [0355]
- 15 • **NAISMITH; SPRANG**. *Trends Biochem. Sci.*, 1998, vol. 23, 74-79 [0358]
- **KLEIN** *et al.* *PNAS*, 1996, vol. 93, 7108-7113 [0360]
- **ECK** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1989, vol. 264, 17595-605 [0363]
- 20 • **LEWIT-BENTLEY** *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1988, vol. 199, 389-92 [0363]
- **NOCENTINI** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 6216-6221 [0377]
- 25 • **ASHKENAZI** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1991, vol. 88, 10535-10539 [0379]
- **SMITH** *et al.* *Science*, 1987, vol. 328, 1704-1707 [0382]
- **GELB** *et al.* *Hum. Genet.*, 1996, vol. 98, 141 [0387]
- 30 • **TAKAHASHI** *et al.* *Int. Immunol.*, 1994, vol. 6, 1567-1574 [0387]
- **BAUM** *et al.* *EMBO J.*, 1994, vol. 13, 3992-4001 [0387]

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un polipéptido PRO364 en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, y un agente cardiovascular, endotelial o angiogénico, o un agente angiostático, en donde el polipéptido PRO364:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (2) comprende los aminoácidos 26 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167; o
- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO364 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, o un dominio extracelular del polipéptido PRO364 que tiene los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.:3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167.

2. Composición que comprende un polipéptido PRO175 en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, en donde el polipéptido PRO175:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (2) comprende los aminoácidos 52 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57; o
- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO175 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14, o un dominio extracelular del polipéptido PRO175 que tiene los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57.

3. La composición de la reivindicación 1 ó 2 que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido.

4. La composición de la reivindicación 2, en donde el polipéptido PRO175 está en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, y un agente cardiovascular, endotelial o angiogénico, o un agente angiostático.

5. La composición de la reivindicación 4, en la cual el polipéptido y el agente están presentes en cantidades terapéuticamente efectivas.

6. Procedimiento para preparar una composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para el tratamiento de una trastorno cardiovascular o endotelial o angiogénico, que comprende mezclar una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido PRO364 o PRO175 con un portador farmacéuticamente aceptable.

7. Producto farmacéutico que comprende:

- (a) una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del polipéptido PRO364, en mezcla con un agente cardiovascular, endotelial o angiogénico, o un agente angiostático, o del polipéptido PRO175, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable;
- (b) un contenedor que contiene dicha composición; y
- (c) una etiqueta pegada a dicho contenedor, o un prospecto incluido en dicho producto farmacéutico que se refiere al uso de dicha composición de polipéptido PRO364 o PRO175 en el tratamiento de un trastorno cardiovascular, endotelial, y angiogénico;

en donde el polipéptido PRO384:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (2) comprende los aminoácidos 26 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167; o

ES 2 295 040 T3

- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO364 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, o un dominio extracelular del polipéptido PRO364 que tiene los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.:3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167.

en donde el polipéptido PRO175:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (2) comprende los aminoácidos 52 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57; o
- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO175 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14, o un dominio extracelular del polipéptido PRO175 que tiene los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57.

8. Un proceso para diagnosticar una enfermedad o una susceptibilidad a una enfermedad relacionada con una mutación en una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175, que tiene una secuencia de aminoácidos como la detallada en las SEC. N° ID.: 3 ó 14, que comprende:

- (a) aislar una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175 a partir de una muestra derivada de un huésped; y
- (b) determinar una mutación en la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO364 o PRO175.

9. Procedimiento de diagnóstico de trastornos cardiovasculares, endoteliales y angiogénicos en un mamífero, el cual comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido PRO364 o PRO175 que tiene la secuencia de aminoácidos detallada en las SEC. N° ID.: 3 ó 14, (a) en una muestra de ensayo de células del tejido obtenida del mamífero, y (b) en una muestra de control de células de tejido que se sabe es normal del mismo tipo de células, en donde una nivel de expresión superior o inferior en la muestra de ensayo indica la presencia de una disfunción cardiovascular, endotelial y angiogénica en el mamífero del cual se obtuvieron las células de tejido de ensayo.

10. Uso de un polipéptido PRO364 o PRO175 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno cardiovascular, endotelial o angiogénico en un mamífero; en donde el polipéptido PRO364:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (2) comprende los aminoácidos 26 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167; o
- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO364 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, o un dominio extracelular del polipéptido PRO364 que tiene los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.:3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167.

en donde el polipéptido PRO175:

- (1) comprende los -aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (2) comprende los aminoácidos 52 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57; o
- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO175 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14, o un dominio extracelular del polipéptido PRO175 que tiene los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57.

ES 2 295 040 T3

11. El uso de la reivindicación 10, en donde el trastorno cardiovascular o endotelial o angiogénico es la hipertrofia cardíaca o trauma o cáncer.

12. El uso de la reivindicación 10, en donde dicho mamífero es humano.

13. El uso de la reivindicación 11, en donde dicha hipertrofia cardíaca se **caracteriza** por la presencia de un nivel elevado de $\text{PGF}_{2\alpha}$.

14. El uso de la reivindicación 11, en donde dicha hipertrofia cardíaca ha sido inducida por infarto de miocardio.

15. El uso de la reivindicación 14, en donde la administración de dicho polipéptido PRO364 o PRO175 se inicia durante las 48 horas siguientes al infarto de miocardio.

16. El uso de la reivindicación 11, en donde el trastorno cardiovascular o endotelial o angiogénico es la hipertrofia cardíaca, y dicho polipéptido PRO364 o PRO175 se administra junto con un agente cardiovascular, endotelial, o angiogénico.

17. El uso de la reivindicación 16, en donde dicho agente cardiovascular, endotelial, o angiogénico se selecciona de entre el grupo consistente en un fármaco antihipertensivo, un inhibidor de ACE, un antagonista del receptor de endotelina, y un agente trombolítico.

18. El uso de la reivindicación 11, en donde el trastorno cardiovascular o endotelial o angiogénico es un cáncer, y el polipéptido PRO364 o PRO175 se administra en combinación con un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, o un agente citotóxico.

19. Proceso para identificar agonistas contra el polipéptido PRO364 o PRO175, que comprende:

(a) poner en contacto células y un compuesto a examinar, en condiciones apropiadas para la estimulación de la proliferación celular por parte del polipéptido PRO364 o PRO175; y

(b) medir la proliferación de las células para determinar si el compuesto es un agonista efectivo;

en donde el polipéptido PRO364:

(1) comprende los aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o

(2) comprende los aminoácidos 26 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o

(3) comprende los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167; o

(4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO364 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, o un dominio extracelular del polipéptido PRO364 que tiene los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167.

en donde el polipéptido PRO175:

(1) comprende los aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o

(2) comprende los aminoácidos 52 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o

(3) comprende los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57; o

(4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO175 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14, o un dominio extracelular del polipéptido PRO175 que tiene los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57.

20. Procedimiento para identificar un compuesto que inhibe la expresión o actividad de un polipéptido PRO364 o PRO175, que comprende poner en contacto un compuesto candidato con un polipéptido PRO364 o PRO175 en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que el compuesto y el polipéptido interaccionen;

ES 2 295 040 T3

en donde el polipéptido PRO364:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (2) comprende los aminoácidos 26 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167; o
- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO364 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, o un dominio extracelular del polipéptido PRO364 que tiene los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.:3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167.

en donde el polipéptido PRO175:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (2) comprende los aminoácidos 52 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57; o
- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO175 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14, o un dominio extracelular del polipéptido PRO175 que tiene los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57.

21. El proceso de la reivindicación 20 que comprende los pasos de:

- (a) poner en contacto las células y un compuesto a examinar en presencia de un polipéptido PRO364 o PRO175, en condiciones apropiadas para la estimulación de la proliferación celular por parte de un polipéptido PRO364 o PRO175; y
- (b) medir la proliferación de las células para determinar si el compuesto es un antagonista efectivo.

22. Procedimiento *in vitro* para determinar la presencia de un polipéptido PRO364 o PRO175, que comprende exponer una célula sospechosa de contener el polipéptido PRO364 o PRO175 a un anticuerpo anti-PRO364 o -PRO175, y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicha célula;

en donde el polipéptido PRO364:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (2) comprende los aminoácidos 26 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167; o
- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO364 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 241 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, o un dominio extracelular del polipéptido PRO364 que tiene los residuos aminoácidos Y a X tal como se detallan en la SEC. N° ID.:3, en donde Y es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 1 a 26, y X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 157 a 167.

en donde el polipéptido PRO175:

- (1) comprende los aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (2) comprende los aminoácidos 52 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14; o
- (3) comprende los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57; o

- (4) tiene al menos un 80% de identidad de secuencia, bien con un polipéptido PRO175 de longitud completa que tiene los residuos aminoácidos 1 a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 14, o con un dominio extracelular del polipéptido PRO175 que tiene los residuos aminoácidos X a 177 tal como se detallan en la SEC. N° ID.: 3, en donde X es uno cualquiera de los residuos aminoácidos 48 a 57.

5

23. Procedimiento de diagnóstico de trastornos cardiovasculares o endoteliales o angiogénicos en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti-PRO364 o -PRO175 con una muestra de ensayo de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-PRO364 o -PRO175 y el polipéptido PRO364 o PRO175 en la muestra de ensayo.

10

24. Equipo de diagnóstico del cáncer que comprende un anticuerpo anti-PRO364 o -PRO175 y un portador en un envase apropiado.

15

25. El equipo de la reivindicación 24 que comprende además instrucciones para usar dicho anticuerpo para detectar el polipéptido PRO364 o PRO175.

26. Artículo manufacturado que comprende:

20

un contenedor;

una etiqueta sobre el contenedor; y

25

una composición que comprende un anticuerpo anti-PRO364 o -PRO175 contenido en el contenedor; en donde la etiqueta del contenedor indica que la composición puede usarse para tratar trastornos cardiovasculares o endoteliales o angiogénicos.

27. Uso de un anticuerpo que une un polipéptido PRO364 o PRO175 para la preparación de un medicamento inhibidor de la angiogénesis inducida por el polipéptido PRO364 o PRO175 en un mamífero.

30

28. El uso de la reivindicación 27 en donde el mamífero es un humano.

29. El uso de la reivindicación 27 en donde el mamífero tiene un tumor o un trastorno de la retina.

35

40

45

50

55

60

65

1 CAGGACGCTT ACCTGGGTG GGAATCTCAG GTCATNACG GTCCGAGCA CTCTCGGCA GGGGAGTGA GAGGAGGAC GAGGAGTTC CAACTGGCTG
 GTGGTGAAG TGGACCCAGC CTTAGAGTC CAGTACTTC CAGGTGGT GAGGCGGT GAGGCGCT CCGGCACT CCGGCACT CCGGCACT CCGGCACT
 101 TGGGCTCTTG AAGCCGAGC ATGCGCAGC AGGGGGGAT GGGGCGGTT GGGGCGGTT GGGGCTGC GCTCTGTGC GAGCTAGCC TGGCTAGCG
 ACCCGAGC TTTGGGCTG TACGCTGTG TGGCGGCTA CCGCGCMA CCGCGGCA CCGCGAGC GAGGAGGAC GAGGAGTTC ACCGAGTGC
 1 H A Q H G A H G A F R A L C G L A L L C A L L C A L S L G Q R
 ~MET
 201 CCGGAGGAG GGTCCGGGT GGGGCTCTG GGGGCTCTG GAGGAGG GAGGAGG GAGGAGG GAGGAGG GAGGAGG GAGGAGG
 GGGTGGCC CCGGAGG CCGGAGG CCGGAGG CCGGAGG CCGGAGG CCGGAGG CCGGAGG CCGGAGG CCGGAGG
 28 P T G G P G C G P G R L L L L G T G T D A R C C R V H T T R C C R D
 301 TACCGGAGC AGGAGTGTG TTCGAGTGG GACTGATGT GTGTCAGC TGAATTCAC TGGGAGACC CTGCTGTGC GAGCTGGCC CACACCTT
 ATGGGCGCC TCTCAGGAC AAGCTCACC CTGAGCTACA CACAGTGG CACTGATGT ACTTATGT AGCTCTGT GAGGAGGCTG CTGAGGAGC GTGGTGGAA
 61 Y P G E E C C S E W D C H C V Q P E F H C G D P C C T T C R H M P C
 401 GTCCCCAGG CAGGGGGA CAGTCCAGG GGAATTCAG TTTGGCTTC CAGTATGT ACTGTCTC GGGGAGCTT TCGGGGGCC ACGAGGGGA
 CAGGGCTCC GGTCCCGAT GTGAGGCTC CTTTATGT ANACCGAG GTGAGTATG TGAAGTATG CCGCTGGAAG AGGCGGCGG TGTTCGGGT
 95 P P G Q G V Q S Q G K F S F G F Q C I D C A S G T F S G G H E G H
 ~47365.tn.f
 501 CTGCAAGCT TGGAGACT GAGCCAGTT GGGGTTCTC ACTGTTTC CTGGAGCA GAGCCAGC GCTGTGTGC TCCAGGCT CCGGCGGCA
 GAGTTTGA ACTGTCTGA GTGGGTGA GCGGAGAG TGAACAGG GAGCTTGT CTGGGTTG GAGGAGGCTG AAGTGGCC AGGTTGGC GGGGCGCT
 128 C K P W T D C T Q F G F L T V F P G N K T M N A V C V P G S P P A
 ~47365.tn.p
 601 GAGCGCTTG GGTGCTGAC CTTGCTCTC CTGGGCTGG CCGCTGGCT CCGCTCTCTG AGCTGGCC AGCTTGGAT GCAATCTGG CAGCTAGGA
 CTCGGGAGC CAGCGACTG GAGCGAGG GAGCGGACC GGGGAGGCA GAGGAGGAC TGGAGCGGG TCGAGCTGA CCGTGTAGCC GTGACTCT
 161 E P L G W L T V V L L A V A A C V L L L L T S A Q L G L R I W Q L R S
 701 GTGAGTCTAT GTGCCCCGA GAGCCGAGC TGTCTGTGA GTGCGGCGG TCGAGGAG AGGCGAGG CTGCGAGTTC CCGGAGGAG AGGCGGCGA
 CAGTACGTA CAGCGGCT CTCTGGTGG AGGAGACT CAGCGGCG CAGCGGCT TCGGCTTTC GAGGTCAG GGGCTCTTC TCGCGGCT
 195 Q C H M P R E T Q L L L E V P P S T E D A R S C Q F P E E R G E
 801 GAGTGGGCA GAGGAGGAG GAGGCTGGG AGACTGTGG GTGTAGCT GCGGCTCTC GGGGAGGAG GAGGAGGAG AGGCGCTTCC CAGGAGCTCC
 CAGTACCGT CTCTCTTCC CCGCGAGCC TGTGAGACC CAGTCTGA CCGGAGGAG GCGGCGTGG CTGGGCTGG TGGGAGGAG GTGCTGAGG
 228 R S A E E K G R L G D L W V O
 901 CAGGAGGCA GAGGCTTGC GTTCTGTCT GGGCGGCG CTTGCTCTCT GAGGAGGAG GTGAGTGA GAGGAGGAG GTGAGGAG CCGTGGAGCA
 GTGCGGCT CCGGAGGAG CAGGAGGAG CCGGCGCG GAGGAGGAG CAGTCTCTT CAGGAGGAG GTGAGGAG CAGTCTCTT CAGTCTCTT
 1001 TCGAGTTC
 ACGTCAAG

FIG. 1

<PM: 26.000, pI: 6.34, NX(S/T): 1
<máxima homología con la proteína M082534_1 inducida por glucocorticoide>
<y relacionada con el TNFR - podría ser la homóloga humana de este gen de ratón>
>25-26 sitio potencial de corte del péptido señal>
<34 4 dominios de repetición TNFr - Cys>
<146 sitio potencial de glicosilación unida a N>
<162 inicio potencial del dominio transmembrana>
<180 final potencial del dominio transmembrana>

<	1	10	20	30	40	50	60	70
<								
<	MAQHGAMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGGRLLLGTTDARCCRVHTTRCCRDYPGECCSEM							
<	71	80	90	100	110	120	130	140
<								
<	DCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQVQSGKFSFGFCIDCASGTFSGHGHCKPWTDCIQGFL							
<	141	150	160	170	180	190	200	210
<								
<	TVFPGKTHNAVCPVGPSPPAEPLGMLTVVLLAAVACVLLLTSAQLGLHIQLRSQCHNPRETQLLEVP							
<	211	220	230	240				
<								
<	STEDARSCQFPEERGERSAENKGRGLGLWV							

FIG. 2

```

<consen01>      1  GGCACAGCACGGGGCGATGGGCGCGTTTCGGGCCCTGTGCGGCCTGGCGC
<consen01>     51  TGCTGTGCGCGCTCAGCCTGGGTGAGCGCCCCACCGGGGGT-CCCGGGTG
<consen01>    101  CGGCCCTGGGCGCCTCCTGCTTGGGACGGGAACGGACGCGCGCTGCTGCC
<consen01>    151  GGGTTCACACGACGCGCTGCTGCCGCGATTACCGGGCGAGGAGTGCTGT
<consen01>    201  TCCGAGTGGGACTGCATGTGTGTCCAGCCTGAATTCCACTGCGGAGACCC
<consen01>    251  TTGCTGCACGACCTGCCGGCACCACCCTTGTCCTCCAGGCCAGGGGGTAC
<consen01>    301  AGTCCCAGGGGAAATTCAGTTTTGGCTTCCAGTGTATCGACTGTGCCTCG
<consen01>    351  GG-GAOCCTCTCCGGGGGCCACGAAG--GCCACTGCAAACTTGGACAGA
<consen01>    401  CTGCACCCAGTT-CGGG-TTCTCACTGTGTTCCCTGGGGAACAAGACCC
<consen01>    451  -ACAA-CGCTGTGTGCGTCCCAGGGTCCCCG-CCGGCAGAGCCGCTT-GG
<consen01>    501  GTGGCTGACCGTCGTCTCTCTGGCCGT-GGCCGCCTGCGTC-TCCTCCTG
<consen01>    551  ACCTCGGCCCAGCTTGGACTGCACATCTGGCAGCTGAGGAGTCAGTGCA
<consen01>    601  GTGGCCCCGAGGTCTGTACAGCCTGGTGCGGGGAGGTGGGAGCATGGCT
<consen01>    651  GCCTGCTGACCGTGGCCCCCTGCATAGACCCAGCTGCTGCTGGAGGTGC
<consen01>    701  CGCCGTGACCGAAGACGCCAGAAGCTGCCAGTTCCCCGAGGAAGAGCGG
<consen01>    751  GCGAGCGATCGGCAGAGGAGAAGGGGCGGCTGGGAGACCTGTGGGTGTG
<consen01>    801  AGCCTGGCTGTCTCCGGGGCCACCGACCGCAGCCAGCCCCTCCCCAGGA
<consen01>    851  GCTCCCCAGGCCGCGAGGGGCTCTGCGTTCTGCTCTGGGCCGGGCCCTGCT
<consen01>    901  CCCCTGGCAGCAGAAGTGGGTGCAGGAAGGTGGCAGTGACCAGCGCCCTG
<consen01>    951  GACCATGCAGTTC

```

FIG. 3

1 GGACACAC GGGGATGG GGGCTTTG GGGCTGTG GGGTGGGG TGGTGTGG GGTACAGGC CCACCGGGG TCCGGGTG
 CCGTGTGG CCGGCTAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG
 1 ~44825.GITR.f ~orf2
 ~44825.f1
 101 GGGCTGGG GCTCTGCT TGGACGGG AGGACGGG GGTGTGGG GGTTCAGG AGGGGATTA CCGGGGGA GGTGTGTT
 CCGGAGAG CCGGAGAG AGGGGATTA GGTGTGGG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG CCGGAGAG
 29 G P G R L L L G T G T D A R C C R V H T T R C C R D Y P G E E C C S
 ~44825.GITR.p ~44825.z2
 ~44825.p1
 201 CCGAGTGG CTGATGTT GTCCGGGT AATCCACT GGGAGAGCT TGTGACGA CTGCGGCA CCACCTTGT CCGGAGGC AGGGGTACA
 GGTACCTT GAGTACCA CAGTGGAG TTAGGTGAC GGTGTGGG AGGAGGCT GAGGAGCT GGTGGACA GGGGTGGG TCCGCTAT
 63 E N D C H C V Q P E F H C G D P C C T T C R H H P C P P G Q G V Q
 301 GTCCAGGG AATTCAGT TTGCTTCA GTGTATGAC TGTGCTGG GAGCTTTC CCGGGGAG GAGGAGCT CCACCTTGT GAGGAGTGC
 CAGGTCCT TTATGACA AAGGAGGT CAGTATGAG AGGAGGAG CTGAGGAG GGGGGGAG CTTCGATGA CTTTGGAG CTGTGAGG
 96 S Q G K F S F G F Q C I D C A S G T F S G G H E G H C E P N T D C
 ~44825.GITR.z
 ~44825.z1
 401 ACCAGTGG GTTTCAC TGTGTTCT GGGAGAG AGGAGAG CTGTGCTT CCGAGGTC CCGGAGAG AGGGGATTA GGTGTGAG
 TGGTACAG CCGAGAGT ACACAGGA CCGTGTTC TGGTGTTC GAGGAGCA GGGTGGAG GGGGAGCT GGGGAGCT CAGGAGTGC
 129 T Q F G F L T V F P G E Q D P Q R C V R P R V P A G R A A W V A D R
 501 GTCTCTTC TGGGTCGG GGTGTGTC TCTCTTAC CTGGGAGG CTGAGTGC ACATGGA GGTGAGGT CAGTGTAT GGGGAGG
 CAGGAGAG AGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG
 163 R P P G R G R L R L L L T S A Q L G L H I W Q L R S Q C H M P R G
 601 TCTGTACAG CTGTGTCGG GGTGTGGA GATGAGTC CTGTGAGG TGGGAGCT GATGAGCT GATGAGCT GATGAGCT GATGAGCT
 AGACATGTC GAGGAGAG CTTGACCT GTTACAGG GAGGAGTC AGGAGAGG GATGAGTC GATGAGTC GATGAGTC GATGAGTC
 196 L S Q P G A G R W E H G C L L T V A P L H R P S C C W R C R R R P
 701 AGAGAGAG AGGTCAGG TTCCAGAG AGGAGAGG CAGGAGAG AGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG GGGAGAGG
 TTCTGAGT TTCTGAGT AGGAGAGG TTCTGAGT GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT
 229 E T P E A A S S P R K S G A S D R Q R R R G G W E T C G C E P G C P
 801 CTCTGAGG AGGAGAGG GGGAGAGG CCGAGAGG TCCAGAGG CAGGAGTC TGGTGTTC TGGTGTTC TGGTGTTC TGGTGTTC
 GAGGAGAG TGGTGTTC CCGTGTGGA GGGTGTTC AGGAGAGG GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT
 263 P G P P T A A S P S P G A P Q A A G A L R S A L G R A L L P W Q Q
 ~44825.f2
 901 GAGTGTGG CAGGAGGT GAGTACCA GGGCTGGA CAGTGTAT CCGGAGAG GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT GGTGAGT
 CTTACAGC GTCTGTTC CAGTGTAT CAGTGTAT CAGTGTAT CAGTGTAT CAGTGTAT CAGTGTAT CAGTGTAT CAGTGTAT
 296 K W V Q E G G S D Q R P G P C S S X A G X A
 ~44825.f1

FIG. 4

1 CAGCTCTCAT TTCTCCAAA ATGTGTTTGA GCGACTTGA AAATATGCTT TTAGCCATT CAAAGAATCA AGGAGCTCAG AGATCATCTT GGAGCTGTG
 GTGAGAGTA AAGAGGTTTT MetCysLeuS erHisLeuG1 uasnMetPro LeuSerHisS erArgThrG1 nGlyAlaGln ArgSerSerT rPlysLeuTrp
 2
 101 GCTCTTTTC TCATAGTTA TGTGCTATT TCTTGTCTCC TTCAGTTGGC TAATCTTAT TTTTCTCCAA TTAGAGACTG CTNAGGAGCC CTGTATGCT
 CGAGAAACG AGTTATCAAT ACAACGATAA AGAACGAGG AAGTCACCCG ATTNGAATA AAAGAGGTT AATCTCTGAC GATCTCTGG GACATACCGA
 28 LeuPheCys SerIleValM etLeuLeuPh eLeuCysSer PheSerTrpL euIlePheI1 ePheLeuGln LeuGluThra lalysGluPr cCysMetAla
 201 AAGTTTGGAC CATTACCCCTC AATATGGCAA ATGGCATCTT CTGAACCTCC TTGCGTGAAT AAGGTGCTG ACTGGAGCTT GGAGATACCT CAGNATGCT
 TTCAAACCTG GTAATGGGAG TTTTACCGTT TACCGTAGAA GACTTGGNG AACGCATTA TTCACAGAC TGACCTTGA CCTCTATGAA GTCTTACCGA
 61 LysPheGlyP roLeuProSe rLysTrpGln MetAlaSerS erGluProPr cCysValasn LysValSera spTrpLysLe uGluIleLeu GlnAsnGlyLeu
 301 TATATTTAAT TTATGGCCAA GTGGTCCCA ATGCMAACTA CAATGATGTA GCTCTTTTG AGGTGCGCT GTATRAAAMC AAGACATGA TACAACTCT
 ATATAAATTA AATACCGGTT CACCGAGGT TACGTTTGTAT GTTACTACAT CGAGGAAMC TCCAGCCGA CATATTTTG TTCTGTACT ATGTTTGAGA
 95 TyrLeuI1 eTyrGlyGln ValAlaProA snAlaSerTy rAsnAspVal AlaProPheG luValArgLe uTyrLysAsn LysAspMetI leGlnThrLeu
 401 AACAAACAAA TCTAAATCC AATATGTAGG AGGACTTAT GAATGCAATG TTGGGGACMC CATAGACTTG ATATTCMACT CTGAGCATCA GGTCTTAAAA
 TTGTTTGTAT AGATTTTAGG TTTTACATCC TCCCTGAATA CTTAAGCTAC AACCCCTGTG GTATCTGMACT TATATGTGA GACTGTAGT CCAGATTTT
 128 ThrAsnLys SerLysIleG lnAsnValG1 yGlyThrTyr GluLeuHisv alGlyAspTh rIleAspLys lIlePheAsnS erGluHisG1 nValLeuLys
 501 AATAATACAT ACTGGGTAT CATTTTACTA GCAATCCCTC CTAGAGACTT GATTGTACT CCTCATTCCT TTCAGCACAT GTAGAGGTGC
 TTATTATGTA TGACCCCAT A GTAAATGAT CGTTTAGGG TTAAGTAGAG GATCTCTGAA CTAAACTAGA GGAGTAAGGG AAGTCTGTGA CATCTCCAGC
 161 AsnAsnThrT yrTrpGlyI1 eIleLeuLeu AlaAsnProG lnPheIleSe rAH*
 601 CAGTGGGTGG ATTGGAGGGA GAAGATATTC AATTICTAGA GTTGTCTGT CTACAAAAT CAAACAAAC AGAACTCCTC TGCAGTGAA TTTTCATCTA
 GTCACCCACC TRACCTCCTT CTTCTATAG TTAAGATCT CAAACAGACA GATGTTTTTA GTTGTGTTG TCTTGAGGAG ACGTGCACCT AAAGTAGAT
 701 TCATGCCCTAT CTGAAGAGA CTCAGGGGA GAGCCAAAGA CTTTGGTTG GATCTGAGA AATACTTCAT TAATCCATGA TAAMACAAAT ATGGATGACA
 AGTAGGGATA GACTTTCTCT GAGTCCCTT CTCGGTTCT GAAACCAAC CTAGACGTCT TTAAGAAATA ATTAGGACT ATTTTGTITA TACCTACTGT
 801 GAGGACATGT GCTTTTCMAA GAATCTTTAT CTNATTCITG AATTCATGAG TGGAAAATG GAGTICTAT CCCATGGAG AGTTACTGG TATGCANAAA
 CTCCTGTACA CGAAAGTTT CTTAGAAATA GATTAGAAC TTAAGTACTC ACCTTTTAC CTCAGATAA GGGTACCITC TAAATGACCC ATAGGTTTTT
 901 GCACTCTGGG CAGTAGCCTG GCTTGTCTT CATATCTTG GGCTCTGTA ATTCATCTT CTCATCTCC CATCTCTGA GACCCTCCA ATMAAAGTA
 CCTAGACCCC GTCATCGGAC CGAAACAGA GTATNAGAAC CCGAGGACAT TAAGTAAGNA GASTATGAGG GTAGAGACT CTGGGAGGT TATTTTTCAT
 1001 GACTGATAGG ATGGCCACAG ATATGCCCTAC CATACCCTAC TTTAGATATG GTGGTGTAG AAGATAAGTA ACNATCTGAG AACTATTGGA ATAGAGGTAC
 CTGACTATCC TACCGGTGTC TATACGGATG GTATGGGATG AATCTATATC CACCACAATC TTCTATTCT TGTAGACTC TTGATNACCT TATCTCCATG

FIG. 5A

```

1101  AAGTGGCATA AATGGGATG TAGGCTATCT GGAATTTCT CTGGGTTTA TCTTCTCAG GATCGAGGGT GCCTTAAAA GCCTTATCAA AGGAGTCAT
    TTACCCGTAT TTTACCTTAC ATGCGATAGA CCTTTAAGA GNAACCAAT AGAAGGATC CTACGTCCCA CGAATTTTT CGGAATAGTT TCCTCAGTAA

1201  CCGAACCCCTC ACGTAGAGCT TTGTGAGACC TTACTGTTC TGIGTGTGC TAAACATTGC TAACTGTAA GNAAGAGTAA CCATTAGTAA TCATTAGGTT
    GSCITGGGAG TGCATCTCGA AACACTCTGG AATGACAACC ACACACACAG ATTTGTAACG ATTNACATTT CTTTCATTT GGTATCATTT AGTAATCCAA

1301  TAAACCCAGA ATGGTATTAT CATTACTGGA TTATGTGATG TATGATTTA GTATTTTAG CTAGCTTCC ACAGTTTCCA AAGTGCITTC GTAAACAGT
    ATGGGGTCT TACCATAATA GTATGACCT AATACAGTAC ATTACTAAT CATAAAAATC GATCGAAGG TGTCAACGT TTCACGNAAG CATTTTGTC

1401  TAGCAATTCT ATGAAGTTAA TTGGGCAGGC ATTTGGGGA AANTTTAGT GATGAGATG TGATGATTA GCATAGCCAA CTTTCCICAA CTCATAGGAC
    ATCGTTAAGA TACTTCAAT AACCCGTCCG TAAACCCCT TTTAAATCA CTACTTTAC ACTATCGTAT CGTATCGGT GAAAGGAGTT GAGTATCCTG

1501  AAGTGACTAC AAGAGGCAT GGTAGTCCC CTGCATTGCA CTGTCTCAGC TTTAGAAATG TTAATTTGC TATCGTGTTA TAAGACTCTA AACTTAGGG
    TTCACTGATG TTCTCGTTA CCCATCAGGG GACGTAACGT GACAGAGTGG AANTCTTAAC AATAAGACG ATAGCACAAAT ATTCTGAGAT TTTGAATCGC

1601  AATTCACTTT TCAGGAAGCA TATTCCTCTT TAGCCCAAGG TGAGCAGAGT GAAGCTACAA CAGATCTTC CTTTACCAGC ACATTTTTT TTTTTTTC
    TTAAGTGAA AGTCTTCTGT ATAGGGGAA ATCGGGTTC ACTGGTCTCA CTTGATGTT GTCTAGAAAG GNAATGGTGG TGTGAAATAA AAAAAAAGG

1701  TGCTGAATC AGGAGATCC AGGATGCTGT TCAGGCCAA TCCCAACC AAATCCCTTT TCACITTGCA GGGCCCATCT TAGTCAATG TGCTAATTC
    ACGGACTTAG TCCCTCTAGG TCCTACGACA AGTCCGGTT AGGGTTGGT TAAGGGGAAA AGTGAACGT CCCGGGTAGA ATCAGTTTAC AGGATGMAAG

1801  TAAATATAA ATAGCACTA ATTCAAATTT TTGGAAATCT TAAATAGCT ACTGCGNGGT TGCTTGTGA AAGGATATA ATGATTACAT TGTAAACAAA
    ATTTATTAT TTATCGTGAT TAAGTTTAA AATCCTTAGA ATTTATCGA TGAACGNCCA ACGAACAACT TTCCTATAT TACTAATGTA ACATTTGTTT

1901  TTTAAATAT TTATGGATAT TTGTGAAGG CTGCATTATG TTAATATAA TTACATGTA AGCT
    AATTTTATA NATACCTATA NACACTTTC GACGTAATAC AATTTATTAT ATGTACATTT TCGA

```

FIG. 5B

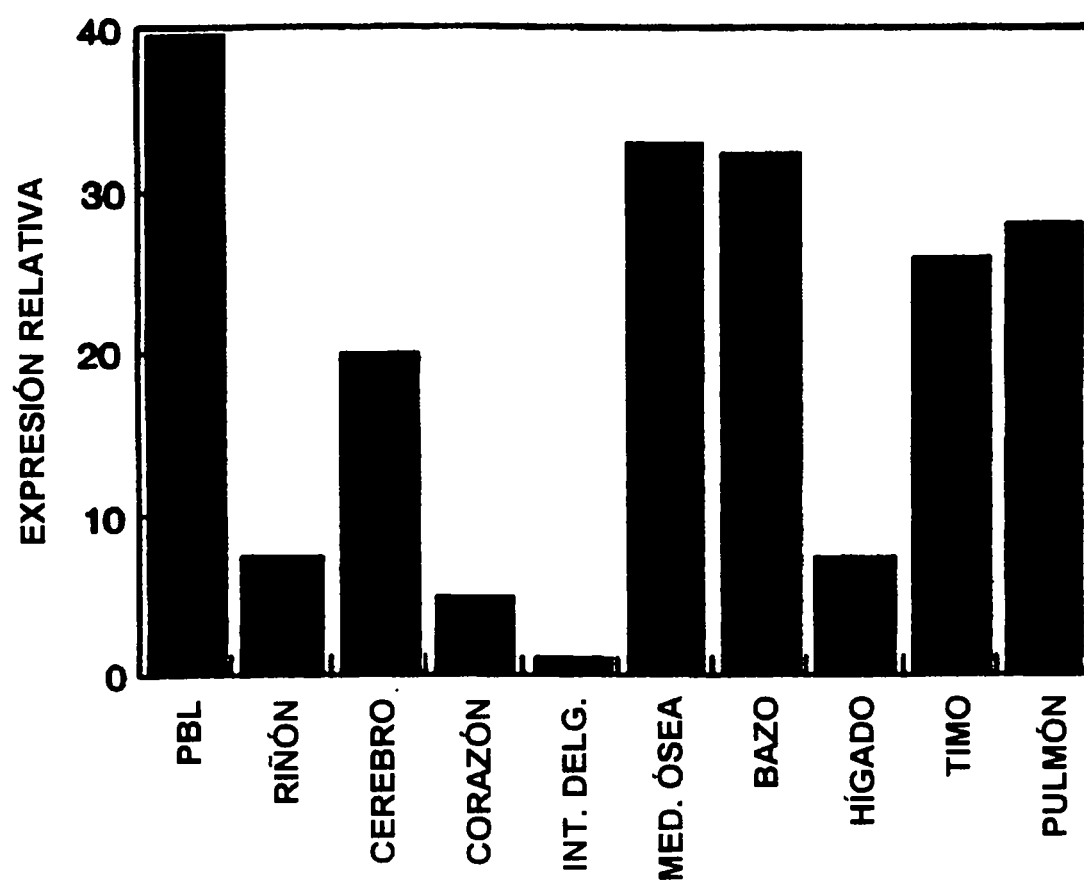


FIG. 6

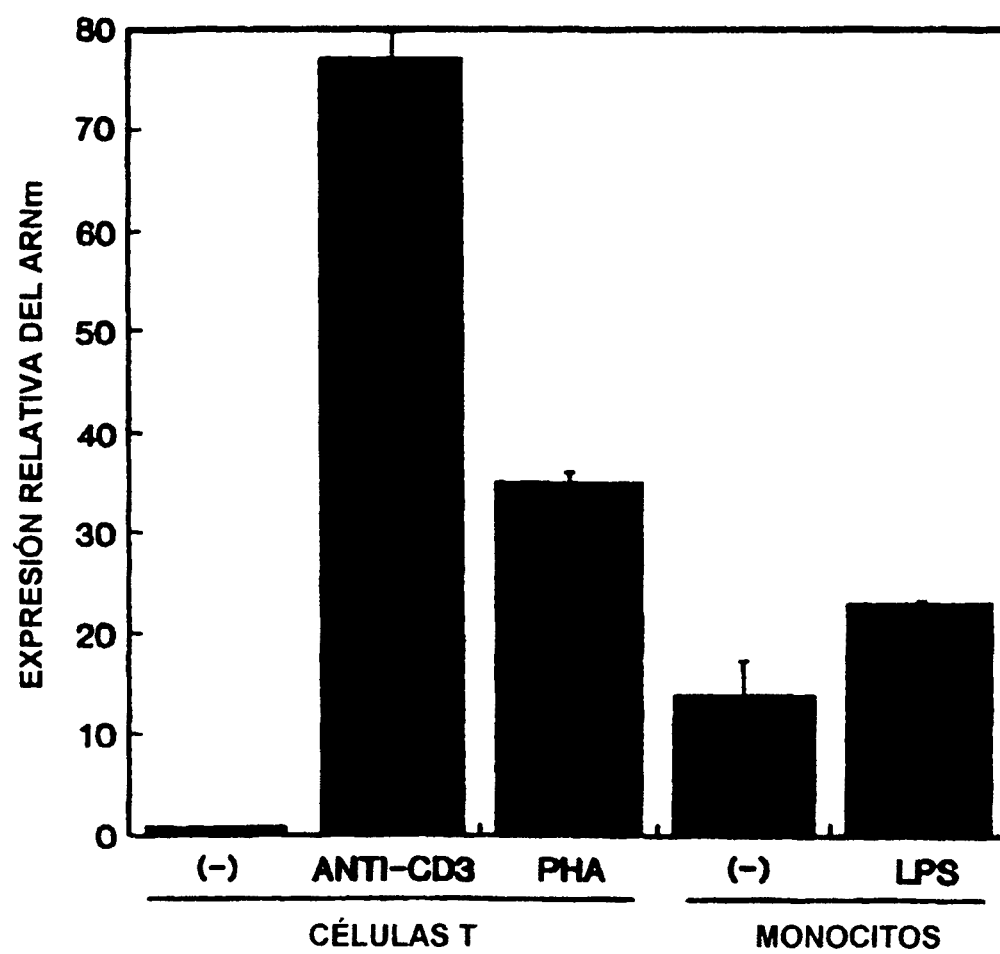


FIG. 7

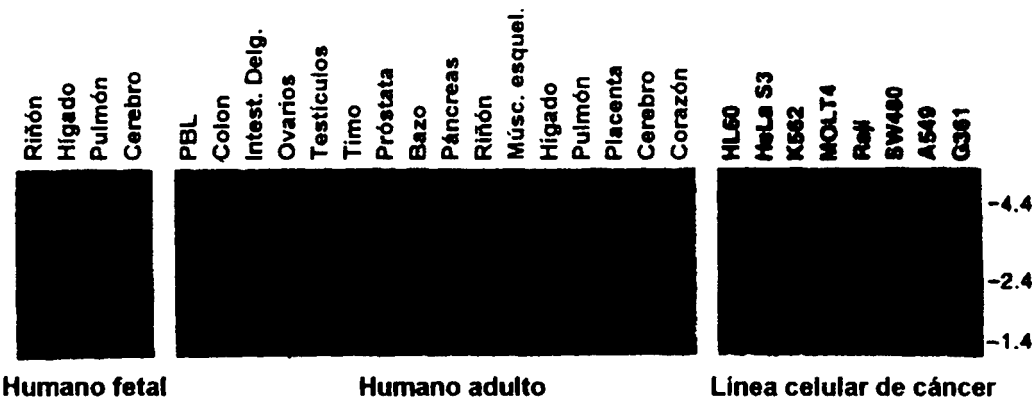


FIG. 8

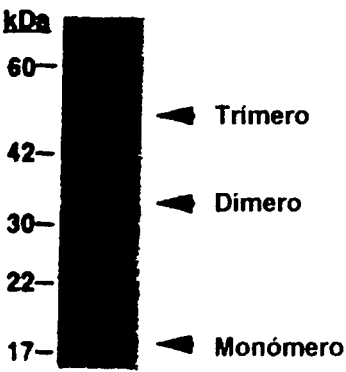


FIG. 9

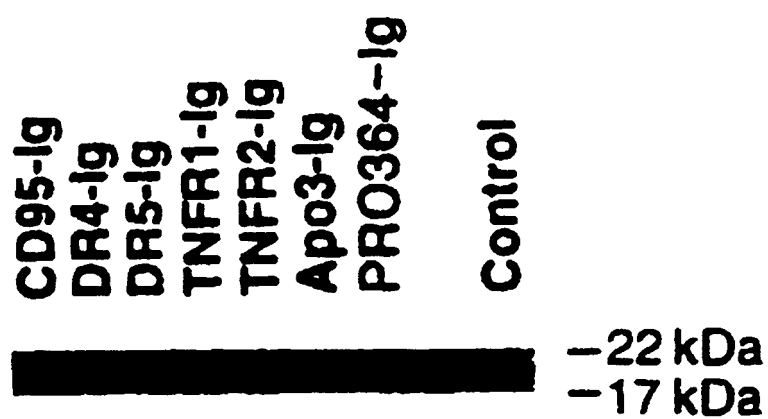


FIG. 10

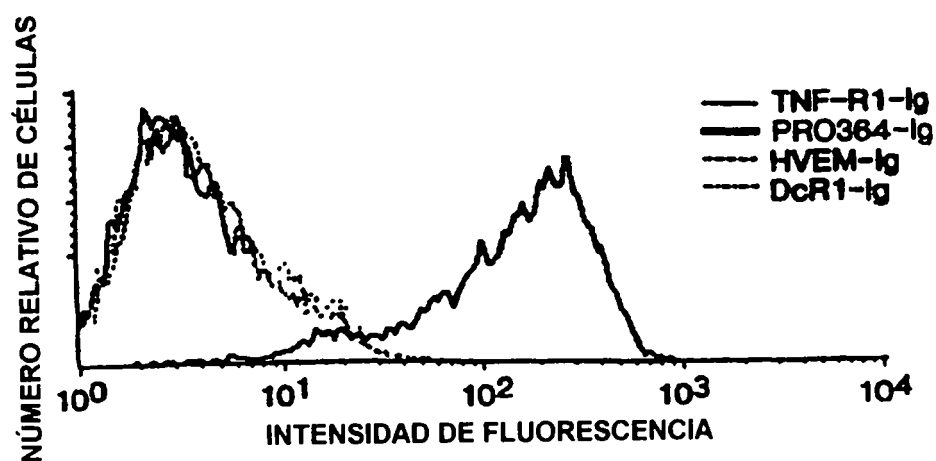


FIG. 11A

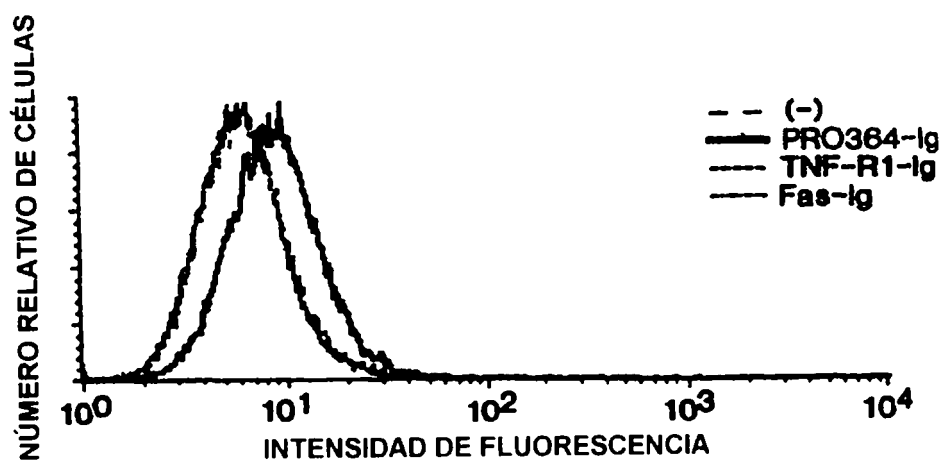


FIG. 11B

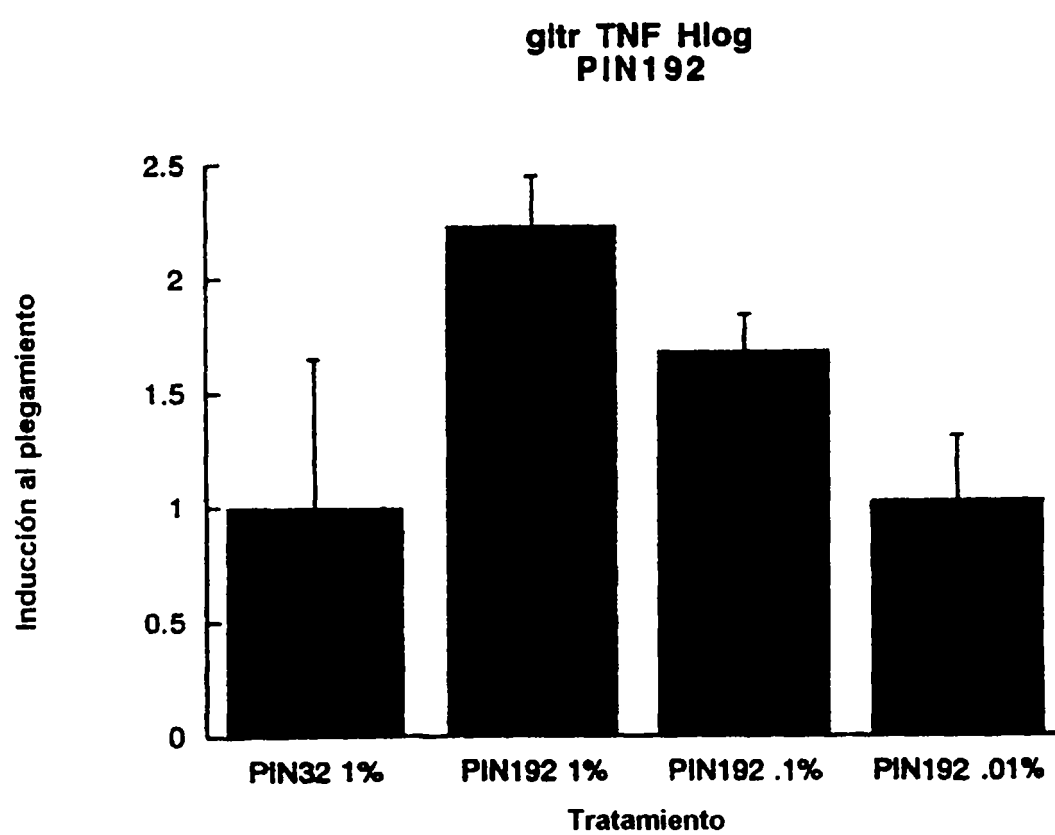


FIG. 12