



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 332 916**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05024729 .5**

(96) Fecha de presentación : **15.05.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1657256**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2006**

(54) Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de tumores.**

(30) Prioridad: **09.06.1999 US 138385 P
20.07.1999 US 144790 P
03.08.1999 US 146843 P
10.08.1999 US 148188 P
17.08.1999 US 149320 P
17.08.1999 US 149327 P
17.08.1999 US 149396 P
20.08.1999 US 150114 P
31.08.1999 US 151700 P
31.08.1999 US 151734 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.02.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.02.2010

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

(72) Inventor/es: **Botstein, David;
Goddard, Audrey;
Gurney, Austin L.;
Smith, Victoria;
Watanabe, Colin K. y
Wood, William I.**

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

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el tratamiento de tumores.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico y tratamiento de tumores.

Antecedentes de la invención

10 Los tumores malignos (cáncer) son la segunda causa de muerte en los Estados Unidos, después de las enfermedades del corazón (Boring *et al.*, CA Cancer J Clin., 43:7 [(1993)]).

15 El cáncer se caracteriza por el incremento en el número de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas, y la generación de células malignas que finalmente se extienden a través de la sangre o el sistema linfático hasta nódulos linfáticos regionales y hasta puntos distantes (metástasis). En un estado canceroso, una célula prolifera bajo condiciones en las que no crecerían células normales. El cáncer se manifiesta en una gran variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasión y agresividad.

20 La alteración de la expresión génica está íntimamente relacionada con el crecimiento incontrolado de células y la desdiferenciación, las cuales son una característica común a todos los cánceres. Se ha observado que los genomas de ciertos tumores bien estudiados muestran una menor expresión de genes recesivos, a los que habitualmente se hace referencia como genes supresores de tumores, que funcionarían normalmente para evitar el crecimiento de células malignas, y/o la sobreexpresión de ciertos genes dominantes, tales como oncogenes, que actúan para inducir el crecimiento maligno. Cada uno de estos cambios genéticos parece ser responsable de la importación de algunos de los rasgos que, agregados, representan el fenotipo neoplásico completo (Hunter, *Cell* 64, 1129 [1991]; Bishop, *Cell* 64, 235-248 [1991]).

30 Un mecanismo bien conocido de sobreexpresión de genes (por ejemplo, oncogén) en células cancerígenas es la amplificación génica. Este es un procedimiento en el que en el cromosoma de la célula ancestral se producen múltiples copias de un gen particular. El procedimiento implica la replicación no programada de la región del cromosoma que comprende el gen, seguido por la recombinación de los segmentos replicados de nuevo en el cromosoma (Alitalo *et al.*, *Adv. Cancer Res.* 47, 235-281 [1986]). Se cree que la sobreexpresión del gen va en paralelo con la ampliación génica, es decir, es proporcional al número de copias realizadas.

40 Se ha identificado que los proto-oncogenes que codifican factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento juegan papeles importantes en la patogénesis de varios tumores humanos, incluyendo cáncer de mama. Por ejemplo, se ha observado que el gen de ErbB2 humano (*erbB2*, también conocido como *her2* o *c-erbB-2*), que codifica un receptor de glicoproteína transmembrana de 185 kD (p185^{HER2}, HER2) relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se sobreexpresa en aproximadamente de un 25% a un 30% del cáncer de mama humano (Slamon *et al.*, *Science* 235: 177-182 [1987]; Slamon *et al.*, *Science* 244: 707-712 [1989]).

45 Se ha descrito que la amplificación génica de un protooncogén en un suceso implicado habitualmente en las formas más malignas de cáncer, y podría actuar como un factor predictivo del resultado clínico (Schwab *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer* 1, 181-193 [1990]; Alitalo *et al.*, *supra*). De este modo, la sobreexpresión de *erbB2* se considera habitualmente como un factor predictivo de un pronóstico pobre, especialmente en pacientes con enfermedad primaria que implica nódulos linfáticos axilares (Slamon *et al.*, [1987] y [1989], *supra*; Ravdin y Chamness, *Gene* 159: 19-27 [1995]; y Hynes y Stem, *Biochim. Biophys. Hacia* 1198: 165-184 [1994]) y se ha relacionado con la sensibilidad y/o resistencia a la terapia con hormonas y pautas quimioterapéuticas, incluyendo CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo) y antraciclinas (Baselga *et al.*, *Oncology* 11 (3 Suppl 1): 43-48 [1997]). Sin embargo, a pesar de la asociación de la sobreexpresión de *erbB2* con un pronóstico pobre, las probabilidades de pacientes con respuesta positiva a HER2 que respondían clínicamente al tratamiento con taxanos eran más de tres veces la de aquellos pacientes con respuesta negativa a HER2 (*Ibid*). Un anticuerpo monoclonal recombinante anti-ErbB2 humanizado (anti-HER2) (una versión humanizada del anticuerpo anti-ErbB2 murino 4D5, al que se hace referencia como rhuMAb HER2 o Herceptin™) ha sido clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastásicos que sobreexpresan ErbB2 que habían recibido terapia anticancerígena previa a la extensión. (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744 [1996]).

50 A la luz de lo anterior, existe un interés obvio en identificar nuevos procedimientos y composiciones que son útiles para el diagnóstico y tratamiento de tumores que están asociados con la amplificación génica.

Descripción resumida de la invención

A. Realizaciones

65 La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el diagnóstico del crecimiento de células neoplásicas y la proliferación en mamíferos, incluyendo humanos. La presente invención se basa en la identificación de genes que se amplifican en el genoma de células tumorales. Se espera que dicha amplificación génica esté asociada

ES 2 332 916 T3

con la sobreexpresión del producto génico. Por consiguiente, se cree que las proteínas codificadas por los genes amplificados son dianas útiles para el diagnóstico de ciertos cánceres y pueden actuar como factores predictivos del pronóstico del tratamiento de tumores.

- 5 En una realización, la presente invención se refiere a un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido designado en la presente invención como polipéptido PRO. En un aspecto, el anticuerpo aislado se une específicamente a un polipéptido PRO. A menudo, la célula que expresa el polipéptido PRO es una célula tumoral que sobreexpresa el polipéptido en comparación con una célula normal del mismo tipo de tejido. En aún otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que preferiblemente tiene residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) 10 no humana y residuos de una región armazón (“framework”) (FR) humana. El anticuerpo puede estar marcado y puede inmovilizarse en un soporte sólido. En aún otro aspecto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de cadena única, o un anticuerpo humanizado que se une, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido PRO.

15 También se describe en la presente invención una composición de materia que comprende un anticuerpo que se une, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido PRO en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En otro aspecto, la composición comprende un principio activo adicional que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo adicional o un agente citotóxico o quimioterapéutico. Preferiblemente, la composición es estéril.

20 En una realización adicional, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican anticuerpos anti-PRO y vectores y células huésped recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácidos nucleicos.

25 En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo anti-PRO, en el que el procedimiento comprende el cultivo de una célula huésped transformada con una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo en condiciones suficientes para permitir la expresión del anticuerpo y la recuperación del anticuerpo del cultivo celular.

30 En una realización adicional, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que se hibrida a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido PRO o el complemento de la misma. La molécula de ácido nucleico aislada es preferiblemente ADN, y la hibridación tiene lugar preferiblemente en condiciones de hibridación y lavado astringentes. Dichas moléculas de ácido nucleico pueden actuar como moléculas antisentido de los genes amplificados identificados en la presente invención que, a su vez, pueden ser útiles en la modulación de la transcripción y/o la traducción de los genes amplificados respectivamente, o como cebadores antisentido en reacciones de amplificación. Además, dichas secuencias se pueden utilizar como parte de una secuencia de ribozimas 35 y/o una secuencia de triple hélice que, a su vez, se pueden utilizar en la regulación de los genes amplificados.

40 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia de un polipéptido PRO en una muestra sospechosa de contener un polipéptido PRO, en el que el procedimiento comprende la exposición de la muestra a un anticuerpo anti-PRO y la determinación de la unión del anticuerpo a un polipéptido PRO en la muestra. En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar la presencia 45 de un polipéptido PRO en una célula, en el que el procedimiento comprende la exposición de la célula a un anticuerpo anti-PRO y la determinación de la unión del anticuerpo a la célula.

50 En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de un tumor en un mamífero, que comprende la detección del nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido PRO (a) en una muestra a analizar de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) en una muestra de control de células de tejido normal conocidas del mismo tipo de célula, donde un nivel de expresión superior en la muestra a analizar respecto a la muestra de control es indicativo de la presencia del tumor en el mamífero del cual se obtuvieron las células del tejido a analizar.

55 En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de tumores en un mamífero, que comprende (a) el contacto de un anticuerpo anti-PRO con una muestra a analizar de las células del tejido obtenido del mamífero, y (b) la detección de la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-PRO y un polipéptido PRO en la muestra a analizar, donde la formación de un complejo es indicativo de la presencia de un tumor en dicho animal. Una gran cantidad de complejos formados en la muestra a analizar indica la presencia del tumor en el mamífero del cual se han obtenido las células del tejido a analizar. El anticuerpo lleva preferiblemente una marca detectable. La formación 60 del complejo puede monitorizarse, por ejemplo, mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en el sector.

La muestra a analizar se obtiene normalmente de un individuo sospechoso de presentar un crecimiento o proliferación de células neoplásicas (por ejemplo, células cancerosas).

65 En otra realización, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico para el cáncer que comprende un anticuerpo anti-PRO y un portador (por ejemplo, un tampón) en un envase adecuado. El kit contiene instrucciones para utilizar el anticuerpo con el fin de detectar la presencia de un polipéptido PRO en una muestra sospechosa de contener el mismo.

B. Realizaciones adicionales

En otras realizaciones de la presente invención, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO.

5 En un aspecto, la molécula de ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos
aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido PRO con una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento definido específicamente de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

30 En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos con por lo menos
aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente
un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83%
35 de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos,
40 alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95%
45 de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificante de un ADNc de un polipéptido PRO
50 de longitud completa tal como se describe aquí, la secuencia codificante de un polipéptido PRO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, la secuencia codificante de un dominio extracelular de un polipéptido PRO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o la secuencia codificante de cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa, tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos con por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos.

ES 2 332 916 T3

de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por cualquier ADNc de proteína humana depositado en el ATCC tal como se describe aquí, o 10 (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

Otro aspecto de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO al que se ha eliminado el dominio transmembrana o bien, se ha inactivado el dominio transmembrana, o es complementaria a dicha secuencia de nucleótidos codificante, en la 15 que el dominio o dominios transmembrana de dicho polipéptido se describen en la presente invención. Por lo tanto, se contemplan los dominios extracelulares solubles de los polipéptidos PRO descritos en la presente invención.

También se describen fragmentos de una secuencia codificante del polipéptido PRO, o del complemento de la misma, que se pueden utilizar como, por ejemplo, sondas de hibridación, para los fragmentos codificantes de un polipéptido PRO que pueden opcionalmente codificar un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO o como sondas de oligonucleótidos antisentido. Dichos fragmentos de ácido nucleico son generalmente de por lo menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 110 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 130 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 140 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 160 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 170 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 190 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 250 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 350 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos unos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos unos aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos unos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 800 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos unos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos a la que se hace referencia más o menos el 10% de la longitud de referencia. Cabe indicar que los fragmentos nuevos de una secuencia 30 de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO pueden determinarse de forma rutinaria mediante el alineamiento de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido PRO con otras secuencias de nucleótidos conocidas mediante la utilización de cualquiera de los programas de alineamiento de secuencia conocidos y la determinación de qué fragmento o fragmentos de secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido PRO son nuevos. Todas dichas secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO se contemplan en la presente invención. También se contemplan 35 los fragmentos del polipéptido PRO codificados por estos fragmentos de moléculas de nucleótidos, preferiblemente aquellos fragmentos de polipéptido PRO que comprenden un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO.

En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido PRO aislado codificado por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico aisladas identificadas anteriormente en la presente invención.

55 En un determinado aspecto, la invención se refiere a un polipéptido PRO aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de

identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con un polipéptido PRO que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento definido específicamente de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polipéptido PRO aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNcs de proteínas humanas depositados en el ATCC tal como se describe aquí.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un polipéptido PRO aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una valoración de por lo menos aproximadamente un 80% de valores positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de positivos y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de positivos cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido PRO que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona un polipéptido PRO aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o la metionina de iniciación y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos tal como se ha descrito anteriormente en la presente invención. Los procesos para la producción del mismo también se describen en la presente invención, donde estos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped que comprende un vector el cual comprende la molécula de ácido nucleico codificante adecuada en condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido PRO y la recuperación del polipéptido PRO del cultivo celular.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un polipéptido PRO aislado al que se ha eliminado el dominio transmembrana o bien, se ha inactivado el dominio transmembrana. Los procesos para la producción del mismo también se describen en la presente invención, donde estos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped que comprende un vector el cual comprende la molécula de ácido nucleico codificante adecuada en condiciones apropiadas para la expresión del polipéptido PRO y la recuperación del polipéptido PRO del cultivo celular.

También se describen antagonistas de un polipéptido PRO nativo tal como se define aquí. El antagonista puede ser un anticuerpo anti-PRO o una molécula pequeña.

ES 2 332 916 T3

También se describe un procedimiento de identificación de antagonistas a un polipéptido PRO que comprende poner en contacto el polipéptido PRO con una molécula candidata y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO. Preferiblemente, el polipéptido PRO es un polipéptido PRO nativo.

5 En una realización adicional, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende un polipéptido PRO o un antagonista de un polipéptido PRO tal como se describe aquí, o un anticuerpo anti-PRO, en combinación con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Otra realización de la presente invención está dirigida al uso de un polipéptido PRO, o un antagonista del mismo tal como se ha descrito anteriormente en la presente invención, o un anticuerpo anti-PRO, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que es sensible al polipéptido PRO, un antagonista del mismo o un anticuerpo anti-PRO.

15 En realizaciones adicionales de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos aquí descritos. También se proporcionan células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células de *E. coli*, levaduras, o células de insecto infectadas con *Baculovirus*. Se proporciona además un proceso para la producción de cualquiera de los polipéptidos aquí descritos y comprende el cultivo de células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y la recuperación del polipéptido deseado del cultivo celular.

20 En otras realizaciones, la presente invención proporciona moléculas químéricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención fusionados a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. Los ejemplos de dichas moléculas químéricas comprenden cualquiera de los polipéptidos aquí descritos fusionados con una secuencia de un epítopo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

25 En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena única.

30 También se describen sondas de oligonucleótidos útiles para el aislamiento de secuencias de nucleótidos genómicas y de ADNc o como sondas antisentido, donde estas sondas pueden derivar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas anterior o posteriormente.

Breve descripción de las figuras

35 La figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID No. 15) de un ADNc que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia nativa PRO7422, donde la secuencia de nucleótidos (SEC Id No. 15) es un clón designado en la presente invención como DNA119536-2752. También se presenta en negrita y subrayada las posiciones de los respectivos codones de inicio y parada.

40 La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID No. 16) de un polipéptido PRO7422 de secuencia nativa derivada de la secuencia codificante de SEC ID No. 15 mostrada en la figura 1.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

Las frases “amplificación génica/de genes” y “duplicación génica/de genes” se utilizan indistintamente y se refieren a un proceso mediante el cual se forman múltiples copias de un gen o un fragmento de gen en una célula o línea celular concreta. A la región duplicada (un tramo de ADN amplificado) se hace referencia a menudo como “amplicón”. Normalmente, la cantidad de ARN mensajero (ARNm) producido, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en la proporción del número de copias realizadas del gen concreto expresado.

“Tumor”, tal como se utiliza aquí, se refiere al crecimiento y proliferación de todas las células neoplásicas, tanto malignas como benignas, y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de célula pequeña, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cérvix, cáncer de ovarios, cáncer hepático, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

“Tratamiento” es una intervención realizada con la intención de evitar el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Entre los necesitados del tratamiento se incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en

ES 2 332 916 T3

los que se previene el trastorno. En el tratamiento de un tumor (por ejemplo, un cáncer), un agente terapéutico puede disminuir directamente la patología de las células tumorales, o convertir el tumor en más susceptible al tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, la radiación y/o la quimioterapia.

5 La “patología” del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, un crecimiento celular anormal o incontrolado, metástasis, interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, la liberación de citoquinas u otros productos secretores a niveles anormales, la supresión o el agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

10 El término “mamífero” con el propósito de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo el hombre, animales domésticos y de granja, y animales del zoo, deportivos o de compañía, tales como perros, caballos, gatos, ganado, cerdos, ovejas, etc. Preferiblemente, el mamífero es el hombre.

15 “Vehículos”, tal como se utiliza aquí, incluyen los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos a la célula o al mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones utilizadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Ejemplos de vehículos aceptables fisiológicamente incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácido orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferiores a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como 20 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 EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

25 La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (a la vez) y la administración consecutiva en cualquier orden.

30 El término “agente citotóxico”, tal como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como toxinas activas enzimáticamente derivadas de bacterias, hongos, plantas o animales o fragmentos de los mismos.

35 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido (“Ara-C”), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y doxetaxel (Taxotero, Rhone-PoulencRorer, Antony, Francia), toxotero, metotrexato, cisplatino, melfalan, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, 40 dauromicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la patente de Estados Unidos No. 4.675.187), 5-FU, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, actinomicina D, VP-16, clorambucil, melfalan y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción de la hormona sobre los tumores, tales como el tamoxifeno y la onapristona.

45 Un “agente inhibidor del crecimiento”, cuando se utiliza aquí, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente de células cancerosas que sobreexpresan cualquiera de los genes aquí identificados, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan dichos genes en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un momento distinto a la fase S), tales como agentes que inducen la detención en fase G1 y fase M. Los bloqueantes típicos de fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol, y los inhibidores de la topo II, tal como la doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Estos agentes que bloquean la fase G1 también afectan a la detención en la fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede hallarse información adicional en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado “Cell Cycle Regulation, oncogens and antineoplastic drugs” por Murakami y *et al.*, (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la página 13.

55 La “doxorubicina” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

60 El término “citoquina” es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de dichas citoquinas son las linfocinas, las monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas, la hormona del crecimiento, tal como la hormona del crecimiento humano, la hormona N-metionil del crecimiento humano y la hormona del crecimiento bovino; la hormona paratiroides; la tiroxina; la insulina; la relaxina; la prorelaxina; las hormonas glicoproteicas, tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), la hormona estimuladora de la tiroideas (TSH), y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático, el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor α y β de necrosis tumoral; la sustancia inhibidora mülleriana; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina

(TPO); los factores de crecimiento nerviosos, tales como NGF- β ; el factor de crecimiento de plaquetas; los factores de crecimiento transformantes (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β ; los factores I y II de crecimiento de tipo insulina; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductivos; los interferones, tales como los interferones α , β y γ , los factores estimuladores de colonias (CSFs), tales como el CSF de macrófagos (M-CSF); el CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y el CSF de granulocitos (G-CSF); las interleuquinas (ILs), tales como la IL-1, la IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β ; y otros factores polipeptídicos incluyendo el LIF y el ligando kit (KL). Tal como se utiliza aquí, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o del cultivo de células recombinantes y los equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

- 10 El término “profármaco”, tal como se utiliza en esta solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para las células tumorales en comparación con el fármaco parental y es capaz de ser activado enzimáticamente o convertido en la forma parental más activa. Véase, por ejemplo, Willman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy, Biochemical Society Transactions”, 14:375-382, 615th Meeting, 15 Belfast (1986), y Stella y *et al.*, “Prodrugs: A Chemical approach to targeted drug delivery”, Directed Drug Delivery, Borchardt y *et al.*, (ed.) pág. 147-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero sin limitación, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiosfosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados por D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen β -lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos 20 o profármacos que contienen fenilacetamida copionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivarse en forma de profármaco para su utilización en la presente invención, pero sin limitación, son los agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.
- 25 Una “cantidad eficaz” de un polipéptido descrito aquí o un antagonista del mismo, respecto a la inhibición del crecimiento de células neoplásicas, el crecimiento tumoral o el crecimiento de células cancerosas, es una cantidad capaz de inhibir, en cierta magnitud, el crecimiento de células diana. El término incluye una cantidad capaz de invocar un efecto inhibidor del crecimiento, citostático y/o citotóxico y/o la apoptosis de las células diana. Una “cantidad eficaz” de un antagonista del polipéptido PRO para los objetivos de inhibir el crecimiento de células neoplásicas, el crecimiento del tumor o el crecimiento de células cancerosas, puede determinarse empíricamente y de forma rutinaria.

30 Una “cantidad terapéuticamente eficaz”, en referencia al tratamiento del tumor, se refiere a una cantidad capaz de provocar uno o más de los efectos siguientes: (1) inhibición, en cierta magnitud, del crecimiento tumoral, incluyendo, la ralentización y la completa detención del crecimiento; (2) la reducción en el número de células tumorales; (3) la 35 reducción en el tamaño del tumor; (4) la inhibición (es decir, la reducción, la ralentización o la completa detención) de la infiltración de células tumorales en los órganos periféricos; (5) la inhibición (es decir, la reducción, la ralentización o la completa detención del crecimiento) de metástasis; (6) aumento de la respuesta inmune antitumoral, que puede, aunque no necesariamente, dar como resultado la regresión o el rechazo del tumor; y/o (7) alivio, en cierta magnitud, de uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un antagonista del polipéptido PRO para los objetivos del tratamiento del tumor puede determinarse empíricamente y de forma rutinaria.

40 Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un antagonista de PRO es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un antagonista de PRO con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas 45 puede determinarse empíricamente y de forma rutinaria.

Una “cantidad citotóxica” de un antagonista de PRO es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad citotóxica” de un antagonista de PRO con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas puede determinarse empíricamente y de forma rutinaria.

50 Los términos “polipéptido PRO” y “PRO”, tal como se utilizan aquí, y cuando van seguidos inmediatamente por una denominación numérica, se refieren a diversos polipéptidos, donde la denominación completa (es decir, PRO/número) hace referencia a secuencias polipeptídicas específicas tal como se describen aquí. Los términos “polipéptido PRO/número” y “PRO/número” donde el término “número” que se proporciona como una denominación numérica real tal como se utiliza aquí, abarca los polipéptidos de secuencia nativa y las variantes polipeptídicas (que se describen en detalle en la presente invención). Los polipéptidos PRO descritos aquí pueden aislar de diversas fuentes, tales como tipos de tejidos humanos o de otras fuentes, o prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos.

55 Un “polipéptido PRO de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido PRO derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos PRO de secuencia nativa pueden aislar de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido PRO de secuencia nativa” abarca específicamente las formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido PRO específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas (“spliced”) alternativamente) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En varias realizaciones de la invención, los polipéptidos PRO de secuencia nativa descritos aquí son polipéptidos de secuencia nativa madura o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa que se muestran

ES 2 332 916 T3

en las figuras acompañantes. Los codones de inicio y parada se muestran en negrita y subrayados en las figuras. Sin embargo, mientras que el polipéptido PRO descrito en las figuras acompañantes se inicia con los residuos de metionina denominados aquí como aminoácido en la posición 1 en las figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina localizados cadena arriba o cadena abajo de la posición 1 de aminoácidos en las figuras puedan utilizarse 5 como el residuo de aminoácido de partida de los polipéptidos PRO.

El “dominio extracelular” o “ECD” del polipéptido PRO se refiere a una forma del polipéptido PRO que está libre esencialmente de los dominios transmembrana y citoplasmático. Generalmente, un ECD del polipéptido PRO tendrá menos del 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y preferiblemente, tendrá menos del 0,5% de 10 dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos PRO de la presente invención se identifican siguiendo los criterios utilizados habitualmente en la técnica para la identificación de ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero más probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio tal como inicialmente 15 se identificó aquí. Opcionalmente, por tanto, un dominio extracelular de un polipéptido PRO puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier extremo de los límites del dominio transmembrana/dominio extracelular tal como se identifica en los Ejemplos o la memoria y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica, están contemplados por la presente invención.

La localización aproximada de los “péptidos señal” de diversos polipéptidos PRO descritos aquí se muestran en 20 la presente memoria y/o las figuras acompañantes. Se ha de remarcar, sin embargo, que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero más probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del límite C-terminal del péptido señal tal como se identificó inicialmente aquí, donde el límite C-terminal del péptido señal puede identificarse según el criterio utilizado de forma rutinaria en la técnica para identificar 25 el tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y *et al.*, Prot Eng, 10:1-6 (1997) y von Heinje y *et al.*, Nucl Acids Res, 14:4683-4690 (1986)). Además, también se ha reconocido, que, en algunos casos, la división de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es totalmente uniforme, dando como resultado más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, cuando su péptido señal se corta en no más de aproximadamente 5 30 aminoácidos por cualquier extremo del límite C-terminal del péptido señal identificado aquí, y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados por la presente invención.

“Variante de polipéptido PRO” significa un polipéptido PRO activo tal como se define anterior o posteriormente que tiene por lo menos aproximadamente el 80% de identidad en la secuencia con una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido PRO que carece de la secuencia señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, 35 tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal como se describe aquí. Dichas variantes de polipéptido PRO incluyen, por ejemplo, los polipéptidos PRO en donde uno o más residuos de aminoácido se añaden, o eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Generalmente, una variante de polipéptido PRO tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de 40 identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo 45 menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de 50 aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% 55 de identidad en la secuencia de aminoácidos y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de un polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido PRO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal como se describe aquí. 60 Generalmente, los polipéptidos variantes de PRO tienen una longitud de por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos, alternativamente de por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos 65 aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos 70 aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos

ES 2 332 916 T3

aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente de por lo menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

- El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del polipéptido PRO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de PRO, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se obtienen tal como se describe a continuación utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.
- Para los objetivos de la presente invención, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

30

$$100 \text{ veces la fracción X/Y}$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizando este procedimiento, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada “Proteína de comparación” a la secuencia de aminoácidos denominada “PRO”.

A menos que se afirme específicamente lo contrario, los valores en % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe anteriormente utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad en la secuencia de aminoácidos también se pueden determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCI-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCI-BLAST2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, donde todos estos parámetros de búsqueda se fijan a los valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, “unmask (desenmascarado) = yes (sí)”, “strand (hebra) = all (todas)”, “expected occurrences (sucsesos esperados) = 10”, “minimum low complexity length (longitud mínima de complejidad baja) = 15/5”, “multi-pass e-value (e-valor de multipaso) = 0,01”, “constant for multi-pass (constante de multi-paso) = 25”, “dropoff for final gapped alignment (disminución para alineación con espacios final) = 25” y “scoring matrix (matriz de puntuación) = BLOSUM 62”.

En las situaciones en las que se utiliza NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

60

$$100 \text{ veces la fracción X/Y}$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A.

Además, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos también se puede determinar utilizando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento (“overlap span”) = 5 1, fracción de solapamiento (“overlap fraction”) = 0,125, umbral de palabra (“word threshold”) T = 11, y matriz de puntuación (“scoring matrix”) = BLOSUM 62. Para los objetivos de la presente invención, el valor en % de identidad en la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido PRO nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra 10 la que se compara el polipéptido PRO de interés que puede ser un polipéptido variante PRO) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la afirmación “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos la secuencia de aminoácidos de B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos 15 del polipéptido PRO de interés.

El “polinucleótido variante PRO” o “secuencia de ácidos nucleicos variante de PRO” significa una molécula de ácido nucleico que codifica una polipéptido PRO activo tal y como se define a continuación y que tiene por lo menos 20 aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa y de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Habitualmente, un polinucleótido variante PRO tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos 25 aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos 30 aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos 35 aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos 40 aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos 45 aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa y longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

Normalmente, los polinucleótidos variantes PRO tienen por lo menos 30 nucleótidos de longitud, alternativamente 50 por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos 55 aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos 600 aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos 700 aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifica el PRO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido PRO, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad 65 en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiado para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la máxima alineación sobre la longitud completa

ES 2 332 916 T3

de las secuencias en comparación. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se obtienen tal como se describe a continuación utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

Para los objetivos de la presente invención, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción W/Z}$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizando este procedimiento, las Tablas 2C y 2D demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos denominada "ADN de comparación" a la secuencia de ácidos nucleicos denominada "PRO-DNA".

A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe anteriormente utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se puede determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCI-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCI-BLAST2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, donde todos estos parámetros de búsqueda se fijan a los valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, "unmask (desenmascarado) = yes (sí)", "strand (hebra) = all (todas)", "expected occurrences (sucesos esperados) = 10", "minimum low complexity length (longitud mínima de complejidad baja) = 15/5", "multi-pass e-value (e-valor de multipaso) = 0,01", "constant for multi-pass (constante de multi-paso) = 25", "dropoff for final gapped alignment (disminución para alineación con espacios final) = 25" y "scoring matrix (matriz de puntuación) = BLOSUM 62".

En las situaciones en las que se utiliza NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción W/Z}$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C.

Además, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se pueden generar utilizando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento ("overlap span") = 1, fracción de solapamiento ("overlap fraction") = 0,125, umbral de palabra ("word threshold") T = 11, y matriz de puntuación ("scoring matrix") = BLOSUM 62. Para los objetivos de la presente invención, el valor en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se determina dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de secuencia nativa y la molécula de ácido nucleico de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés que puede ser un polipéptido variante PRO) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido

ES 2 332 916 T3

PRO de interés. Por ejemplo, en la afirmación “un molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a la secuencia de ácidos nucleicos de B”, la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácidos nucleicos B es la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés.

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes PRO son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido PRO activo y que son capaces de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado astrin-gentes, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido PRO mostrado en las figuras que se acompañan. Los polipéptidos variantes PRO pueden ser aquéllos codificados por un polinucleótido variante PRÓ.

El término “positivos”, en el contexto de comparaciones de identidad en las secuencias de aminoácidos realizado tal y como se ha descrito anteriormente, incluye residuos en las secuencias comparadas que no son sólo idénticos, sino que también tienen propiedades similares. Los residuos de aminoácidos que puntúan con un valor positivo a un residuo de aminoácido de interés son aquellos que son idénticos al residuo de aminoácido de interés o son una sustitución preferida (tal como se define en la siguiente Tabla 3) del residuo de aminoácido de interés.

Para los objetivos de la presente invención, el valor en % de positivos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de positivos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos que identifican un valor positivo tal y como se ha definido anteriormente por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de positivos de A a B no será igual al % de positivos de B a A.

El término “aislado”, cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Preferiblemente, el polipéptido aislado está libre de la asociación con todos los componentes con los que se asocia de forma natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido PRO no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica un polipéptido PRO o un ácido nucleico “aislado” que codifica un anticuerpo anti-PRO es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO o el ácido nucleico que codifica el anti-PRO. Preferiblemente, el ácido nucleico aislado está libre de la asociación con todos los componentes con los que se asocia de forma natural. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el PRO o una molécula de ácido nucleico que codifica el anti-PRO están en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se diferencian de la molécula de ácido nucleico que codifica el PRO o la molécula de ácido nucleico que codifica el anti-PRO tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido PRO o una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-PRO incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el PRO o moléculas de ácido nucleico que codifica el anti-PRO contenidas en células que normalmente expresan los polipéptidos PRO o expresan anticuerpos anti-PRO, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido 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 a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la

traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

- 5 El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-PRO individuales (incluyendo antagonista, y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-PRO con especificidad polipeptídica, anticuerpos anti-PRO de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-PRO (ver a continuación). El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

10 La “astringencia” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda 15 y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

20 25 “Condiciones astringentes” o “condiciones de astringencia elevada”, tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 30 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de astringencia elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

35 40 Las “condiciones moderadamente astringentes” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluye la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 35-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

45 50 El término “epítopo etiquetado”, cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido químérico que comprende un polipéptido PRO fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítopo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítópos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

55 60 “Activo” o “actividad” para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de un polipéptido PRO que retiene una actividad/propiedad biológica y/o inmunológica de un polipéptido PRO nativo o natural, donde la actividad “biológica” se refiere a una función (inhibidora o estimuladora) provocada por un polipéptido PRO nativo o natural que es diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que se encuentra en un polipéptido PRO nativo o natural y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que se encuentra en un polipéptido PRO nativo o natural.

65 “Actividad biológica” en el contexto de un anticuerpo u otra molécula antagonista que puede identificarse mediante ensayos de cribado descritos aquí (por ejemplo, una molécula pequeña orgánica o inorgánica, péptido, etc.) se utiliza para referirse a la capacidad de dichas moléculas para unirse o formar complejos con los polipéptidos codificados por los genes amplificados identificados aquí, o en cualquier caso, que interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares o, en cualquier caso, que interfieren con la transcripción o traducción de un polipéptido PRO. Una actividad biológica preferida es la inhibición del crecimiento de una célula tumoral diana. Otra actividad biológica preferida es la actividad citotóxica que da lugar a la muerte de las células tumorales diana.

ES 2 332 916 T3

El término “actividad biológica” en el contexto de un polipéptido PRO significa la capacidad de un polipéptido PRO para inducir el crecimiento de células neoplásicas o el crecimiento celular incontrolado.

5 El término “actividad inmunológica” significa la reactividad cruzada inmunológica con por lo menos un epítopo de un polipéptido PRO

El término “reactividad inmunológica cruzada”, tal como se utiliza aquí, significa que el polipéptido candidato es capaz de inhibir competitivamente la actividad biológica cualitativa de un polipéptido PRO que tiene esta actividad con el antisero policlonal generado contra el polipéptido PRO activo conocido. Dicho antisero se prepara de manera convencional mediante inyección a cabras o conejos, por ejemplo, subcutáneamente con el análogo activo conocido en adyuvante completo de Freund, seguido de una inyección de recuerdo intraperitoneal o subcutánea en adyuvante incompleto de Freund. La reactividad inmunológica cruzada es preferiblemente “específica”, lo que significa que la afinidad de unión de la molécula identificada que reacciona inmunológicamente de forma cruzada (por ejemplo, el anticuerpo), con respecto al correspondiente polipéptido PRO es significativamente superior (preferiblemente de por lo menos 2 veces, más preferiblemente de por lo menos 4 veces, aún más preferiblemente de por lo menos 8 veces, lo más preferente de por lo menos 10 veces superior) que la afinidad de unión de dicha molécula con cualquier otro polipéptido nativo conocido.

20 El término “antagonista” se utiliza en el sentido amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo PRO descrito aquí, o su transcripción o traducción. Moléculas antagonistas adecuadas incluyen específicamente los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, fragmentos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, ácidos nucleicos anti-sentido, etc., antagonistas. Se incluyen procedimientos para identificar antagonistas de un polipéptido PRO con una molécula antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido PRO.

25 Una “molécula pequeña” se define aquí con un peso molecular de aproximadamente 500 Daltons.

30 “Anticuerpos” (Abs) e “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras que los anticuerpos presentan una especificidad de unión con un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de la especificidad del antígeno. Los polipéptidos del último tipo son, por ejemplo, producidos a niveles bajos por el sistema linfático y a niveles aumentados por mielomas. El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente, sin limitación, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlónicos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre que presenten la actividad biológica deseada.

40 “Anticuerpos nativos” e “inmunoglobulinas nativas” son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por enlace disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de isotipos distintos de inmunoglobulinas. Cada cadena ligera y pesada también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable 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 cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman un punto de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

50 El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren extensamente en la secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente entre los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones de armazón (“framework”) (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan mayoritariamente una configuración en lámina β , conectadas por las tres CDRs, que forman bucles de conexión y en algunos casos forman parte de la estructura en lámina β . Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por medio de las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, NIH Publ. No. 91-3242, vol. I, páginas 647-669 (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo con el antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tal como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

65 El término “región hipervariable”, cuando se utiliza aquí, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región determinante de la complementariedad” o “CDR” (es decir, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5^a ed., Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD. [1991]) y/o los residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52

ES 2 332 916 T3

(L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de cadena pesada; Clothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 [1987]). Los residuos de “armazón” o “FR” son aquellos residuos de dominio variable distintos a los residuos de la región hipervariable tal como se define aquí.

5 Los “fragmentos de anticuerpo” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab’, F(ab’)₂ y los fragmentos Fv; los diacuerpos; los anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, Protein Eng., 8(10):1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados por fragmentos de anticuerpos.

10 La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento (Fab’)₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y es capaz de unirse de forma cruzada con el antígeno.

15 “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión a antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDRs confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv 20 que comprende sólo tres CDRs específicas para el antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

25 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 en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab’-SH es la denominación aquí para Fab’ en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes contienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab’)₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos Fab’ con una bisagra de cisteínas entre ambos. También son conocidas otras uniones químicas de fragmentos de anticuerpos.

30 30 Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

35 35 Las inmunoglobulinas pueden agruparse en cinco clases diferentes dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Las cinco clases principales de inmunoglobulinas son: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM y algunas de ellas pueden a su vez dividirse en subclases (o isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan respectivamente α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

40 40 El término “anticuerpo monoclonal”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un único sitio antigenóico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (políclonales), que incluyen habitualmente anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales presentan la ventaja de que son sintetizados por el cultivo de hibridomas, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El calificativo “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo al obtenerse de una población esencialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere un procedimiento particular para su producción. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse por el procedimiento del hibridoma descrito pro primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256:495 [1975], o por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislar, por ejemplo, de bibliotecas de anticuerpos en fagos según las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628 [1991] y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).

45 45 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) “químéricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras el resto de la cadena o cadenas es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 6851-6855 [1984]).

50 50 Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de éstas (tales como Fv, Fab, Fab’, F(ab’)₂) u otras subsecuencias de unión al antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana.

Para la mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en los que los residuos de una CDR del receptor son sustituidos por los residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como de ratón, rata o conejo, con la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de FR de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos.

5 Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o armazón importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase 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 PRIMATIZADO™ en el que la región de unión al antígeno deriva de un anticuerpo producido por inmunización de monos macacos con el 10 antígeno de interés.

15

Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para 20 la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

30 Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilizaciones de diagnóstico y terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos y no proteináceos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

45 La palabra "marcador", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que son detectables. Entre los radionucleidos que pueden servir como marcadores detectables se incluyen, por ejemplo, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212 y Pd-109. El marcador puede ser también una entidad no detectable, tal como una toxina.

50 Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente invención incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), de polisacáridos (por ejemplo, agarosa), de poliacrilamidas, de poliestireno, de polivinil alcohol y de siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede 55 comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la patente de Estados Unidos no. 4.275.149.

60 Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido PRO o anticuerpo para el mismo y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

65 Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "inmunoadhesina" designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente del reconocimiento y sitio de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina.

ES 2 332 916 T3

La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

Tal como se muestra más adelante, la Tabla 1 proporciona el código de fuente completo para el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Este código de fuente puede ser recopilado de forma rutinaria para utilizarse en un sistema operativo UNIX para proporcionar el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2.

Además, las tablas 2A-2D muestran los ejemplos hipotéticos para utilizar el procedimiento descrito más abajo para la determinación del % de identidad en la secuencia de aminoácidos (tablas 2A-2B) y el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos (Tablas 2C-2D) mediante la utilización del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, donde “PRO” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido hipotético PRO de interés. “Proteína de comparación” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra la que se compara el polipéptido “PRO” de interés. “PRO-DNA” representa una secuencia hipotética de ácido nucleico que codifica el PRO de interés. “ADN de comparación” representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que se compara la molécula de ácido nucleico “PRO-DNA” de interés. Las letras “X”, “Y” y “Z” representan cada una diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos y “N”, “L” y “V” representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos.

TABLA 1

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

10 #define MAXJMP    16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP    24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define J MPS   1024     /* max jmps in an path */
#define MX      4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

15 #define DMAT     3       /* value of matching bases */
#define DMIS     0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0    8       /* penalty for a gap */
#define DINS1     1       /* penalty per base */
#define PINSO    8       /* penalty for a gap */
20 #define PINSI    4       /* penalty per residue */

25 struct jmp {
    short          n[MAXJMP];    /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP];    /* base no. of jmp in seq x */
};                                /* limits seq to 2^16 -1 */

30 struct diag {
    int             score;        /* score at last jmp */
    long            offset;       /* offset of prev block */
    short           ijmp;         /* current jmp index */
    struct jmp     jp;           /* list of jmps */
};

35 struct path {
    int             spc;          /* number of leading spaces */
    short           n[J MPS];     /* size of jmp (gap) */
    int             x[J MPS];     /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

40 char            *ofile;        /* output file name */
char            *namex[2];     /* seq names: getseqs() */
char            *prog;          /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];       /* seqs: getseqs() */
45 int             dmax;          /* best diag: nw() */
int             dmax0;         /* final diag */
int             dna;            /* set if dna: main() */
int             endgaps;       /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;    /* total gaps in seqs */
50 int             len0, len1;    /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;  /* total size of gaps */
int             smax;          /* max score: nw() */
int             *xbm;           /* bitmap for matching */
long            offset;         /* current offset in jmp file */
55 struct diag    *dx;           /* holds diagonals */
struct path     pp[2];        /* holds path for seqs */

60 char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_malloc();

```

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5      /* Needleman-Wunsch alignment program
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';' or '>' or '<' are ignored
10     Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
15
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
20     1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
25     1, 2 |(1 < < ('D'-'A'))|(1 < < ('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
     128, 256, 0xFFFFFFFF, 1 < < 10, 1 < < 11, 1 < < 12, 1 < < 13, 1 < < 14,
     1 < < 15, 1 < < 16, 1 < < 17, 1 < < 18, 1 < < 19, 1 < < 20, 1 < < 21, 1 < < 22,
     1 < < 23, 1 < < 24, 1 < < 25 |(1 < < ('E'-'A'))|(1 < < ('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
30     int     ac;
     char   *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

40     endgaps = 0;           /* 1 to penalize endgaps */
     ofile = "align.out";      /* output file */

     nw();          /* fill in the matrix, get the possible jmps */
     readjmps();    /* get the actual jmps */
     print();       /* print stats, alignment */

45     cleanup(0);      /* unlink any tmp files */
}

```

55

60

65

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5      /* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith. PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
10     nw()
{
    char      *px, *py;      /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;   /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;    /* keep track of delx */
    int       *tmp;          /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;           /* score for each type */
    int       ins0, ins1;    /* insertion penalties */
    register  id;            /* diagonal index */
    register  ij;            /* jmp index */
    register  *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;        /* index into seqs */

15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

    dx = (struct diag *)g_malloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_malloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_malloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_malloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_malloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;      /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

...DW
5   for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
            mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
            mis += _day[*px-'A']|*py-'A';
10
        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongoing del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
15       if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
            if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                ndely[yy] = 1;
            } else {
                dely[yy] -= ins1;
                ndely[yy]++;
            }
        } else {
            if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                ndely[yy] = 1;
            } else
                ndely[yy]++;
        }
20
        /* update penalty for del in y seq:
         * favor new del over ongoing del
         */
25       if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
            if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                ndelx = 1;
            } else {
                delx -= ins1;
                ndelx++;
            }
40       } else {
            if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                ndelx = 1;
            } else
                ndelx++;
        }
45
        /* pick the maximum score: we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
50
}

```

55

60

65

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

      ...DW
5   id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely(yy))
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely(yy)) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dma || (ndelx >= MAXJMP
10   && xx > dx[id].jp.x[ij] + MX) || mis > dx[id].score + DINS0)) {
        dx[id].jmps[id].jmp += 1;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
20   else {
        coll[yy] = dely(yy);
        ij = dx[id].ijmp;
        if (dx[id].jp.n[0] && (!dma || (ndely >= MAXJMP
25   && xx > dx[id].jp.x[ij] + MX) || mis > dx[id].score + DINS0)) {
            dx[id].jmps[id].jmp += 1;
            if (++ij >= MAXJMP) {
                writejmps(id);
                ij = dx[id].ijmp = 0;
                dx[id].offset = offset;
                offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
            }
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely(yy);
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely(yy);
}
30   if (xx == len0 && yy < len1) {
        /* last col
         */
        if (endgaps)
            coll[yy] -= ins0 + ins1 * (len1 - yy);
        if (coll[yy] > smax) {
            smax = coll[yy];
            dmax = id;
}
40   }
}
45   if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0 + ins1 * (len0 - xx);
    if (coll[yy-1] > smax) {
        smax = coll[yy-1];
        dmax = id;
}
50   }
    tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
55   (void) free((char *)ndely);
    (void) free((char *)dely);
    (void) free((char *)col0);
    (void) free((char *)coll);
}


```

60

65

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array pp[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * numst() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

5      #include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE   256 /* maximum output line */
#define P_SPC    3 /* space between name or num and seq */

10     extern _day[26][26];
int    olen;           /* set output line length */
FILE   *fx;            /* output file */

20     print()
{
25       int ix, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */
30       if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
35         fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
          cleanup();
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        ix = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
40       if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
45         pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
          ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
          pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
          ix -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
50         lastgap = len0 - dmax0 - 1;
         ix += lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
          lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
          ly += lastgap;
        }
        getmat(ix, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();
      }

55

```

60

65

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5      /*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
10     getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)           getmat
{
    int      lx, ly;                            /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                /* leading/trailing overlap */
15     {
        int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char     ouix[32];
        double   pct;
        register  n0, n1;
        register char  *p0, *p1;

20     /* get total matches, score
 */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;

25     nm = 0;
        while (*p0 && *p1) {
            if (siz0) {
                p1++;
                n1++;
                siz0--;
            }
            else if (siz1) {
                p0++;
                n0++;
                siz1--;
            }
            else {
                if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                    nm++;
                if (n0++ == pp[0].x[i0])
                    siz0 = pp[0].n[i0]++;
                if (n1++ == pp[1].x[i1])
                    siz1 = pp[1].n[i1]++;
                p0++;
                p1++;
            }
        }
    }

45     /* pct homology:
 * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
 * else, knock off overhangs and take shorter core
 */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.* (double)nm / (double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match% in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
    nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
55

```

60

65

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5      fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);           ...getmat
      if (gapx) {
          (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)", 
                           ngapx, (DNA)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
          fprintf(fx, "%s", outx);
      }
10     fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
      if (gapy) {
          (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)", 
                           ngapy, (DNA)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
          fprintf(fx, "%s", outx);
      }
15     if (DNA)
          fprintf(fx,
                  "<n< score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                  smax, DMAT, DMIS, DINSO, DINSI);
      else
          fprintf(fx,
                  "<n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                  smax, PINS0, PINS1);
20     if (endgaps)
          fprintf(fx,
                  "< endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                  firstgap, (DNA)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                  lastgap, (DNA)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
      else
          fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n");
}
25
30     static nm;           /* matches in core -- for checking */
     static lmax;          /* lengths of stripped file names */
     static ij[2];          /* jmp index for a path */
     static nc[2];          /* number at start of current line */
     static ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
     static siz[2];
35     static char *ps[2];    /* ptr to current element */
     static char *po[2];    /* ptr to next output char slot */
     static char out[2][P_LINE]; /* output line */
     static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
40     static
     pr_align()
{
        int nn;           /* char count */
        int more;
45        register i:
        for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
            nn = stripname(nameex[i]);
            if (nn > lmax)
                lmax = nn;

50        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}
55
60

```

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5           for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
10          for (i = more = 0; i < 2; i++) {
15          /* do we have more of this sequence?
16          */
17          if (!*ps[i])
18              continue;
19
20          more++;
21
22          if (pp[i].spc) { /* leading space */
23              *po[i]++ = ' ';
24              pp[i].spc--;
25          }
26          else if (siz[i]) { /* in a gap */
27              *po[i]++ = '-';
28              siz[i]--;
29          }
30          else { /* we're putting a seq element
31          */
32              *po[i] = *ps[i];
33              if (islower(*ps[i])))
34                  *ps[i] = toupper(*ps[i]);
35              po[i]++;
36              ps[i]++;
37
38              /*
39               * are we at next gap for this seq?
40               */
41              if (ni[i] == pp[i].x[i][i])) {
42                  /*
43                   * we need to merge all gaps
44                   * at this location
45                   */
46                  siz[i] = pp[i].n[i][i]++;
47                  while (ni[i] == pp[i].x[i][i]))
48                      siz[i] += pp[i].n[i][i]++;
49
50                  ni[i]++;
51              }
52          }
53      }
54
55      /* dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
56      */
57
58      static
59      dumpblock()
60      {
61          register i;
62
63          for (i = 0; i < 2; i++)
64              *po[i]-- = '\0';
65
66      }
67
68      ...pr_align...

```

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5      (void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' '))
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
    putline(i);
    if (i == 0 && *out[1])
        fprintf(fx, star);
    if (i == 1)
        nums(i);
15
}
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
{
    char      nline[P_LINE];
register   i, j;
register char  *pn, *px, *py;

for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
    *pn = ' ';
for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
    if (*py == ' ' || *py == '-')
        *pn = ' ';
    else {
        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
            j = (i < 0)? -i : i;
            for (px = pn; j /= 10, px--)
                *px = j%10 + '0';
            if (i < 0)
                *px = '-';
        }
        else
            *pn = ' ';
    }
    i++;
}
*pn = '0';
nc[ix] = i;
for (pn = nline; *pn; pn++)
    (void) putc(*pn, fx);
(void) putc('\n', fx);
45
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int      ix;
{

```

55

60

65

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5           ...putline
int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
15          for (px = out(ix); *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

20          /*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
    !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
    return;
30          px = star;
for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
    *px++ = ' ';

for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
    if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
            cx = '*';
            nm++;
        }
        else if (!dma && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
            cx = '.';
        else
            cx = ' ';
    }
    else
        cx = ' ';
    *px++ = cx;
}
45          *px++ = '\n';
*px = '\0';
}

50          /*
 * strip path or prefix from pn. return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char  *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
60          for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

55          stripname

```

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
5   #include "nw.h"
10  #include <sys/file.h>

    char  *jname = "/tmp/homgXXXXXX";           /* tmp file for jmps */
    FILE  *fj;

15  int    cleanup();                         /* cleanup tmp file */
    long   lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
20  cleanup(i)
    {
        int    i;
        if (fj)
            (void) unlink(jname);
        exit(i);
    }

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
30  char  *
getseq(file, len)
    char  *file;  /* file name */
    int   *len;   /* seq len */
    {
        char  line[1024], *pseq;
        register char  *px, *py;
        int    nargc, llen;
        FILE  *fp;

40  if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
            exit(1);
        }
        llen = nargc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
            if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++)
                if (isupper(*px) || islower(*px))
                    llen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(llen+6))) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, llen+6, file);
            exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
    }

55

60

```

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5      py = pseq + 4;
*len = strlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
10     for (px = line; *px != '\n'; px++) {
            if (isupper(*px))
                *py++ = *px;
            else if (islower(*px))
                *py++ = toupper(*px);
            if (index("ATGCU", *(py-1)))
                natgc++;
        }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
20     (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (ilen/3);
    return(pseq+4);
}

char *
25     g_malloc(msg, nx, sz)                                g_malloc
{
    char   *msg;           /* program, calling routine */
    int    nx, sz;         /* number and size of elements */
    {
        char   *px, *calloc();
30     if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
            if (*msg) {
                fprintf(stderr, "%s: g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n",
                        prog, msg, nx, sz);
                exit(1);
            }
        }
        return(px);
    }

/*
* get final jmps from dx[] or jmp file. set pp[], reset dmax: main()
*/
40     readjmps()                                         readjmps
{
    int      fd = -1;
    int      siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fd) {
        (void) fclose(fd);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup();
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++;)
        while (!)
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
50
55
60
65

```

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

...readjmps

5      if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
          (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
          (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
          (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
          dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
      }
10     else
          break;
    }
    if (i >= JMPSS) {
        fprintf(stderr, "#%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
15     if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
             */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
        }
20       /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
    }
25       /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
30   }
35   }
    else
        break;
}

40 /* reverse the order of jmps
 */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
45 for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
50 if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}

```

55

60

65

ES 2 332 916 T3

TABLA 1 (continuación)

```

5      /*
6       * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
7       */
8
9     writejmps(ix)                                writejmps
10    int      ix;
11    {
12        char   *mktemp();
13
14        if (!fj) {
15            if (mktemp(jname) < 0) {
16                fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
17                cleanup(1);
18            }
19            if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
20                fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
21                exit(1);
22            }
23            (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
24            (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
25        }

```

TABLA 2A

25	PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
30	Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)
	% de identidad en la secuencia de aminoácidos = (el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO) =		
40	5 dividido por 15 = 33,3%		

45	TABLA 2B		
50	PRO	XXXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
55	Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)
	% de identidad en la secuencia de aminoácidos = (el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO) =		
65	5 dividido por 10 = 50%		

ES 2 332 916 T3

TABLA 2C

PRO-DNA NNNNNNNNNNNNNN (Longitud = 14
5 nucleótidos)
ADN de NNNNNNLLLLLLLLL (Longitud = 16
comparación nucleótidos)
10 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =
(el número de nucleótidos que se emparejan de forma
15 idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos
según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el
número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos
20 nucleicos de PRO-DNA) =
6 dividido por 14 = 42,9%

TABLA 5

30 PRO-DNA NNNNNNNNNNNN (Longitud = 12
nucleótidos)
35 ADN de NNNNLLLVVV (Longitud = 9
comparación nucleótidos)
40 % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =
(el número de nucleótidos que se emparejan de forma
idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos
según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el
número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos
nucleicos de PRO-ADN) =
45 4 dividido por 12 = 33,3%

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Polipéptidos PRO de longitud completa

La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos PRO. En particular, se han identificado y aislado los ADNc que codifican polipéptidos PRO, tal y como se describe con mayor detalle en los posteriores ejemplos. Cabe indicar que a las proteínas fabricadas en ciclos de expresión separados se les pueden dar números PRO diferentes, pero el número UNQ es único para cualquier ADN determinado y la proteína codificada, y no cambiará. Sin embargo, por simplicidad, en el presente documento las proteínas codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente invención, así como todos los homólogos nativos adicionales y variantes incluidas en la definición anterior de polipéptidos PRO, se referirán como "PRO", independientemente de su origen o modo de preparación.

Tal y como se describe en los Ejemplos posteriores, se han depositado clones de ADNc con el ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de los clones se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia mediante la

secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos rutinarios en la técnica. Las secuencias de aminoácidos previstas se pueden determinar a partir de las secuencias de nucleótidos utilizando la técnica rutinaria. Para los polipéptidos PRO y los ácidos nucleicos codificantes descritos en la presente invención, los solicitantes han identificado lo que se cree que son los mejores marcos de lectura identificables con la información de la secuencia disponible en el momento.

5

B. Variantes de polipéptido PRO

Además de los polipéptidos PRO de secuencia nativa y de longitud completa descritos en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de polipéptido PRO. Las variantes de polipéptido PRO se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de PRO, y/o mediante la síntesis del polipéptido PRO deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del polipéptido PRO, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la membrana.

Las variaciones en el polipéptido PRO de secuencia nativa y de longitud completa o en varios dominios del polipéptido PRO descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido PRO que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO en comparación con el polipéptido PRO de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido PRO. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del polipéptido PRO con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizar el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizadas en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de forma sistemática y probando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

En la presente invención se proporcionan fragmentos de polipéptido PRO. Dichos fragmentos se pueden truncar en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO.

Los fragmentos del polipéptido PRO se pueden preparar mediante cualquiera de un conjunto de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de polipéptido PRO mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos concretos o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores de los extremos 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de polipéptido PRO comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO nativo.

50

En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 3 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones de ejemplo en la Tabla 3, o tal y como se describen posteriormente en referencia a las clases de aminoácidos, y se criban los productos.

55

60

65

ES 2 332 916 T3

TABLA 3

	Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
5	Ala (A)	val; leu; ile	val
10	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
	Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
	Asp (D)	Glu	glu
15	Cys (C)	Ser	ser
	Gln (Q)	Asn	asn
	Glu (E)	Asp	asp
20	Gly (G)	pro; ala	ala
	His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
25	Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
30	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
	Phe (F)	leu; val; ile, ala; tyr	leu
35	Pro (P)	Ala	ala
	Ser (S)	Thr	thr
	Thr (T)	Ser	ser
40	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
45	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en la identidad funcional o inmunológica del polipéptido se llevan a cabo mediante la selección de las sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el conjunto de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- 55 (2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr;
- (3) ácida: asp, glu;
- 60 (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromática: trp, tyr, phe.

65 Las sustituciones no conservativas comprenderá el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para fabricar el ADN variante de PRO se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter *et al.*, Nucl. Acids. Res., 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids. Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells *et al.*, Gene, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección por restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

El análisis de aminoácidos por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido entre este grupo ya 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 [Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

C. Modificaciones de polipéptidos PRO

Las modificaciones covalentes del polipéptido PRO están incluidas en el alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un polipéptido PRO con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del polipéptido PRO. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular el polipéptido PRO con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

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

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en polipéptidos PRO de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido PRO de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina al polipéptido PRO de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos de PRO puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido PRO es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981).

La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido PRO se puede realizar químicamente o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación químicas son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et al.* Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge, *et al.* Anal. Biochem., 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura *et al.* Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de polipéptidos PRO comprende la unión del polipéptido PRO a uno del conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de

la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

5 Los polipéptidos PRO de la presente invención también se pueden modificar de una manera que formen una molécula químérica que comprende el polipéptido PRO fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

En una realización, dicha molécula químérica comprende una fusión del polipéptido PRO con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítopo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítopo-10 etiqueta se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del polipéptido PRO. La presencia de dichas formas epítopo etiquetadas del polipéptido PRO se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítopo etiqueta permite que el polipéptido PRO se purifique fácilmente mediante 15 purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítopo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 20 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glioproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítopo KT3 [Martin *et al.*, Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítopo de α -tubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula químérica puede comprender una fusión del polipéptido PRO con una 25 inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula químérica (también referida como "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido PRO en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. En una 30 realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

D. Preparación de polipéptidos PRO

35 La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de polipéptidos PRO mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de PRO. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar los polipéptidos PRO. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido PRO, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, 40 W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes del polipéptido PRO de forma separada y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido PRO de longitud completa.

a. Aislamiento del ADN que codifica un polipéptido PRO

55 El ADN que codifica el polipéptido PRO se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de PRO humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica PRO también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para el polipéptido PRO u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el polipéptido PRO es utilizar la metodología de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

65 Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficiente inequívoca que se minimizan los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con 32 P, biotinilación o marcate enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando 5 procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen en la presente invención.

El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la 10 presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que no se han transcrita de forma inversa en ADNc.

b. Selección y transformación de células huésped

15 Las células huésped se transfecan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente invención para la producción del polipéptido PRO y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden 20 seleccionar por un experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos 25 por el experto en la materia, por ejemplo, CaCl₂, CaPO₄, mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw *et al.*, Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento 30 de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según 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 se pueden 35 utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown *et al.*, Methods in enzymology, 185:527-537 (1990) y Manssur *et al.*, Nature, 336. 348-352 (1988).

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención 40 se incluyen células procariotas, levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y cepa de *E. coli* K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, 45 por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La Cepa W3110 es un huésped o 50 huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa de huésped habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kon'*; 55 la cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan'*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

60 Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican PRO. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt *et al.* J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris*

(EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma recia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes 5 *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilbum *et al.*, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionada del género que consiste en *Hansenula*, 10 *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos PRO glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila S2* 15 y *Spodoptera Sf9*, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO), Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células 20 de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCl51). La selección de la célula huésped apropiada se estima que está dentro de la técnica.

c. Selección e utilización de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica el polipéptido PRO se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN 35 se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, 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 adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un experto en la materia.

El polipéptido PRO se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el PRO que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo las secuencias líder del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre 40 de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como secuencias líderes secretoras virales.

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación 50 del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, poliomavirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

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

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica PRO, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido 65 de la levadura YRp7 [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 de selección para una cepa mutante de levadura

ES 2 332 916 T3

que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

- Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica PRO para dirigir la síntesis de ARNm. Son conocidos promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor tac [deBoer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido PRO.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] u otros enzimas glucolíticos [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen en detalle en EP 73.657.

La transcripción del polipéptido PRO a partir de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del poliomielitis, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el polipéptido PRO por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliomielitis en la cara tardía del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de PRO, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' con respecto al promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el polipéptido PRO.

En Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de polipéptidos PRO en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

55 d. Detección de la amplificación/expresión de los genes

La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, dobles cadenas híbridas de ADN-ARN o dobles cadenas de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la doble cadena está unida a una superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la doble cadena.

La expresión génica, alternativamente, se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y el ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para

ES 2 332 916 T3

cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido PRO 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 a ADN de PRO que codifica un epítopo de anticuerpo específico.

e. Purificación de polipéptido

Las formas de polipéptidos PRO se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisados de células huésped. Si 10 está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión del polipéptido PRO se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar células.

15 Se puede desear purificar el polipéptido PRO a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefarosa para eliminar 20 contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítopo del polipéptido PRO. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteínas y dichos métodos 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, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el polipéptido PRO concreto 25 producido.

E. Amplificación de genes que codifican los polipéptidos PRO en tejidos y líneas celulares tumorales

La presente invención se basa en la identificación y caracterización de genes que se amplifican en ciertas células 30 cancerosas.

El genoma de organismos procariotas y eucariotas está sometido aparentemente a dos requerimientos en conflicto. El primero es la conservación y la propagación del ADN como información genética en su forma original para garantizar la herencia estable a través de múltiples generaciones. Por otro lado, las células o los organismos han de ser 35 capaces de adaptarse a cambios ambientales constantes. Los mecanismos adaptativos pueden incluir modificaciones cualitativas o cuantitativas de su material genético. Las modificaciones cualitativas incluyen las mutaciones de ADN, en las que las secuencias codificantes son alteradas dando lugar a una proteína estructural y/o funcionalmente diferente. La amplificación génica es una modificación cuantitativa, por la cual el número real de secuencias codificantes 40 completas, es decir un gen, aumenta, llevando a un aumento en el número de moldes disponibles para la transcripción, un mayor número de transcriptos traducibles y, finalmente, a un aumento en la abundancia de la proteína codificada por el gen amplificado.

El fenómeno de la amplificación génica y sus mecanismos subyacentes han sido investigados *in vitro* en algunos sistemas de cultivo de procariotas y eucariotas. El ejemplo mejor caracterizado de amplificación génica implica el 45 cultivo de células eucariotas en un medio que contienen concentraciones variables del fármaco citotóxico metotrexato (MTX). El MTX es un análogo del ácido fólico e interfiere en la síntesis de ADN al bloquear la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Durante la exposición inicial a bajas concentraciones de MTX, la mayoría de las células (>99,9%) morirán. Un pequeño número de células sobreviven y son capaces de crecer en concentraciones crecientes de MTX al producir grandes cantidades de DHFR- ARN y proteína. La base de esta sobreproducción es la amplificación de la 50 DHFR única codificante. Las copias adicionales del gen se encuentran como copias extracromosómicas en forma de pequeños cromosomas supernumerarios (dobles minutos) o como copias cromosómicas integradas.

La amplificación génica se encuentra generalmente en el desarrollo de la resistencia a fármacos citotóxicos (antibióticos para bacterias y agentes quimioterapéuticos para células eucariotas) y la transformación neoplásica. La 55 transformación de una célula eucariota como un acontecimiento espontáneo o debido a una agresión viral o químico/ambiental está asociada habitualmente a cambios en el material genético de estas células. Uno de los cambios genéticos más habituales observados en los tumores humanos son las mutaciones de la proteína p53. La proteína p53 controla la transición de células de la fase estacionaria (G1) a la fase replicativa (S) y evita esta transición en presencia de daño en el ADN. En otras palabras, una de las consecuencias principales de la inutilización de las mutaciones de 60 p53 es la acumulación y propagación del daño en el ADN, por ejemplo, cambios genéticos. Los tipos de cambios genéticos más comunes en células neoplásicas son, además de las mutaciones puntuales, las amplificaciones y las alteraciones estructurales mayores, tales como las translocaciones.

La amplificación de las secuencias de ADN puede indicar un requerimiento funcional específico tal como ilustra 65 en el sistema experimental de DHFR. Por tanto, la amplificación de ciertos oncogenes en los tumores apunta hacia un papel causal de estos genes en el proceso de transformación tumoral y mantenimiento del fenotipo transformado. Esta hipótesis ha ganado apoyos en estudios recientes. Por ejemplo, se observó que la proteína *bcl-2* se amplificaba en ciertos tipos de linfomas que no son de Hodgkin. Esta proteína inhibe la apoptosis y conduce a la acumulación

ES 2 332 916 T3

progresiva de células neoplásicas. Se ha observado que miembros de la familia génica de receptores de factores se amplifican en varios tipos de cánceres y se ha sugerido que la sobreexpresión de estos receptores puede convertir las células neoplásicas en menos susceptibles a cantidades limitantes de factores de crecimiento disponibles. Los ejemplos incluyen la amplificación del receptor de andrógeno en el cáncer de próstata recurrente durante la terapia de privación de andrógenos y la amplificación del homólogo del receptor del factor de crecimiento, ERB2, en cáncer de mama. Últimamente, los genes implicados en la señalización intracelular y el control de la progresión del ciclo celular pueden experimentar amplificación durante la transformación tumoral. Esto queda ilustrado por la amplificación de los genes *bcl-1* y *ras* en varios neoplasmas epiteliales y linfoides.

Estos estudios previos ilustran la viabilidad de identificar las secuencias de ADN amplificadas en neoplasias, ya que esta estrategia puede identificar genes importantes para la transformación tumoral. El caso de ERB2 también demuestra la viabilidad desde un punto de vista terapéutico, ya que las proteínas transformantes pueden representar dianas novedosas y específicas para la terapia tumoral.

Se pueden utilizar diferentes técnicas para demostrar secuencias genómicas amplificadas. El análisis citogenético clásico de extensiones cromosómicas preparadas a partir de células cancerosas es adecuado para la identificación de alteraciones estructurales mayores, tales como translocaciones, delecciones e inversiones. Las regiones genómicas amplificadas pueden visualizarse sólo si están implicadas regiones amplias con un número alto de copias o si están presentes como material extracromosómico. Aunque la citogenética fue la primera técnica para demostrar la asociación consistente de cambios cromosómicos específicos con neoplasias particulares, no es adecuada para la identificación y el aislamiento de secuencias de ADN manejables. La técnica desarrollada más recientemente de la hibridación genómica comparativa (CGH) ha ilustrado el fenómeno extendido de la amplificación genómica en neoplasias. El ADN tumoral y normal se hibrida simultáneamente sobre las metafases de células normales y se puede cribar el genoma completo mediante análisis de imagen para secuencias de ADN que están presentes en el tumor con una frecuencia aumentada. (WO93/18.186; Gray *et al.*, Radiation Res., 137:275-289). Como procedimiento de cribado, este tipo de análisis ha revelado un gran número de amplicones recurrentes (un tramo de ADN amplificado) en una variedad de neoplasias humanas. Aunque la CGH es más sensible que el análisis citogenético clásico en la identificación de tramos de ADN amplificados, no permite una identificación rápida y aislamiento de secuencias codificantes en el amplicón por las técnicas estándares de genética molecular.

Los procedimientos más sensibles para detectar la amplificación génica son los ensayos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos ensayos utilizan una cantidad muy pequeña de ADN tumoral como material de partida, son exquisitamente sensibles, proporcionan ADN que es susceptible de un análisis posterior, tal como secuenciación, y son adecuados para el análisis de volúmenes con gran rendimiento.

Los ensayos mencionados anteriormente no son mutuamente excluyentes, sino que frecuentemente se usan en combinación para identificar amplificaciones en neoplasias. Mientras que el análisis citogenético y la CGH representan procedimientos de cribado para reconocer regiones amplificadas en el genoma completo, los ensayos basados en la PCR son los más adecuados para la identificación final de las secuencias codificantes, es decir, los genes en las regiones amplificadas.

Según la presente invención, dichos genes han sido identificados mediante PCR cuantitativa (S. Gelmini *et al.*, Clin. Chem., 43:752 [1997]), por comparación del ADN de una variedad de tumores primarios, incluyendo mama, pulmón, colon, próstata, cerebro, hígado, riñón, páncreas, bazo, timo, testículo, ovario, útero, etc., tumor o líneas celulares tumorales, con ADN agrupado de donantes sanos. La PCR cuantitativa se llevó a cabo utilizando un instrumento TaqMan™ (ABI). Los cebadores específicos de los genes y las sondas fluorogénicas se diseñaron en función de las secuencias codificantes de los ADNs.

Las líneas celulares de carcinoma de pulmón humano incluyen A549 (SRCC768), Calu-1 (SRCC769), Calu-6 (SRCC770), H157 (SRCC771), H441 (SRCC772), H460 (SRCC773), SKMES-1 (SRCC774), SW900 (SRCC775), H522 (SRCC832) y H810 (SRCC833), todas disponibles en el ATCC. Las células de tumores primarios humanos de pulmón normalmente derivan de adenocarcinomas, carcinomas de célula escamosa, carcinomas de célula grande, carcinomas de célula no pequeña, carcinomas de célula pequeña, y carcinomas bronco alveolares, e incluyen, por ejemplo, SRCC724 (adenocarcinoma, abreviado como "AdenoCa") (LT1), SRCC725 (carcinoma de célula escamosa, abreviado como "SqCCA") (LT1a), SRCC726 (adenocarcinoma) (LT2), SRCC727 (adenocarcinoma) (LT3), SRCC728 (adenocarcinoma) (LT4), SRCC729 (carcinoma de célula escamosa) (LT6), SRCC730 (adenocarcinoma/carcinoma de célula escamosa) (LT7), SRCC731 (adenocarcinoma) (LT9), SRCC732 (carcinoma de célula escamosa) (LT10), SRCC733 (carcinoma de célula escamosa) (LT11), SRCC734 (adenocarcinoma) (LT12), SRCC735 (adenocarcinoma/carcinoma de célula escamosa) (LT13), SRCC736 (carcinoma de célula escamosa) (LT15), SRCC737 (carcinoma de célula escamosa) (LT16), SRCC738 (carcinoma de célula escamosa) (LT17), SRCC739 (carcinoma de célula escamosa) (LT18), SRCC740 (carcinoma de célula escamosa) (LT19), SRCC741 (carcinoma de célula de pulmón, abreviado como "LCCa") (LT21), SRCC811 (adenocarcinoma) (LT22), SRCC825 (adenocarcinoma) (LT8), SRCC886 (adenocarcinoma) (LT25), SRCC887 (carcinoma de célula escamosa) (LT26), SRCC888 (adenocarcinoma-carcinoma BAC) (LT27), SRCC889 (carcinoma de célula escamosa) (LT28), SRCC890 (carcinoma de célula escamosa) (LT29), SRCC891 (adenocarcinoma) (LT30), SRCC892 (carcinoma de célula escamosa) (LT31), SRCC894 (adenocarcinoma) (LT33). También se incluyen tumores de pulmón humano denominados como SRCC1125 [HF-000631], SRCC1127 [HF-000641], SRCC1129 [HF-000643], SRCC1133 [HF-000840], SRCC1135 [HF-000842], SRCC1227 [HF-001291], SRCC1229 [HF-001293], SRCC1230 [HF-001294], SRCC1231 [HF-001295], SRCC1232 [HF-001296],

ES 2 332 916 T3

SRCC1233[HF-001297], SRCC1235[HF-001299], SRCC1236[HF-001300], SRCC1296[HF-001640], SRCC1299 [HF-001643], SRCC1300[HF-001644], SRCC1301[HF-001645], SRCC1302[HF-001646], SRCC1303[HF-001647] y SRCC1304[HF-001648].

- 5 Las líneas celulares de cáncer de colon incluyen, por ejemplo, las líneas celulares de la ATCC SW480 (adenocarcinoma, SRCC776), SW620 (metástasis de nódulos linfáticos de adenocarcinoma de colon, SRCC777), Colo320 (carcinoma, SRCC778), HT29 (adenocarcinoma, SRCC779), HM7 (una variante de la línea celular de adenocarcinoma de colon del ATCC altamente productora de mucina, SRCC780, obtenida del Dr. Robert Warren, UCSF), Ca-WiDr (adenocarcinoma, SRCC781), HCT116 (carcinoma, SRCC782), SKCO1 (adenocarcinoma, SRCC783), SW403 (adenocarcinoma, SRCC784), LS174T (carcinoma, SRCC785), Colo205 (carcinoma, SRCC828), HCT15 (carcinoma, SRCC829), HCC2998 (carcinoma, SECC830), y KM12 (carcinoma, SRCC831). Los tumores de colon primarios incluyen los adenocarcinomas de colon denominados como CT2 (SRCC742), CT3 (SRCC743), CT8 (SRCC744), CT10 (SRCC745), CT12 (SRCC746), CT14 (SRCC747), CT15 (SRCC748), CT16 (SRCC749), CT17 (SRCC750), CT1 (SRCC751), CT4 (SRCC752), CT5 (SRCC753), CT6 (SRCC754), CT7 (SRCC755), CT9 (SRCC756), CT11 (SRCC757), CT18 (SRCC758), CT19 (adenocarcinoma, SRCC906), CT20 (adenocarcinoma, SRCC907), CT21 (adenocarcinoma, SRCC908), CT22 (adenocarcinoma, SRCC909), CT23 (adenocarcinoma, SRCC910), CT24 (adenocarcinoma, SRCC911), CT25 (adenocarcinoma, SRCC912), CT26 (adenocarcinoma, SRCC913), CT27 (adenocarcinoma, SRCC914), CT28 (adenocarcinoma, SRCC915), CT29 (adenocarcinoma, SRCC916), CT30 (adenocarcinoma, SRCC917), CT31 (adenocarcinoma, SRCC918), CT32 (adenocarcinoma, SRCC919), CT33 (adenocarcinoma, SRCC920), CT35 (adenocarcinoma, SRCC921), y CT36 (adenocarcinoma, SRCC922). También se incluyen los centros de tumores de colon humanos denominados como SRCC 1051 [HF-000499], SRCC1052 [HF-000539], SRCC1053 [HF-000575], SRCC1054 [HF-000698], SRCC1059 [HF-000755], SRCC1060 [HF-000756], SRCC 1142 [HF-000762], SRCC1144 [HF-000789], SRCC1146 [HF-000795] y SRCC1148 [HF-000811].
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Las líneas celulares de carcinoma de mama humano incluyen, por ejemplo, HBL100 (SRCC759), MB435s (SRCC760), T47D (SRCC761), MB468 (SRCC762), MB 175 (SRCC763), MB361 (SRCC764), BT20 (SRCC765), MCF7 (SRCC760) y SKBR3 (SRCC767), y centro de tumor de mama humano designados como SRCC1057 [HF-000545]. También se incluyen los tumores de mama humanos designados como SRCC1094, SRCC 1095, SRCC1096, SRCC1097, SRCC1098, SRCC1099, SRCC1100, SRCC1101, y tumor de mama-met-pulmón-NS humano designado como SRCC893 [LT32].

Los tumores de recto humano incluyen SRCC981 [HF-000550] y SRCC982 [HF-000551].

Los centros de tumores de riñón humano incluyen SRCC989 [HF-000611] y SRCC1014 [HF-000613].

El centro de tumor de testículo humano incluyen SRCC1001 [HF-000733] y el margen de tumor de testículo SRCC999 [HF-000716].

Los tumores de paratiroides humana incluyen SRCC1002 [HF-000831] y SRC1003 [000832].

Los tumores de nódulo linfático humano incluyen el SRCC 1004 [HF-000854], SRCC1005 [HF-000855] y SRCC1006 [000856].

F. Distribución tisular

Los resultados de los ensayos de amplificación génica de la presente invención pueden ser verificados mediante estudios posteriores, tales como, la determinación de la expresión de ARNm en varios tejidos humanos.

Como se ha indicado antes, la amplificación génica y/o la expresión génica en varios tejidos pueden medirse mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]), transferencia de manchas (análisis del ADN), o la hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias que se proporcionan en la presente invención. De forma alternativa, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN, y cadenas dobles híbridas de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína.

Alternativamente, la expresión génica en varios tejidos también puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo del cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestras pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido PRO de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas aquí o contra la secuencia exógena fusionada a la secuencia de ADN de PRO y que codifica un epítopo del anticuerpo específico. Las técnicas generales para generar anticuerpos, y protocolos especiales para la transferencia Northern e hibridación *in situ* se proporcionan aquí a continuación.

G. Mapeo cromosómico

Si la amplificación de un gen determinado es funcionalmente relevante, el gen entonces debería amplificarse más que las regiones genómicas vecinas que no son importantes para la supervivencia del tumor. Para su ensayo, el gen 5 puede ser mapeado en un cromosoma determinado, por ejemplo, mediante análisis de híbridos de radiación. El nivel de amplificación se determina a continuación en la localización identificada, y en las regiones genómicas vecinas. La amplificación selectiva o preferencial en la región genómica en la que el gen se ha mapeado es consistente con la posibilidad de que la amplificación génica observada promueva el crecimiento tumoral o su supervivencia. El mapeo 10 cromosómico incluye tanto el mapeo del armazón como del epicentro. Para más detalles véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, *Genome Research*, 7:422-433 (1997).

H. Estudios de unión a anticuerpo

Los resultados del estudio de amplificación génica pueden además verificarse mediante estudios de unión a anticuerpos, en los que se analiza la capacidad de los anticuerpos anti-PRO para inhibir la expresión de los polipéptidos 15 PRO en las células tumorales (cáncer). Ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos policlónicos, monoclonales, humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describe aquí más adelante.

Los estudios de unión a anticuerpo pueden llevarse a cabo en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tales 20 como los ensayos de unión competitiva, ensayos en sándwich directo e indirecto, y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, pág. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de 25 la muestra a analizar por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana (codificada por un gen amplificado en una célula tumoral) en la muestra a analizar es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que resulta unido, los anticuerpos preferiblemente, se insolubilizan antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito 30 que están unidos a los anticuerpos pueden separarse de forma conveniente del patrón y del analito que permanecen sin unir.

Los ensayos sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a diferentes regiones inmunogénicas o epítopos de la proteína a detectar. En un ensayo de sándwich, el analito de la muestra a analizar se une a un primer anticuerpo que está inmovilizado en un soporte sólido, y a continuación un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo de tres partes insoluble. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 4.376.110. 35 El segundo anticuerpo puede estar marcado con un grupo detectable (ensayos sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que esté marcado con un grupo detectable (ensayo sándwich indirecto). Por ejemplo, un ensayo de sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es una enzima.

Para inmunohistoquímica, la muestra tumoral puede ser fresca o congelada o puede estar embebida en parafina y 40 fijada con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

I. Ensayos tumorales basados en células

Se pueden usar ensayos basados en células y modelos animales para tumores (por ejemplo, cánceres) para verificar 45 los hallazgos del ensayo de amplificación génica, y mejorar el conocimiento de la relación entre los genes identificados aquí y el desarrollo y la patogénesis del crecimiento celular neoplásico. El papel de los productos génicos identificados aquí en el desarrollo y la patología de un tumor o cáncer puede analizarse usando células tumorales primarias o líneas celulares en las que se ha identificado que amplifican los genes de la presente invención. Dichas células incluyen, por ejemplo, células de cáncer de mama, colon y pulmón y las líneas celulares indicadas anteriormente.

En una estrategia diferente, se transfecan células de un tipo celular que se sabe su implicación en un tumor en particular con los ADNc aquí descritos y se analiza la capacidad de estos ADNc de inducir un crecimiento excesivo. Entre las células adecuadas se incluyen, por ejemplo, líneas celulares tumorales estables, tales como la línea celular B104-1-1 (línea celular NIH-3T3 estable transfecada con el protooncogén *neu*) y células NIH-3T3 transfecadas con *ras*, 50 que pueden ser transfecadas con el gen deseado y controladas respecto a su crecimiento tumorigénico. Dichas líneas celulares transfecadas pueden usarse a continuación para analizar la capacidad de anticuerpos policlónicos o monoclonales o composiciones de anticuerpos para inhibir el crecimiento de células tumorigénicas al ejercer una actividad citostática o citotóxica sobre el crecimiento de las células transformadas, o midiendo la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Las células transfecadas con las secuencias codificantes de los genes identificados aquí 55 pueden usarse además para la identificación de fármacos candidatos para el tratamiento del cáncer.

Además, pueden usarse cultivos primarios derivados de tumores en animales transgénicos (tal como se describe más adelante) en los ensayos basados en células aquí descritos, aunque se prefieren líneas celulares estables. Son bien conocidas en el sector técnicas para derivar líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos (véase, por ejemplo, Small *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5:642-618 [1985]).

J. Modelos animales

Es posible utilizar una variedad de modelos animales bien conocidos para entender en mayor profundidad el papel de los genes identificados aquí en el desarrollo y la patogénesis de tumores, y para analizar la eficacia de los agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo moléculas pequeñas antagonistas. La naturaleza *in vivo* de dichos modelos los hace particularmente útiles predictivos de respuestas en pacientes humanos. Entre los modelos animales de tumores y cánceres (por ejemplo, cáncer de mama, de colon, de próstata, de pulmón, etc.) se incluyen tanto animales no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Entre los modelos animales no recombinantes se incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos murinos. Dicho 5 modelos pueden generarse introduciendo células tumorales en ratones singénicos usando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implantación en el bazo, implantación intraperitoneal, implantación bajo la cápsula renal, o implantación ortotópica, por ejemplo, células de cáncer de colon implantadas en un tejido colónico (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO97/33551, publicada el 18 de Septiembre de 1997).

Probablemente, la especie animal más frecuentemente utilizada en estudios oncológicos son ratones inmunodeficientes y, en particular, ratones desnudos ("nude"). La observación de que los ratones desnudos con hipo/aplasia pueden actuar con éxito como un huésped para xenoinjertos de tumores humanos ha conducido a su uso generalizado para este propósito. El gen autosómico recesivo *nu* se ha introducido en un gran número de distintas cepas congénitas de ratones desnudos, incluyendo, por ejemplo, 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 y usado como receptores de xenoinjertos tumorales una amplia variedad de otros animales con defectos inmunológicos heredados diferentes del ratón desnudo. Para más detalles véase, por ejemplo, *The Nude Mouse in Oncology Research*, E. Boven and B. Winograd, eds., CRC Press, Inc., 1991.

Las células introducidas en dichos animales pueden derivarse de líneas celulares conidas de un tumor/cáncer, tales como, cualquiera de las líneas celulares tumorales enumeradas anteriormente, y, por ejemplo, la línea celular B104-1-1 (la línea celular NIH-3T3 estable transfectada con el protooncogén *neu*); células NIH-3T3 transfectadas con *ras*; Caco-2 (ATCC HTB-37); una línea celular de adenocarcinoma de colon humano de grado II moderadamente bien diferenciado, HT-29 (ATCC HTB-38), o a partir de tumores y cánceres. Las muestras de células tumorales o cancerosas pueden obtenerse de pacientes que van a someterse a cirugía, usando condiciones estándar, que implican congelación y almacenamiento en nitrógeno líquido (Karmali *et al.*, Br. J. Cancer, 48:689-696).

Las células tumorales pueden introducirse en animales, tales como ratones desnudos, mediante una variedad de procedimientos. El espacio subcutáneo (s.c.) en ratones es muy apropiado para la implantación de tumores. Los tumores pueden transplantarse s.c. como bloques sólidos, como biopsias con aguja usando un trócar o como suspensión celulares. Para bloques sólidos o implantaciones por trócar, se introducen fragmentos de tejido tumoral de un tamaño adecuado en el espacio s.c. Las suspensiones celulares se preparan en fresco a partir de tumores primarios o de líneas celulares tumorales estables, y se inyectan subcutáneamente. Las células tumorales pueden inyectarse también como implantes subdérmicos. En esta localización, el inóculo se deposita entre la parte inferior del tejido conectivo dérmico y el tejido s.c. Boven y Winograd (1991), *supra*.

Se pueden generar modelos animales de cáncer de mama, por ejemplo, mediante la implantación de células de neuroblastoma de rata (de las cuales se aisló inicialmente el oncogén *neu*) o de células NIH-3T3 transformadas con *neu* en animales desnudos, esencialmente tal como describe por Drebin *et al.*, PNAS USA, 83:9129-9133 (1986).

De forma similar, se pueden generar modelos animales de cáncer de colon transfiriendo células de cáncer de colon en animales, por ejemplo, ratones desnudos, lo que conduce a la aparición de tumores en estos animales. Se ha descrito un modelo de transplante 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 llamado "METAMOUSE" vendido por AntiCancer, Inc., (San Diego, California).

Los tumores que se generan en los animales pueden extraerse y cultivarse *in vitro*. Las células procedentes de los cultivos *in vitro* pueden transferirse entonces a animales. Dichos tumores pueden servir como dianas para un posterior análisis o cribado de fármacos. Alternativamente, los tumores resultantes de la transferencia pueden aislarse y se puede analizar el ARN procedente de las células antes de la transferencia y de las células aisladas después de una o más rondas de transferencia para determinar la expresión diferencial de los genes de interés. Dichas técnicas de transferencia pueden realizarse con cualquier línea celular tumoral o cancerosa conocida.

Por ejemplo, Meth A, CMS4, CMS5, CMS21, y WEHI-164 son fibrosarcomas inducidos químicamente de ratones hembra BALB/c (DeLeo *et al.*, J. Exp. Med., 146:720 [1977]), que proporcionan un sistema modelo altamente controlable para el estudio de las actividades antitumorales de diversos agentes (Palladino *et al.*, J. Immunol., 138:4023-4032. Brevemente, se propagan células tumorales *in vitro* en cultivo celular. Antes de la inyección en los animales, las líneas celulares se lavan y se resuspenden en tampón, a una densidad celular de aproximadamente 10×10^6 a 10×10^7 células/ml. Los animales se infectan entonces subcutáneamente con 10 a 100 μl de la suspensión celular, que permiten la aparición de un tumor en una a tres semanas.

Además, el carcinoma de pulmón de Lewis (3LL) de ratones, que es uno de los tumores experimentales más ampliamente estudiados, puede utilizarse como modelo de tumor de investigación. La eficacia de este modelo de tumor se

ha correlacionado con los efectos beneficiosos en el tratamiento de pacientes humanos diagnosticados con carcinoma de célula pequeña de pulmón (SCCL). Este tumor puede introducirse en ratones normales mediante inyección de fragmentos de tumores de un ratón afectado o de células mantenidas en cultivo (Zupi *et al.*, Br. J. Cancer, 41: suppl.4:309 [1980]), y existen evidencias que indican que los tumores pueden iniciarse a partir de la inyección de incluso una única célula y que una proporción muy alta de células tumorales infectadas sobreviven. Para más información sobre este modelo de tumor véase, Zacharski, Haemostasis, 16:300-320 [1986].

Una manera de evaluar la eficacia de un compuesto a analizar en un modelo animal sobre un tumor implantado es medir el tamaño del tumor antes y después del tratamiento. Tradicionalmente, se ha medido el tamaño de los tumores implantados con un portaobjetos calibrador en dos o tres dimensiones. La medida limitada a dos dimensiones no refleja de forma precisa el tamaño del tumor, por tanto, habitualmente se convierte en el volumen correspondiente usando una fórmula matemática. Sin embargo, la medida del tamaño del tumor es muy poco precisa. Los efectos terapéuticos de un fármaco candidato pueden describirse mejor como el retraso en el crecimiento inducido por el tratamiento y el retraso específico del crecimiento. Otra variable importante en la descripción del crecimiento del tumor es el tiempo de duplicación del volumen del tumor. Existen programas informáticos para el cálculo y la descripción del crecimiento tumoral, tales como el programa descrito por Rygaard y Spang-Thomsen, Proc. 6th Int Workshop on Immune-Deficient Animals. Wu y Sheng eds., Basel, 1989, 301. Cabe destacar, sin embargo, que al menos inicialmente, los procesos de necrosis y respuestas inflamatorias después del tratamiento pueden realmente dar lugar a un aumento del tamaño del tumor. Por tanto, estos cambios deben ser monitorizados cuidadosamente mediante una combinación de un procedimiento morfométrico y análisis por citometría de flujo.

Se pueden diseñar modelos animales recombinantes (transgénicos) introduciendo la región codificante de los genes identificados aquí en el genoma de animales de interés, usando técnicas estándar para la producción de animales transgénicos. Entre los animales que pueden ser objeto de manipulación transgénica se incluyen, sin limitación, ratas, conejos, cobayas, cordero, cabras, cerdos y primatos no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpancés y monos. Entre las técnicas conocidas en el sector para introducir un transgén en dichos animales se incluyen la microinyección pronuclear (Hoppe y Wanger, patente de Estados Unidos 4.873.191); la transferencia génica en líneas germinales mediada por retrovirus (por ejemplo, Van der Putten *et al.*, Proc Natl. Aca. Sci. USA, 82:6148-6151[1985]; el reconocimiento génico en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell, 56:313-321 [1989]); la electroporación de embriones (Lo, Mol. Cell Biol., 3:1803-1814 [1983]); la transferencia génica mediada por esperma (Lavitrano *et al.*, Cell, 57:717-73 [1989]). Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos 4.736.866 para la revisión del tema.

Para el objetivo de la presente invención, entre los animales transgénicos se incluyen también aquellos que portan el transgén sólo en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgén puede integrarse como un único transgén, o en concatámeros, por ejemplo, tándems cabeza-cabeza, cabeza-cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula en particular también es posible 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 controlarse mediante técnicas estándar. Por ejemplo, puede utilizarse el análisis de transferencia Southern o la amplificación por PCR para verificar la integración del transgén. El nivel de expresión de ARNm puede analizarse a continuación usando técnicas, tales como la hibridación *in situ*, el análisis por transferencia Northern, la PCR, o la inmunocitoquímica. Los animales se examinan además para determinar signos de desarrollo canceroso o tumoral.

Alternativamente, se pueden construir animales "knock out" que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido PRO identificado aquí, como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y un ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, puede usarse el ADNc que codifica un polipéptido PRO para clonar el ADN genómico que codifica este polipéptido según técnicas establecidas. Se puede eliminar o sustituir una fracción del ADN genómico que codifica un polipéptido PRO particular por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede utilizarse para hacer un seguimiento de la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no modificado (tanto en el extremo 5' como 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para la descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homólogamente con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li *et al.*, Cell, 69:915 (1992)]. A continuación, las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pág. 113-152]. A continuación, puede implantarse un embrión químérico en un animal adoptivo hembra pseudopregnada adecuada, y el embrión nació para crear un animal "knock-out". La progenie que alberga el ADN recombinado homólogamente en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándares y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homólogamente. Los animales knock-out pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido PRO.

La eficacia de anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos aquí identificados y a otros fármacos candidatos, puede analizarse también en el tratamiento de tumores de animales espontáneos. Una diana adecuada para dichos estudios es el carcinoma de célula escamosa (SCC) oral felina. El SCC oral felino es un tumor maligno

altamente invasivo, es el tumor oral más común en gatos, ya que supone un 60% de los tumores orales descritos en esta especie. Raramente desarrolla metástasis en puntos distantes, aunque esta baja incidencia de metástasis puede ser un mero reflejo del corto tiempo de supervivencia que muestran los gatos con este tumor. Habitualmente, estos tumores no son susceptibles de cirugía, principalmente debido a la anatomía de la cavidad oral del felino.

En la actualidad, no existe un tratamiento efectivo para este tumor. Antes de entrar en el estudio, cada gato se somete a un examen clínico completo, a una biopsia y es escaneado mediante tomografía computerizada (CT). Los gatos a los que se les diagnostica tumores orales sublinguales de células escamosas se excluyen del estudio. La lengua puede llegar a paralizarse como resultado de dicho tumor, e incluso si el tratamiento destruye el tumor, los animales pueden no ser capaces de alimentarse por sí solos. Cada gato se trata de forma repetida durante un largo período de tiempo. Se toman fotografías de los tumores diariamente durante el período de tratamiento, y en cada chequeo posterior. Tras el tratamiento, cada gato se somete a otro escáner CT. A partir de entonces, los escáneres por CT y las radiografías torácicas se evalúan cada 8 semanas. Se analizan los datos en busca de diferencias en la supervivencia, la respuesta y la toxicidad en comparación con los grupos de control. Una respuesta positiva puede requerir evidencias de la regresión tumoral, preferiblemente con una mejora en la calidad de vida y/o un aumento de la esperanza de vida.

Además también pueden analizarse otros tumores de animales espontáneos, tales como el fibrosarcoma, el adenocarcinoma, el linfoma, el condroma, el leiomiosarcoma de perros, gatos y babuinos. De éstos, el adenocarcinoma mamario en perros y gatos es un modelo preferido ya que su apariencia y comportamiento es muy similar al de los humanos. Sin embargo, el uso de este modelo está limitado por la baja incidencia de este tipo de tumores en animales.

K. Ensayos de cribado de fármacos candidatos

Los ensayos de cribado de fármacos candidatos están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos codificados por los genes identificados aquí, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento o bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de pequeñas moléculas como fármacos candidatos. Entre las pequeñas moléculas contempladas se incluyen compuestos sintéticos orgánicos o inorgánicos, incluyendo péptidos, preferiblemente péptidos solubles, fusiones de (poli)péptidos e inmunoglobulinas, y, en particular, anticuerpos, incluyendo, sin limitación, anticuerpos polí y monocionales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones químicas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos. Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos tienen en común que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido codificado por un ácido nucleico aquí identificado en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislar o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización en particular, el polipéptido codificado por el gen identificado aquí o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se realiza mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido y dejándolo secar. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido a ser inmovilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente fijado. Cuando la reacción se ha completado, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos fijados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que el complejo se ha formado. Cuando el componente originalmente no inmovilizado en un principio no transporta un marcador, se puede detectar la formación del complejo, 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 PRO particular codificado por un gen identificado aquí, su interacción con este polipéptido puede ser analizada mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación, y la copurificación a través de gradientes o en columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields and Song, *Nature*, 340:245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)] como se describe en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991)]. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones antes mencionadas (generalmente denominados como "sistema del doble híbrido") aprovecha esta propiedad, y utiliza dos proteínas hibridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en la que las que proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1/*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4, depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la

interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Existe un kit completo (MATCHMAKERTM) disponible comercialmente por Clontech para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica del doble híbrido. Este sistema también puede extenderse para localizar dominios proteicos implicados en interacciones 5 proteicas específicas, así como para señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen identificado aquí que codifica PRO y otros componentes intra o extracelulares pueden ser analizados tal como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen amplificado y el componente intra o extracelular en condiciones 10 y durante un tiempos para permitir la interacción y la unión de los dos productos. Para analizar la capacidad de un compuesto a analizar para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto a analizar. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para utilizarse como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto a analizar y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla tal como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, 15 pero no en la mezcla de reacción, que contiene el compuesto a analizar indica que el compuesto a analizar interfiere con la interacción del compuesto a analizar y su pareja de reacción.

Para analizar antagonistas, el polipéptido PRO puede añadirse a una célula junto con el compuesto a cribar por una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido PRO 20 indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO. Alternativamente, se pueden detectar antagonistas mediante la combinación del polipéptido PRO y un potencial antagonista con receptores del polipéptido PRO unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido PRO puede marcarse, mediante, por ejemplo, radioactividad, de manera que el número de moléculas 25 del polipéptido PRO unidas al receptor pueden usarse para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, "panning" de ligandos y separación por FACS. Coligan *et al.*, Current Protocols in Immun., 1(2): capítulo 5(1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión donde se prepara ARN poliadénilado a partir de una célula sensible al polipéptido PRO y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide 30 en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO. Las células transfectadas que crecen en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido PRO marcado. El polipéptido PRO puede marcarse mediante distintos medios incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para un sitio. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y se preparan subgrupos y se retransfectan usando un proceso interactivo de subagrupamiento y recribado, que finalmente producen un único clón que codifica el receptor putativo. 35

Como estrategia alternativa para la identificación de un receptor, el polipéptido PRO marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana o extractos celulares que expresan la molécula receptora. El material entrecruzado se resuelve por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor 40 puede cortarse, separarse en pequeños fragmentos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida por microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, se incubarían células de mamífero o una preparación de membrana que expresan el receptor con el polipéptido PRO marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir 45 la capacidad del compuesto de aumentar o bloquear esta interacción.

Ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con el polipéptido PRO y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos polyclonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y 50 versiones químéricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un potencial antagonista puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido PRO que reconozca el receptor, pero que no ejerza ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido PRO.

Otro antagonista potencial del polipéptido PRO es una construcción de ARN o ADN no codificante preparada 55 usando la tecnología antisentido, donde, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN no codificante actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm mediante la hibridación con el ARNm diana y evitando 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 del ADN o ARN no codificante, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido al ADN 60 o al ARN. Por ejemplo, la región codificante 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica el polipéptido PRO maduro de la presente invención se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN no codificante de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice- véase, Lee *et al.*, Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney *et al.*, Science, 241:456 (1988); Dervan *et al.*, Science, 251:1360 (1991)], evitando así la transcripción y la producción del polipéptido 65 PRO. El oligonucleótido de ARN no codificante se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido PRO (no codificante-Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)). Los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden también liberarse a células, de manera que el ARN o ADN antisentido puede ser expresado *in vivo* para inhibir

ES 2 332 916 T3

la producción del polipéptido PRO. Cuando se usa un ADN no codificante, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del la región de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones de aproximadamente -10 a +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

5 Las moléculas de ADN o ARN no codificantes tienen generalmente una longitud de por lo menos aproximadamente 5 bases, de aproximadamente 10 bases, de aproximadamente 15 bases, de aproximadamente 20 bases, de aproximadamente 25 bases, de aproximadamente 30 bases, de aproximadamente 35 bases, de aproximadamente 40 bases, de aproximadamente 45 bases, de aproximadamente 50 bases, de aproximadamente 55 bases, de aproximadamente 60 bases, de aproximadamente 65 bases, de aproximadamente 70 bases, de aproximadamente 75 bases, de aproximadamente 80 bases, de aproximadamente 85 bases, de aproximadamente 90 bases, de aproximadamente 95 bases, de aproximadamente 100 bases, o más.

10 Entre los potenciales antagonistas se incluyen 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 PRO, bloqueando así la actividad biológica normal del polipéptido PRO. Entre los ejemplos de pequeñas moléculas se incluyen, pero sin limitación, pequeños péptidos o moléculas de tipo peptídico, preferiblemente, péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

15 Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la fragmentación específica del ARN. Las 20 ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia al ARN diana complementario, seguido por la división endonucleolítica. Los sitios de fragmentación específica de la ribozima en una diana potencial de ARN se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles véase, por ejemplo, Rossi Current Biology, 4: 469-471 (1994), y la publicación PCT WO97/33.551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

25 Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deberán ser de cadena sencilla y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que se induce la formación de la triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, las cuales generalmente requieren considerables tramos adaptables de purinas o pirimidinas en una cadena de la cadena doble. Para más detalles véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 97/33551, *supra*.

30 35 Estas pequeñas moléculas pueden identificarse mediante uno o más de los ensayos de cribado descritos aquí anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la materia.

L. Composiciones y procedimientos para el tratamiento de tumores

40 Las composiciones útiles en el tratamiento de tumores asociados con la amplificación de los genes identificados aquí incluyen, sin limitación, anticuerpos, pequeñas moléculas orgánicas e inorgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas no codificantes y ribozimas, moléculas de triple hélice, etc, que inhiben la expresión y/o la actividad del producto génico diana.

45 Por ejemplo, las moléculas de ARN y ARN no codificante actúan para bloquear directamente la traducción del ARNm mediante la hibridación al ARNm diana y evitando así la traducción de proteína. Cuando se usa un ADN no codificante, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente la posición -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

50 55 Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la fragmentación específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia al ARN diana complementario, seguido por la división endonucleolítica. Los sitios de fragmentación específica de la ribozima en una diana potencial de ARN se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles véase, por ejemplo, Rossi Current Biology, 4: 469-471 (1994), y la publicación PCT WO97/33.551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

60 Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deberán ser de cadena sencilla y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que se induce la formación de la triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, las cuales generalmente requieren considerables tramos adaptables de purinas o pirimidinas en una cadena de la cadena doble. Para más detalles véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas pueden identificarse mediante uno o una combinación de los ensayos de cribado descritos aquí anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la materia.

M. Anticuerpos

Algunos de los fármacos candidatos más prometedores según la presente invención son anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que pueden inhibir la producción o el producto génico de los genes amplificados identificados aquí y/o reducir la actividad de los productos génicos.

1. Anticuerpos policlonales

Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido PRO o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida por ser immunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas immunogénicas se incluyen, pero sin limitación, hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, diconomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin una gran experimentación.

2. Anticuerpos monoclonales

Alternativamente, los anticuerpos anti-PRO pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido PRO, incluyendo fragmentos o una proteína de fusión de dicha proteína o un fragmento de los mismos. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

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

A continuación, el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se pueden analizar para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra polipéptidos PRO. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en el sector. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar [Goding, *supra*]. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como fluido ascítico en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatito, eletroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la presente invención sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a

continuación se transfecan en células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otro modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar 5 de las secuencias homólogas murinas [Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *supra*] o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipeptido que no es inmunoglobulina. Dicho polipeptido que no es inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la presente invención, o se pueden sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la presente invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

10 Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar el entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de 15 cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar el entrecruzamiento.

Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas rutinarias conocidas en el sector.

20 3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-PRO pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de 25 inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una 30 región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no 35 humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

40 Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humano. Estos residuos de aminoácidos no humanos se indican frecuentemente como residuos "importados", que se adquieren habitualmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 45 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos 50 residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

55 Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector, incluyendo las bibliotecas de expresión en fagos [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.* están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991). De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes endógenos de inmunoglobulina han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, 60 se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parecen mucho a los observados en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reajuste de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Esta estrategia se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *BioTechnology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368, 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51, (1996); 65 Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

4. Terapia de profármacos mediados por enzimas dependientes de anticuerpos (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también pueden usarse en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de tipo peptidilo, véase WO 81/01.145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, WO88/07.378 y la patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjuguado útil para la ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de manera que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención se incluyen, pero sin limitación, la glicosidasa, la glucosa oxidasa, la lisozima humana, la glucuronidasa humana, la fosfatasa alcalina útil por convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; la arilsulfatasa útil por convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina deaminasa útil por convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso 5-fluorouracilo; proteasas, tales como la proteasa de *Serratia*, la termolisina, la subtilisina, carboxipeptidasas (por ejemplo, carboxipeptidasa G2 y carboxipeptidasa A) y las catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que son útiles por convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de tipo D-aminoácido; las enzimas que hidrolizan carbohidratos, tales como la β -galactosidasa y la neuramidasa útiles por convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; la β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y las penicilin amidasas; tales como la penicilin V amidasa o la penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o la fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos con actividad enzimática también conocidos en la técnica como "abzimas" para convertir los profármacos de la presente invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, *Nature*, 328:457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describe aquí para la liberación del abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas de la presente invención pueden unirse covalentemente a los anticuerpos anti-PRO mediante técnicas bien conocidas en el sector, tal como el uso de agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión al antígeno del anticuerpo de la invención unido a al menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el sector (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.*, *Nature*, 312:604-608 (1984)).

35 5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión con por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión puede ser para el polipéptido PRO, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína o receptor o subunidad del receptor de la superficie celular.

Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Millstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, CH2, y regiones CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

Según otra estrategia descrita en WO 96/27011, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte de la región CH3 de un dominio constante del anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el

- 5 que anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab-TNB para 10 formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizado. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

20 Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremalleras de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de los anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de los anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

35 Se contemplan los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes en un polipéptido de la presente invención determinado. Alternativamente, puede combinarse un brazo anti-polipéptido con un brazo que se une a una molécula activadora en un leucocito, tal como una molécula del receptor de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para dirigir los mecanismos de defensa celular hacia la célula que expresa el polipéptido particular. Los anticuerpos biespecíficos pueden usarse también para localizar agentes citotóxicos en las células que expresan un polipéptido particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a polipéptido y un brazo que se une a un agente citotóxico o a un quelante radiactivo, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido y se une además al factor tisular (TF).

6. Anticuerpos heteroconjugados

50 Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360: WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunitoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptopbutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

60 7. Diseño de la función efectora

Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora con el fin de aumentar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el residuo o residuos de cisteínas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shope, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada también se pueden preparar utilizando

entre cruzadores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf *et al.* *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis complementaria y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989).

5

8. Inmunoconjungados

La presente invención también se refiere a inmunoconjungados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma, o una toxina de molécula pequeña), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjungado).

Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjungados. Entre las toxinas de proteínas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, toxina del cólera, toxina botulinus, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de dianina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Las toxinas de molécula pequeña incluyen, por ejemplo, caliqueamicinas, maitansinoides, palitoxina y CC1065. Existe un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjungados. Algunos ejemplos son ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede de preparar una immunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitella *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un “receptor” (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcado de tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado no enlazado de la circulación utilizando un agente purificador y, a continuación, la administración de un “ligando” (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

9. Inmunoliposomas

Los anticuerpos descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en 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 las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

45

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lípida que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal y como se describe en Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante la reacción de intercambio de enlaces disulfuro. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina). Véase Gabizon *et al.*, *J. Nacional Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

N. Composiciones farmacéuticas

55

Se pueden administrar anticuerpos que se unen específicamente al producto de un gen amplificado identificado aquí, así como otras moléculas identificadas en los estudios de cribado descritos aquí anteriormente, para el tratamiento de tumores, incluyendo cánceres, en forma de composiciones farmacéuticas.

Si la proteína codificada por el gen amplificado es intracelular y se usan los anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren anticuerpos que se internalicen. Sin embargo, se pueden utilizar también lipofecciones o liposomas para liberar el anticuerpo, o un fragmento del anticuerpo a las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que retengan la capacidad de unirse a la secuencia protética diana basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante la tecnología del ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7889-7893 [(1993)]).

ES 2 332 916 T3

Se preparan formulaciones terapéuticas del anticuerpo para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las

- 5 dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como el metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o 10 inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como, polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

15 De forma análoga, se pueden formular compuestos que no son anticuerpos identificados mediante los ensayos de cribado de la presente invención, usando técnicas estándares bien conocidas en el sector.

La formulación aquí descrita también puede contener más de un compuesto activo si es necesario para la afección 20 particular que vaya a ser tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afecten de forma adversa entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citoquina o un agente inhibidor del crecimiento. Dichos moléculas están presentes de manera adecuadamente en combinación con cantidades que sean efectivas para el objetivo pretendido.

25 Los principios activos pueden también encapsularse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

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

35 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (patente de Estados Unidos 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, copolímeros no degradables de acetato de vinilo-etileno, copolímeros degradable de ácido láctico-ácido 40 glicólico, tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como el acetato de vinilo-etileno y de 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 organismo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a 45 la humedad a 37°C, lo que da lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Deben idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular a través de un intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando residuos sulfhidrilos, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones específicas 50 de matrices poliméricas.

O. Métodos de tratamiento

55 Se contempla que los anticuerpos y otros compuestos antitumorales de la presente invención pueden utilizarse para el tratamiento de varias afecciones, incluyendo aquellas caracterizadas por la sobreexpresión y/o activación de genes amplificados identificados aquí. Ejemplos de afecciones o trastornos a tratar con dichos anticuerpos y otros compuestos, incluyendo, pero sin limitación, moléculas pequeñas orgánicas e inorgánicas, péptidos, moléculas no codificantes, etc., incluyen tumores benignos o malignos (por ejemplo, carcinomas renal, hepático, de riñón, de vejiga, de mama, gástrico, ovárico, colorectal, de próstata, pancreático, pulmonar, vulval, de tiroides, hepático; sarcomas; glioblastomas; y diversos tumores de cabeza y cuello); leucemias y tumores linfoides; otros trastornos, tales como trastorno neuronal, glial, astrocital, hipotálamico y otros trastornos glandulares, macrofágico, epiteliales, estromales y blastocoélicos; y trastornos inflamatorios angiogénicos e inmunológicos.

60 Los agentes antitumorales de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos, se administran a un mamífero, preferiblemente humano, según procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante perfusión continua durante un periodo de tiempo, mediante vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalatoria. Se prefiere la administración intravenosa del anticuerpo.

Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración de agentes anticancerosos, por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención. Por ejemplo, el paciente a tratar con dichos agentes anticancerosos puede también recibir terapia de radiación. Alternativa o adicionalmente, puede administrarse al paciente un agente quimioterapéutico. La preparación y programaciones de las dosis de dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar 5 según las instrucciones del fabricante o tal como se determina empíricamente por un técnico en la materia. La preparación y programaciones de las dosis para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del agente anti-tumoral, por ejemplo el anticuerpo, o pueden administrarse simultáneamente. El anticuerpo puede combinarse con un compuesto anti-estrogeno, tal como tamoxifeno o uno anti-progesterona, tal como la 10 onapristona (véase EP 616.812) en dosificaciones conocidas para dichas moléculas.

También puede ser deseable administrar anticuerpos contra otros antígenos asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unen al ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o al factor endotelial vascular (VEGF). Alternativa o adicionalmente, pueden coadministrarse al paciente dos o más anticuerpos que se unen a los mismos o dos o más antígenos 15 diferentes descritos aquí. A veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citocinas al paciente. En una realización preferida, los anticuerpos de la presente invención se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse en primer lugar, seguido de un anticuerpo de la presente invención. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración del 20 anticuerpo de la presente invención en primer lugar en. Dosis adecuadas del agente inhibidor del crecimiento son las utilizadas en la actualidad y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y del anticuerpo de la presente invención.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada de un agente antitumoral, por ejemplo, un anticuerpo de la presente invención, dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se definió anteriormente, 25 de la gravedad y de la evolución de la enfermedad tanto si el agente se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, de terapias previas, del historial clínico del paciente y de la respuesta al agente y de la discreción del médico responsable. El agente se administra de forma adecuada al paciente en una sola vez o durante una serie de tratamientos.

30 Por ejemplo, dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis candidata inicial para la administración al paciente es de aproximadamente 1 µg/Kg a 15 mg/Kg (por ejemplo 0,1-20 mg/Kg) de anticuerpo, bien mediante, por ejemplo, una o más administraciones por separado, o mediante perfusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar entre aproximadamente 1 µg/Kg a 100 mg/Kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se prolonga 35 hasta la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

P. Artículos de fabricación

40 En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales de utilidad para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de diversos materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es efectiva para el diagnóstico o el tratamiento de la afección y puede tener un puerto 45 de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es habitualmente un agente antitumoral capaz de interferir con la actividad de un producto genético identificado aquí, por ejemplo, un anticuerpo. La etiqueta sobre el recipiente, o asociado con el mismo, indica que la composición se utiliza para el diagnóstico o el tratamiento de la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente 50 que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede además incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con las instrucciones para su utilización.

Q. Diagnóstico y pronóstico de tumores

Mientras que las proteínas de superficie celular, tales como los receptores del crecimiento sobreexpresados en ciertos tumores son dianas excelentes para fármacos candidatos o para el tratamiento de tumores (por ejemplo el cáncer), las mismas proteínas junto con proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en células tumorales hallan una utilización adicional en el diagnóstico y pronóstico de tumores. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra productos proteicos de genes amplificados en células tumorales pueden utilizarse para el diagnóstico y pronóstico de tumores.

Por ejemplo, los anticuerpos, incluyendo los fragmentos de anticuerpos, pueden utilizarse para detectar cualitativa o 65 cuantitativamente la expresión de proteínas codificadas por los genes amplificados ("productos génicos marcadores"). El anticuerpo está equipado preferiblemente con un marcador detectable, por ejemplo un marcador fluorescente, y la unión puede monitorizarse mediante microscopía, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en el sector. Estas técnicas son particularmente adecuadas, si el gen amplificado codifica una proteína de superficie celular,

por ejemplo, un factor de crecimiento. Dichos ensayos de unión se realizan esencialmente tal como se describe en la sección 5 anterior.

La detección *in situ* de la unión del anticuerpo con los productos génicos marcadores puede realizarse, por ejemplo,

- 5 mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Para dicho propósito, se extrae una muestra histológica del paciente, y se aplica un anticuerpo marcado a la misma, preferiblemente poniendo el anticuerpo sobre la muestra biológica. Este procedimiento también permite la determinación de la distribución del producto genético marcador en el tejido examinado. Será evidente para aquellos expertos en la materia que están fácilmente disponibles una gran variedad de procedimientos histológicos para la detección *in situ*.

10 Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con un objetivo ilustrativo, y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la presente invención.

Ejemplos

15 Los reactivos disponibles comercialmente referidos en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. El origen de las células se identificaron en los ejemplos siguientes, y a lo largo de la memoria, por los números de acceso ATCC que corresponden al American Type Culture Collection, 1081 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209. Todos los depósitos originales referidos en la presente solicitud 20 se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la concesión de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie a la persona autorizada por el Comisionado de Estados Unidos de Patentes y Marcas de acuerdo con la norma 35 USC § 122 y las normas del Comisionado según lo acordado (incluyendo 37 CFR § 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

30 A menos que se indique lo contrario, la presente invención utiliza procedimientos estándar de tecnología del ADN recombinante, tal como los descritos anteriormente y en los libros de texto siguientes: Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Intersciences, N.Y., 1989; Innis *et al.*, PCR Protocols: A Guide 35 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; R.I., Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Colligan *et al.*, Current Protocols in Immunology, 1991.

40 Ejemplo 8

Aislamiento de clones de ADNc que codifican una PRO7-122 humano

45 Se identificó el DNA 119536-2752 mediante la aplicación de un algoritmo registrado de búsqueda de secuencias señales desarrollado por Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) sobre ESTs, así como fragmentos EST agrupados y ensamblados de bases de datos públicas (por ejemplo, GenBank) y/o privadas (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals Inc., Palo Alto, CA). El algoritmo de la secuencia señal computa un valor de la señal de secreción en base al carácter de los nucleótidos de ADN que rodean el primer y opcionalmente segundo codón o codones (ATG) de metionina en el extremo 5' de la secuencia o fragmento de secuencia en consideración. Los nucleótidos después del primer ATG 50 deben codificar para por lo menos 35 aminoácidos inequívocos sin ningún codón de parada. Si el primer ATG presenta los aminoácidos requeridos, no se examina el segundo. Si ninguno cumple el requisito, la secuencia candidata no se valora. Con el fin de determinar si la secuencia EST contiene una auténtica secuencia señal, se valoran el ADN y las correspondientes secuencias de aminoácidos que rodean el codón ATG utilizando un grupo de siete sensores (parámetros de evaluación) conocidos por asociarse con señales de secreción.

55 La utilización del algoritmo de secuencias señales descrito anteriormente permitió la identificación de una secuencia de grupos EST de la base de datos de Incyte, designada aquí como 81575. Esta secuencia de grupos EST se comparó a continuación con una serie de bases de datos de etiquetas de secuencias expresadas (EST) que incluían las bases de datos de EST públicas (por ejemplo, GenBank) y una base de datos de ADN de EST registrada (LIFESEQ®, 60 Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA), para identificar las homologías existentes. La búsqueda de homologías se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST2 (Altshul *et al.*, Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)). Aquellas comparaciones que dan lugar a una puntuación BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o superior que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y ensamblaron en una secuencia de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Wahsington, Seattle, Washington). La secuencia consenso obtenida a 65 partir de la misma se designa en la presente invención como DNA104391.

En función de la homología de secuencia observada entre la secuencia DNA 104391 y una secuencia EST comprendida en el clon no. 1922888 de la base de datos Incyte, se adquirió el clon no. 1922888 y se obtuvo el inserto de

ES 2 332 916 T3

ADNc y se secuenció. Se observó en la presente invención que el inserto de ADNc codificaba una proteína de longitud completa. La secuencia de este inserto de ADNc se muestra en la figura 15 y se designa en la presente invención como DNA 119536-2752.

5 El clon DNA 119536-2753 contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de inicio de la traducción aparente en las posiciones de nucleótidos 47-49 y que acaba en el codón de parada en las posiciones de nucleótidos 311-313 (figura 15; SEC ID No. 15). El precursor del polipéptido previsto tiene 88 aminoácidos de largo (figura 16). La proteína PRO7422 de longitud completa mostrada en la figura 16 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 9.645 daltons y un pI de aproximadamente 5,45. El análisis de la secuencia de PRO7422 de longitud completa mostrada en la figura 16 (SEC ID No. 16) pone de manifiesto la presencia de una serie de dominios de polipéptidos importantes mostrados en la figura 16, donde las localizaciones proporcionadas para los dominios de polipéptidos importantes son aproximadamente tal como se ha descrito anteriormente. El clon DNA 119536-2752 se ha depositado con ATCC el 17 de agosto de 1999 y se le asigna el ATCC depósito no. PTA-551.

15 Ejemplo 11

Amplificación génica

20 Este ejemplo muestra que los genes que codifican PRO7422 se amplifican en el genoma de ciertos cánceres y/o líneas celulares humanas de pulmón, colon y/o mama. La amplificación está asociada con la sobreexpresión del producto génico, lo que indica que los polipéptidos son dianas útiles para la intervención terapéutica en algunos cánceres, tales como de colon, pulmón, mama y otros cánceres. Los agentes terapéuticos pueden tomar la forma de antagonistas de polipéptidos PRO7422, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murino-humano, humanizados o humanos contra un polipéptido PRO7422.

25 El material de partida para el cribado fue ADN genómico aislado de diversos cánceres. El ADN se cuantifica de forma precisa, por ejemplo, fluorométricamente. Como control negativo, se aisló ADN de las células de 10 individuos sanos normales que se agrupó y utilizó como controles del ensayo para la copia génica en individuos sanos (no mostrados). Se utilizaron el ensayo de la 5' nucleasa (por ejemplo, TaqMan™) y la PCR cuantitativa a tiempo real (por ejemplo, ABI Prism 7700 Sequence Detection System™ (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)) para hallar genes potencialmente amplificados en algunos cánceres. Los resultados se utilizaron para determinar si el ADN que codifica PRO7422 está sobreexpresado en cualquiera de los cánceres o las líneas celulares de cánceres primarios de pulmón o colon o las líneas celulares de cáncer de mama que se cribaron. Los cánceres primarios de pulmón se obtuvieron de individuos con tumores del tipo y estadio tal como se indica en la Tabla 4. Una explicación sobre las abreviaturas utilizadas para la denominación de los tumores primarios listados en la Tabla 4 y los tumores líneas celulares primarias referidas en este ejemplo ya se ha proporcionado anteriormente en la presente invención.

30 40 Los resultados de la TaqMan™ se expresan en unidades delta (Δ) Ct. Una unidad corresponde a 1 ciclo de PCR o a aproximadamente una amplificación de 2 veces respecto a la normal, dos unidades corresponden a 4 veces, 3 unidades a 8 veces de amplificación y así sucesivamente. La cuantificación se obtuvo utilizando cebadores y una sonda fluorescente TaqMan™ derivada del gen codificante de PRO7422. Las regiones de PRO7422 que más probablemente contienen secuencias de ácido nucleico únicas y que menos probablemente tienen intrones empalmados ("spliced") 45 son las preferidas para el cebador y derivar la sonda, por ejemplo, las regiones 3' no traducidas. Las secuencias para los cebadores y las sondas (sentido directo, inverso y la sonda) utilizadas para el análisis de amplificación del gen de PRO7422 fueron las siguientes:

50 PRO7422 (DNA119536-2752):

119536.tm.fl:

55 5' -TCTCCCCGATTCTCATCTG-3' (SEC ID NO: 58)

119536.tmp.rl:

56 5' -CCCTGAGAGTCCTGCACAT-3' (SEC ID NO: 59)

60 119536.tm.pl:

5' -CCCATATAATCATGGACACAGCCCC-3' (SEC ID NO: 60)

65 La reacción del ensayo de la 5' nucleasa es una técnica basada en la PCR fluorescente que utiliza la actividad DE 5'-exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para monitorizar la amplificación a tiempo real. Se utilizan dos cebadores de oligonucleótidos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer

ES 2 332 916 T3

oligonucleótido, o sonda, para detectar una secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extensible por la enzima Taq ADN polimerasa, y se marca con colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente desactivador. Cualquier emisión inducida por láser a partir del colorante informador es desactivado por el colorante desactivador cuando los dos colorantes se localizan de forma próxima a como lo están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa corta la sonda de forma dependiente del molde. Los fragmentos resultantes de la sonda se disocian en solución, y la señal del colorante informador liberado se libera del efecto desactivador del segundo fluoróforo. Una molécula del colorante informador se libera de cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante reportero no desactivado proporciona la base para una interpretación cuantitativa de los datos.

10 El procedimiento de la 5' nucleasa se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativa a tiempo real, tal como el de ABI Prism 7700TM Sequence Detection. El sistema consiste en un termociclador, un láser, una cámara de dispositivo acoplado a la carga (CCD) y un ordenador. El sistema amplifica las muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser se recoge a tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos, y se detecta en el CCD. El sistema incluye el programa para poner en marcha el instrumento y para analizar los resultados.

20 Los datos del ensayo de 5' nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Éste se define como el ciclo en el que se acumula la señal del informador sobre el nivel de fondo de la fluorescencia. Los valores de ΔCt se utilizan como una medición cuantitativa del número relativo de copias de partida de una secuencia diana particular en una muestra de ácido nucleico cuando se comparan los resultados del ADN del cáncer con los resultados del ADN humano normal.

25 La Tabla 6 describe el estadio, estadio T y estadio N de diversos tumores primarios que se utilizaron para cribar los compuestos PRO7422 de la invención.

30

TABLA 4

Perfiles de tumor de pulmón y colon primario

35	Tumor primario	Estadio	Otro estadio	Estadio Dukes	Estadio T	Estadio N
40	Tumor de pulmón humano AdenoCa (SRCC724) [LT1]	IIA			T1	N1
45	Tumor de pulmón humano SqCCa (SRCC725) [LT1a]	IIB			T3	N0
50	Tumor de pulmón humano AdenoCa (SRCC726) [LT2]	IB			T2	N0
55	Tumor de pulmón humano AdenoCa	IIIA			T1	N2

60

65

ES 2 332 916 T3

	(SRCC727) [LT3]			
5	Tumor de pulmón humano AdenoCa	IB	T2	N0
10	(SRCC728) [LT4]			
	Tumor de pulmón humano SqCCa	IB	T2	N0
15	(SRCC729) [LT6]			
	Tumor de pulmón humano	IA	T1	N0
20	Aden/SqCCa			
25	(SRCC730) [LT7]			
	Tumor de pulmón humano AdenoCa	IB	T2	N0
30	(SRCC731) [LT9]			
	Tumor de pulmón humano SqCCa	IIB	T2	N1
35	(SRCC732) [LT10]			
	Tumor de pulmón humano SqCCa	IIA	T1	N1
40	(SRCC733) [LT11]			
	Tumor de pulmón humano AdenoCa	IV	T2	N0
45	(SRCC734) [LT12]			
	Tumor de pulmón humano	IB	T2	N0
	AdenoSqCCa			
50	(SRCC735)_[LT13]			
	Tumor de pulmón humano SqCCa	IB	T2	N0
55	(SRCC736) [LT15]			
	Tumor de pulmón humano SqCCa	IB	T2	N0
60	(SRCC737) [LT16]			
	Tumor de pulmón humano SqCCa	IIB	T2	N1

ES 2 332 916 T3

	(SRCC738) [LT17]				
5	Tumor de pulmón humano SqCCa	IB		T2	N0
10	(SRCC739) [LT18]				
10	Tumor de pulmón humano SqCCa	IB		T2	N0
15	(SRCC740) [LT19]				
15	Tumor de pulmón humano LCCa	IIB		T3	N1
20	(SRCC741) [LT21]				
20	Pulmón humano AdenoCa	1 ^a		T1	N0
25	(SRCC811) [LT22]				
25	Colon humano AdenoCa	M1	D	pT4	N0
30	(SRCC742) [CT2]				
30	Colon humano AdenoCa		B	pT3	N0
35	(SRCC743) [CT1]				
35	Colon humano AdenoCa (SRCC 744) [CT8]		B	T3	N0
40	Colon humano AdenoCa		A	pT2	N0
45	(SRCC745) [CT10]				
45	Colon humano AdenoCa	MO, R1	B	T3	N0
50	(SRCC746) [CT12]				
50	Colon humano AdenoCa	pMO, RO	B	pT3	pN0
55	(SRCC747) [CT14]				
55	Colon humano AdenoCa	M1,R2	D	T4	N2
60	(SRCC748) [CT15]				
60	Colon humano	pMO	B	p73	pN0

ES 2 332 916 T3

	AdenoCa (SRCC749) [CT16]				
5	Colon humano	C1	pT3	pN1	
	AdenoCa (SRCC750) [CT17]				
10	Colon humano	MO, R1	B	pT3	N0
	AdenoCa (SRCC751) [CT1]				
15	Colon humano		B	pT3	M0
	AdenoCa (SRCC752) [CT4]				
20	Colon humano	G2	C1	pT3	pN0
	AdenoCa (SRCC753) [CT5]				
25	Colon humano	pMO. RO	B	pT3	pN0
	AdenoCa (SRCC754) [CT6]				
30	Colon humano	G1	A	pT2	pN0
	AdenoCa (SRCC755) [CT7]				
35	Colon humano	G3	D	pT4	pN2
	AdenoCa (SRCC756) [CT9]				
40	Colon humano		B	T3	N0
	AdenoCa (SRCC757) [CT11]				
45	Colon humano	MO. RO	B	pT3	pN0
	AdenoCa (SRCC758) [CT18]				

Preparación del ADN

55 Se preparó ADN a partir de líneas celulares cultivadas, tumores primarios y sangre humana normal. Se realizó el aislamiento utilizando el kit de purificación, el equipo de tampones y proteasa, todos de Qiagen, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y la descripción siguiente.

Lisis del cultivo celular

60 Se lavaron y se tripsinizaron las células a una concentración de $7,5 \times 10^8$ por punta y se agruparon en pélets mediante centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos a 4°C seguido de un nuevo lavado con 1/2 volumen de PBS y recentrifugación. Se lavaron los pélets una tercera vez, se recogieron las células suspendidas y se lavaron 2x con PBS. A continuación, se suspendieron las células en 10 ml de PBS. El tampón CI se equilibró a 4°C. Se diluyó la proteasa #19155 de Qiagen en 6,25 ml de ddH₂O fría hasta una concentración final de 20 mg/ml y se equilibró a 4°C. Se repararon 10 ml de Tampón de G2 mediante la dilución de una solución madre de ARNasa A de Qiagen (100 mg/ml) hasta una concentración final de 200 µg/ml.

ES 2 332 916 T3

A continuación, se añadieron el tampón C1 (10 ml, 4°C) y ddH₂O (40 ml, 4°C) a los 10 ml de suspensión celular, se mezclaron por inversión y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Se agruparon en pélets los núcleos celulares mediante centrifugación en un rotor con cubeta oscilante Beckman a 2500 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y se suspendieron los núcleos con un agitador en 2 ml de Tampón C1 (a 4°C) y 6 ml de ddH₂O, seguido de una segunda centrifugación a 4°C a 2500 rpm durante 15 minutos. A continuación, se resuspendieron los núcleos en el tampón residual utilizando 200 µl por punta. Se añadió tampón G2 (10 ml) a los núcleos suspendidos mientras se aplicaba agitación suave. Tras completar la adición de tampón, se aplicó agitación energética durante 30 segundos. Se añadió proteasa Qiagen (200 µl, preparada tal y como se indica anteriormente) y se incubó a 50°C durante 60 minutos. Se repitieron la incubación y la centrifugación hasta que los lisatos estuvieron transparentes (por ejemplo, incubando 30-60 minutos adicionales, agrupando en pélets a 3000x g durante 10 min. a 4°C).

Preparación y lisis de la muestra de tumor humano sólido

Se pesaron muestras de tumor y se colocaron en tubos cónicos de 50 ml y se mantuvieron en hielo. El procesamiento se limitó a no más de 250 mg de tejido por preparación (1 punta/preparación). Se preparó una solución de proteasa fresca mediante dilución en 6,25 ml de ddH₂O fría hasta una concentración final de 20 mg/ml y se guardó a 4°C. Se preparó tampón G2 (20 ml) mediante dilución de ADNsa A hasta una concentración final de 200 mg/ml (a partir de la solución madre de 100 mg/ml). Se homogenizó el tejido tumoral en 19 ml de tampón G2 durante 60 segundos utilizando la punta grande del Polytron en una cabina TC de flujo laminar con el objetivo de evitar la inhalación de aerosoles, y se mantuvo a temperatura ambiente. Entre las muestras, se limpió el Polytron mediante agitación a 2 x 30 segundos cada uno en 2L de ddH₂O, seguido de tampón G2 (50 ml). Si la punta aún estaba presente en la punta del generador, se desmontó y limpió el aparato.

Se añadió proteasa de Qiagen (preparada tal y como se indicó anteriormente, 1,0 ml), seguido de agitación e incubación a 50°C durante 3 horas. Se repitieron la incubación y la centrifugación hasta que los lisatos fueron transparentes (por ejemplo, incubando 30-60 minutos adicionales, agrupando en pélets a 3000 x g durante 10 min., 4°C).

Preparación y lisis de la sangre humana

Se obtuvo sangre de voluntarios sanos utilizando protocolos estándar sobre agentes infecciosos y se citró en 10 ml de muestra por punta. Se preparó proteasa de Qiagen fresca mediante dilución en 6,25 ml de ddH₂O fría hasta una concentración final de 20 mg/ml y se guardó a 4°C. Se preparó tampón G2 mediante dilución de ARNasa A hasta una concentración final de 200 µg/ml a partir de una solución madre de 100 mg/ml. Se colocó la sangre (10 ml) en un tubo cónico de 50 ml y se añadieron 10 ml de tampón C1 y 30 ml de ddH₂O (ambos previamente equilibrados a 4°C), y se mezclaron los componentes por inversión y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. Se agruparon en pélets los núcleos con un rotor con cubeta oscilante Beckman a 2500 rpm, 4°C durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Con agitación, se suspendieron los núcleos en 2 ml de tampón C1 (4°C) y 6 ml de ddH₂O (4°C). Se repitió la agitación hasta que el pélet fuera blanco. A continuación, se suspendieron los núcleos en el tampón residual utilizando una punta de 200 µl. Se añadió tampón G2 (10 ml) a los núcleos suspendidos mientras se agitaba suavemente, seguido de agitación energética durante 30 segundos. Se añadió proteasa de Qiagen (200 µl) y se incubó a 50°C durante 60 minutos. Se repitieron la incubación y la centrifugación hasta que los lisatos fueron transparentes (por ejemplo, incubando 30-60 minutos adicionales, agrupando en pélets a 3000 x g durante 10 min. 4°C).

Purificación de lisatos purificados

(1) Aislamiento de ADN genómico

Se equilibró el ADN genómico (1 muestra por preparación de maxi punta) con 10 ml de tampón de QBT. Se equilibró el tampón de elución de QF a 50°C. Se agitaron las muestras durante 30 segundos, a continuación se cargaron en puntas equilibradas y se extrajeron por gravedad. Se lavaron las puntas con 2 x 15 ml de tampón de QC. Se eluyó el ADN en tubos Corex de 30 ml, silanizados y autoclavados, con 15 ml de tampón de QF (50°C). Se añadió isopropanol (10,5 ml) a cada muestra, se cubrieron los tubos con parafina y se mezclaron por inversión repetida hasta que el ADN precipitara. Las muestras se agruparon en pélets mediante centrifugación en el rotor SS-34 a 15.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se marcó la localización del pélet, se descartó el sobrenadante, y se añadieron 10 ml de etanol al 70% (4°C). Se agruparon de nuevo en pélets las muestras mediante centrifugación en el rotor SS-34 a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se marcó la localización del pélet y se descartó el sobrenadante. A continuación, se colocaron los tubos en su sitio en una rejilla de secado y se secaron 10 minutos a 37°C, teniendo cuidado de no resecar la muestra.

Después del secado, se disolvieron los pélets en 1,0 ml TE (pH 8,5) y se pusieron a 50°C durante 1-2 horas. Se mantuvieron las muestras durante toda la noche a 4°C mientras la disolución continuaba. A continuación, se transfirió la solución de ADN a tubos de 1,5 ml con una aguja de calibre 26 en una jeringa de tuberculina. La transferencia se repitió 5x con el objetivo de cortar el ADN. A continuación, se pusieron las muestras a 50°C durante 1-2 horas.

(2) Cuantificación de ADN genómico y preparación para el ensayo de amplificación génica

Se cuantificaron los niveles de ADN en cada tubo mediante espectrofotometría A₂₆₀/A₂₈₀ estándar en una dilución 1:20 (5 µl de ADN + 95 µl de ddH₂O) utilizando las cubetas de cuarzo de 0,1 ml en el espectrofotómetro DU640 de Beckman. Las proporciones de A₂₆₀/A₂₈₀ estaban en el intervalo de 1,8-1,9. A continuación, se diluyó adicionalmente

ES 2 332 916 T3

cada muestra de ADN hasta aproximadamente 200 ng/ml en TE (pH 8,5). Si el material original estaba altamente concentrado (aproximadamente, 700 ng/ μ l), se colocaba el material a 50°C durante diversas horas hasta que se resuspendiera.

5 A continuación, se realizó la cuantificación fluorimétrica del ADN en el material diluido (20-600 ng/ml) utilizando las pautas del fabricante tal y como se modifica más adelante. Esto se llevó a cabo dejando que un fluorómetro Hoeffer DyNA Quant 200 se calentara durante 15 minutos aproximadamente. Se diluyó la solución de trabajo de colorante Hoechst (#H33258, 10 μ l, preparado en las 12 horas de uso) en 100 ml 1 x tampón TNE. Se llenó una cubeta de 2 ml con la solución del fluorómetro, se colocó en la máquina, y se puso a cero la máquina. Se añadió pGEM 3Zf(+) (2 μ l, lote #360851026) a 2 ml de solución del fluorómetro y se calibró a 200 unidades. A continuación, se analizaron 10 2 μ l adicionales de ADN de pGEM 3Zf(+) y se confirmó la lectura a 400 +/- unidades. A continuación, se leyó cada muestra por lo menos por triplicado. Si se encontraban 3 muestras dentro del 10% de la otra, se hacía su promedio y se utilizaba este valor como el valor de la cuantificación.

15 A continuación, se utilizó la concentración determinada fluorométricamente para diluir cada muestra hasta 10 ng/ μ l en ddH₂O. Esto se hizo simultáneamente en todas las muestras de molde para un único ensayo en placa TaqMan™, y con material suficiente para realizar 500-1000 ensayos. Se evaluaron las muestras por triplicado con cebadores Taqman™ y se probaron tanto B-actina como GAPDH en una única placa con ADN humano normal y controles que no eran de molde. Se utilizaron muestras diluidas sierre que el valor de CT del ADN humano normal sustraído del 20 ADN del test fuera +/- 1 Ct. Se guardó el ADN genómico calificado por lotes y diluido en alícuotas de 1,0 ml a -80°C. Se guardaron a 4°C las alícuotas que iban a ser utilizadas posteriormente en el ensayo de amplificación génica. Cada 1 ml de alícuota es suficiente para 8-9 placas o 64 tests.

Ensayo de amplificación génica

25 Los compuestos PRO7422 de la invención se cribaron en los tumores primarios siguientes y los valores de Δ Ct resultantes se exponen en la Tabla 5.

30

TABLA 5

Valores de Δ CT en modelos de tumores y lineales celulares de pulmón, colon y otros	
Tumor primario	PRO7422
HF-001647	1,89

40

Discusión y conclusión

PRO7422 (DNA119536-2752):

45 Los valores Δ Ct para el DNA119536-2752 en diversos tumores están indicados en la Tabla 5. Un Δ Ct>1 se utilizó habitualmente como el valor umbral para la valoración de la amplificación, ya que representa doblar el número de copias génicas. La Tabla 5 indica que la amplificación significativa del ácido nucleico DNA119536-2752 que codifica PRO7422 tuvo lugar en tumor primario de pulmón HF-001647.

50 Debido a que la amplificación del DNA119536-2752 tiene lugar en tumor de pulmón, es altamente probable que desempeñe un papel importante en la formación o crecimiento de tumores. Como resultado, se esperaría que los antagonistas (por ejemplo, los anticuerpos) dirigidos contra la proteína codificada por el DNA119536-2752 (PRO7422) sean útiles en la terapia contra el cáncer.

Ejemplo 12

Uso de PRO7422 como sonda de hibridación

60 El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO7422 como sonda de hibridación.

65 El ADN que comprende la secuencia codificante del polipéptido "PRO7422" de longitud completa o maduro tal como se describe en la presente invención y/o fragmentos del mismo se pueden utilizar como sonda para cribar ADNs homólogos (tales como los que codifican variantes naturales de PRO7422 en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano).

ES 2 332 916 T3

La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de elevada astringencia. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada de polipéptido PRO7422 a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifica un polipéptido PRO7422 de secuencia nativa y longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en el sector.

10

Ejemplo 13

Expresión de polipéptidos PRO7422 en E. coli

15

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de polipéptido PRO7422 mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

20

La secuencia de ADN que codifica el polipéptido PRO de interés se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar *et. al.*, Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se desfosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector.

25

El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor trp, una secuencia líder de poli-His (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante de PRO7422, el finalizador transcripcional lambda, y un gen argU.

30

A continuación, la mezcla de unión se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los procedimientos descritos en Sambrook *et. al.*, *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y, a continuación, se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plasmídico se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

35

Los clones seleccionados se pueden desarrollar durante toda la noche en un medio de cultivo líquido tal como el caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de la expresión se activa.

40

Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El pélet de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína PRO7422 solubilizada se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

45

El PRO7422 se puede expresar en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His según el procedimiento siguiente. El ADN que codifica PRO7422 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contienen sitios para enzimas de restricción que corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de traducción eficiente y fiable, una purificación rápida en una columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His amplificadas por PCR se ligan a continuación en un vector de expresión, que se utiliza para transformar un huésped *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se desarrollan en primer lugar en LB que contiene carbenicilina 50 mg/ml a 30°C con agitación hasta alcanzar una D.O. de 3-5 a 600 nm. Los cultivos se diluyen entonces 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico·2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se desarrollan durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Se toman muestras para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y se centrifuga todo el cultivo para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta la purificación y renaturalización.

50

La pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5-1 l (6-10 g de sedimentos) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón pH 8. Se añaden sulfito sódico sólido y tetrionato sódico hasta concentraciones finales de 0,1 M y 0,02M, respectivamente, y la solución se agita durante toda la noche a 4°C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por la sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante de metales (guanidina 6M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micras para purificar. El extracto purificado se carga en una columna quelante Qiagen de Ni²⁺-NTA de 5 ml equilibrada en el tampón de la columna quelante de metal. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. Las proteínas se eluyen con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y guardan a 4°C. La concentración de proteínas

ES 2 332 916 T3

se estima por su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

La proteína se renaturaliza diluyendo la muestra lentamente en tampón de renaturalización preparado fresco que
5 consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6; NaCl 0,3 M; urea 2,5 M; cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de renaturalización se eligen para que la concentración final se encuentre entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de renaturalización se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de renaturalización se desactiva mediante la adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes
10 de una purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micras y se añade acetonitrilo hasta una concentración final de 2-10%. La proteína renaturalizada se cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H con un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Se analizan alícuotas de fracciones con una absorbancia A₂₈₀ en geles de poliacrilamida-SDS y se agrupan las fracciones que contienen la proteína renaturalizada homogénea. En general, las muestras renaturalizadas de manera adecuada de la mayoría de proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que estas muestras
15 son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos resguardados de la interacción con la resina de fase inversa. Las muestras agregadas se eluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de separar las formas mal plegadas de las proteínas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

20 Las fracciones que contienen la proteína PRO7422 plegada deseada se agrupan y se elimina el acetonitrilo con una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formularon en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálsis o mediante filtración en gel utilizando resinas Superfine G25 (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas de forma estéril.

25 Ejemplo 14

Expresión de PRO7422 en células de mamíferos

30 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de PRO7422 mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

El vector pRK5 (véase, EP 307.247 publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el PRO7422 se liga en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción
35 del ADN de PRO7422 utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook *et. al.*, *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-PRO7422.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se desarrollan hasta la confluencia en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-[PRO7422] con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN VA [Thimmappaya *et. al.*, *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de CaCl₂. A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO₄, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las
45 células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio
50 de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml de ³⁵S- metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio condicionado, se concentra en un filtro de centrifugación y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido PRO7422. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

55 En una técnica alternativa, se puede introducir el ADN de PRO7422 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac *et. al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 1575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un matraz giratorio y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-[PRO7422]. En primer lugar, las células se concentran a partir del matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado en el residuo celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el matraz giratorio que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Despues de aproximadamente cuatro días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y restos celulares. La muestra que contiene el PRO7422 expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálsis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, puede expresarse PRO7422 en células CHO. El vector pRK5-[PRO7422] puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito

ES 2 332 916 T3

anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio puede sustituirse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como ^{35}S -metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido PRO7422, el medio de cultivo puede sustituirse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio condicionado. A continuación, el medio que contiene el PRO7422 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

El PRO7422 etiquetado con epítopo puede expresarse también en células CHO huéspedes. El PRO7422 puede subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclón puede someterse a PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta epítopo seleccionada, tal como una etiqueta de poli-His en un vector de expresión de Baculovirus. El inserto de PRO7422 etiquetado con poli-His puede subclonarse a continuación en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje puede realizarse, tal como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO7422 etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelato con Ni^{2+} .

PRO7422 se puede expresar en células CHO mediante un procedimiento transitorio. La expresión estable en células CHO se puede realizar utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, CH2 y los dominios de CH2 y/o es una forma etiquetada de poli-his.

Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonian en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar descritas en Ausubel *et. al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el traslado adecuado de los de ADNc. El vector utilizado para la expresión en las células CHO es tal y como se describe en Lucas *et. al.*, *Nucl. Acid Res.* 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

Se introducen doce microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección Superfect® (Qiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se desarrollan tal y como se describe en Lucas *et. al.*, *supra*. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para el crecimiento y producción posterior tal y como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan mediante la colocación en un baño de agua y se mezclan mediante agitación. El contenido se pipetea en un tubo de centrífuga que contiene 10 mL de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 μm con suero bovino fetal al 5% dialfiltrado a 0,2 μm). A continuación, las células se fraccionan en un agitador de 100 mL que contiene 90 mL de medio selectivo. Despues de 1-2 días, las células se transfieren a un agitador de 250 mL lleno con 150 mL de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C. Despues de otros 2-3 días, se siembran 3×10^5 células/mL en agitadores de 250 mL, 500 mL y 2000 mL. El medio celular se cambia por medio fresco mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio de CHO adecuado, en realidad se utiliza un medio de producción descrito en la patente de Estados Unidos No. 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. En un agitador de producción de 3L se siembra a razón de $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determina el número de células y el pH. En el día 1, se toman muestras del agitador y se inicia el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se toman muestras del agitador, la temperatura se cambia a 33°C, y se añaden 30 mL de glucosa 500 g/L y 0,6 mL de antiespuma al 10% (por ejemplo 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajusta según la necesidad manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Despues de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μm . El filtrado se guarda a 4°C o se carga inmediatamente en columnas para la purificación.

Para las construcciones etiquetadas de poli-his, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni^{2+} -NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni^{2+} -NTA equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4°C. Tras cargarse, la columna se lava con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guarda a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contiene Fc) se purifican a partir del medio condicionado tal y como se indica a continuación. El medio condicionado se bombea en una columna de Proteína A (Pharmacia) de 5 ml que ha sido equilibrada en un tampón de 20 mM de fosfato sódico, pH 6,8. Despues de cargarse, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μL de tampón Tris 1M, pH 9.

ES 2 332 916 T3

La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento, tal como el descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-his. La homogeneidad se calcula mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales mediante degradación Edman.

5

Ejemplo 15

Expresión de PRO7422 en levadura

10 El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO7422 en levadura.

En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de PRO7422 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO7422 y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO7422.

15 Para la secreción, el ADN que codifica PRO7422 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal PRO7422 nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, una secuencia señal/líder secretora del factor alfa o invertasa de levadura, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de PRO7422.

20 Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y una separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

25 El PRO7422 recombinante puede aislar posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene PRO7422 puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

30

Ejemplo 16

Expresión de PRO7422 en células de insectos infectadas de Baculovirus

35 El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante en células de insectos infectadas de Baculovirus.

La secuencia que codifica para PRO7422 se fusiona en dirección 5' de un epítopo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichas epítopos etiquetas incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de 40 los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica PRO7422 o la parte deseada de la secuencia codificante de PRO7422, tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con todas esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

45 El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como se describe en O'Reilly *et. al.*, Baculovirus expresion vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

55 A continuación, PRO7422, PRO7431 o PRO7476 etiquetados con poli-His expresados pueden purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert *et. al.*, *Nature*, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml de HEPES, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonican dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se depuran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A₂₈₀ con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato: 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína no unidas específicamente. Despues de alcanzar la línea base a A₂₈₀ de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni²⁺-NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las

ES 2 332 916 T3

fracciones que contienen el PRO7422 etiquetado con His₁₀ eluído, respectivamente, se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

Alternativamente, la purificación del PRO7422 etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

Mientras que la expresión se realiza en realidad a una escala de 0,5-2 l, puede realizarse fácilmente a escalas mayores (por ejemplo, 8 l). Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmunoadhesina) en la que la región extracelular de la proteína se fusiona a una secuencia constante de IgG1 que contiene la bisagra, los dominios CH2 y CH3 y/o las formas etiquetadas con poli-His.

Después de la amplificación por PCR, las secuencias codificantes respectivas se subclonan en un vector de expresión de baculovirus (pb.PH.IgG para fusiones IgG y pb.PH.His.c para proteínas etiquetadas con poli-His) y el vector de ADN de baculovirus Baculogold® (Pharmigen) se cotransfectan en 10⁵ células de Spodoptera frugiperda ("Sf9") (ATCC CRL 1711), utilizando Lipofectina (Gibco BRL). pb.PH.IgG y pb.PH.His son modificaciones del vector de expresión de baculovirus disponible comercialmente pVL1393 (Pharmigen), con regiones polienlazadoras modificadas para incluir las secuencias etiqueta His o Fc. Las células se desarrollan en medio TNM-FH de Hink suplementado con FBS al 10% (Hyclone). Las células se incuban durante 5 días a 28°C. El sobrenadante se recoge y posteriormente se utiliza para la primera amplificación viral mediante infección de células Sf9 en medio TNM-FH de Hink suplementado con FBS al 10% a una multiplicidad de infección (MOI) de aproximadamente 10. Las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recoge y la expresión de las construcciones en el vector de expresión de baculovirus se determina mediante la unión por lote de 1 ml de sobrenadante a 25 l de esferas de NTA-Ni²⁺ (Qiagen) para las proteínas etiquetadas con histidina o bolas de Proteína-A Sefarosa CL-4B (Pharmacia) para proteínas etiquetadas con IgG seguido de un análisis por SDS-PAGE comparado con una concentración conocida de proteína estándar mediante tinción de azul de Coomassie.

El sobrenadante de la primera amplificación viral se utiliza para infectar un cultivo del agitador (500 ml) de células Sf9 desarrolladas en medio ESF-921 (Expression systems LLC) a una MOI de aproximadamente 0,1. Las células se incuban durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recoge y se filtra. La unión por lote y el análisis de SDS-PAGE se repiten cuantas veces sea necesario hasta confirmar la expresión del cultivo del agitador.

El medio condicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 L) se recoge mediante centrifugación para eliminar las células y se filtra a través de filtros de 0,22 micras. Para las construcciones etiquetadas con poli-His, la construcción de proteínas se purifica utilizando una columna Ni²⁺-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombea en una columna de Ni²⁺-NTA equilibrada en Hepes 20 mM, pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desalía posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8 con una columna de 24 ml G25 Superfine (Pharmacia) y se almacena a -80°C.

Las construcciones de proteínas de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican del medio condicionado de la manera siguiente. El medio condicionado se bombea en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6,8. Despues de la carga, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente mediante la recogida de fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desalía posteriormente en tampón de almacenamiento tal como se describió anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad de las proteínas se verifica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS y secuenciación de aminoácidos N-terminal mediante degradación de Edman.

Alternativamente, se puede utilizar un procedimiento de baculovirus modificado que incorpora células High 5. En este procedimiento, el ADN que codifica la secuencia deseada se amplifica con sistemas adecuados, tales como Pfu (Stratagene), o se fusiona en dirección 5' (5'-de) de un epítopo etiqueta contenida con un vector de expresión de baculovirus. Dichas epítopos etiquetas incluyen etiquetas poli-His y etiquetas de inmunoglobulinas (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse diversos plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos comercialmente disponibles, tales como el pIE1-1 (Novagen). Los vectores pIE1-1 y pIE1-2 se diseñan para la expresión constitutiva de proteínas recombinantes del promotor ie-1 de baculovirus en células de insecto transformadas de forma estable. Los plásmidos difieren únicamente en la orientación de los sitios de clonación múltiples y contienen todas las secuencias promotoras conocidas por ser importantes para la expresión de genes mediados por ie-1 en células de insecto no infectadas, así como el elemento potenciador hr5. Los vectores pIE1-1 y pIE1-2 incluyen el sitio de inicio de la transcripción y pueden utilizarse para producir proteínas de fusión. En resumen, la secuencia deseada o la parte deseada de la secuencia (tal como la secuencia codificante del dominio extracelular de una proteína transmembrana) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión. Por ejemplo, los derivados de pIE1-1 pueden incluir la región Fc de la IgG humana (pb.PH.IgG) o una etiqueta de 8 histidinas (pb.PH.His) en dirección 3' (3'-de) de la secuencia deseada. Preferiblemente, la construcción del vector se secuencia para su confirmación.

ES 2 332 916 T3

Las células High 5 se desarrollan hasta una confluencia del 50% en las siguientes condiciones: 27°C, sin CO₂, sin pen/strep. Para cada placa de 150 mm, se mezclan 30 µg del vector basado en pIE que contenía la secuencia con 1 ml de medio Ex-Cell (Medio: Ex-Cell 401 + 1/100 L-Glu JRH Biosciences #14401-78P (nota: este medio es sensible a la luz), y en un tubo separado, se mezclan 100 µl de CellFectin (CellFECTIN (GibcoBRL#10362-010) (se agita para mezclar) con 1 ml de medio Ex-Cell. Las dos soluciones se combinan y se deja incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añaden 8 ml de medio Ex-Cell a los 2 ml de la mezcla de ADN/CellFECTIN y esto se dispone sobre las células high 5 que habían sido lavadas una vez con medio Ex-Cell. La placa se incuba a continuación en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de ADN/CellFECTIN se aspira y las células se lavan una vez con Ex-Cell para eliminar el exceso de CellFECTIN, se añaden 30 ml de medio Ex-Cell fresco y las células se incuban durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recoge y se determina la expresión de la secuencia en el vector de expresión de baculovirus mediante unión por lote de 1 ml de sobrenadante a 25 ml de esferas de NTA-Ni²⁺ (Qiagen) para las proteínas etiquetadas con histidina o esferas de Proteína-A Sefarosa CL-48 (Pharmacia) para proteínas etiquetadas con IgG seguido por análisis de PAGE-SDS comparando con una concentración conocida de proteínas estándar por tinción con azul de Coomassie.

El medio condicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 l) se recoge mediante centrifugación para eliminar las células y se filtra a través de filtros de 0,22 µm. Para las construcciones etiquetadas con poli-His, la proteína que comprende la secuencia se purifica utilizando una columna NTA-Ni²⁺ (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombeó en una columna de NTA-Ni²⁺ de 6 ml equilibrada con Hepes 20 mM, pH 7,4, y tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 min a 48°C. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contenía Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 14%, pH 6,8 con una columna de 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) y se guarda a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) de las proteínas se purifican del medio condicionado de la manera siguiente. El medio condicionado se bombea en una columna de 5 ml de Proteína A (Pharmacia) que había sido equilibrada con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente mediante la recogida de fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en tampón de almacenamiento tal como se describió anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad de la secuencia se evalúa mediante geles de poliacrilamida-SDS y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminal mediante degradación de Edman y otros procedimientos analíticos según se deseé o sea necesario.

35

Ejemplo 17

Preparación de anticuerpos que se unen a PRO7422

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a PRO7422.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en el sector y están descritas, por ejemplo, en Coding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen proteínas de fusión de PRO7422 purificado que contienen PRO7422 y células que expresan PRO7422 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse según el técnico en la materia sin una gran experimentación.

Los ratones, tal como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de PRO7422 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante de MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se refuerzan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante diversas semanas, los ratones también se pueden reforzar con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-PRO7422.

Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales "positivos" para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de PRO7422. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA para la reactividad contra PRO7422. La determinación de células de hibridomas "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO7422 está dentro de la técnica.

ES 2 332 916 T3

Las células de hibridomas positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones singeneicos Balb/c para producir fluidos ascíticos que contienen los anticuerpos monoclonales anti-PRO7422. Alternativamente, las células de hibridomas pueden desarrollarse en matraces o en botellas en rodillo de cultivos de tejidos. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los fluidos ascíticos se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

Depósito de material

10 Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas VA 20110-2209. USA (ATCC):

	Material	ATCC Dep. No.	Data del depósito
15	DNA119536-2752	PTA-551	17 de agosto de 1999

Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la concesión de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie a la persona autorizada por el Comisionado de Estados Unidos de Patentes y Marcas de acuerdo con la norma 35 USC § 122 y las normas del Comisionado según lo acordado (incluyendo 37 CFR § 1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente remplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

La memoria escrita anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención y otras construcciones que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones. El depósito del material de la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, las diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

45 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad en este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 4675187 A [0050]
- 55 • US 4816567 A [0105] [0106] [0239] [0239] [0243]
- EP 404097 A [0109]
- 60 • WO 9311161 A [0109]
- US 4275149 A [0112]
- US 5364934 A [0120]
- 65 • WO 8705330 A [0132]
- US 4640835 A [0134]

ES 2 332 916 T3

- US 4496689 A [0134]
- US 4301144 A [0134]
- 5 • US 4670417 A [0134]
- US 4791192 A [0134]
- 10 • US 4179337 A [0134]
- US 5428130 A [0137]
- 15 • WO 8905859 A [0145]
- US 4399216 A [0145]
- 20 • DD 266710 [0146]
- US 4946783 A [0146]
- 25 • EP 139383 A [0147]
- US 4943529 A [0147]
- 30 • EP 402226 A [0147]
- EP 183070 A [0147]
- 35 • EP 244234 A [0147]
- EP 394538 A [0147]
- 40 • WO 9100357 A [0147]
- US 5010182 A [0150]
- EP 362179 A [0150]
- 45 • WO 9013646 A [0150]
- EP 36776 A [0154]
- EP 73657 A [0156]
- 45 • GB 2211504 A [0157]
- EP 117060 A [0160]
- 50 • EP 117058 A [0160]
- WO 9318186 A [0171]
- US 4376110 A [0190]
- 55 • WO 9733551 A [0195] [0223] [0224] [0228] [0229]
- US 4873191 A [0205]
- 60 • US 4736866 A [0205]
- US 5545807 A [0244]
- US 5545806 A [0244]
- 65 • US 5569825 A [0244]
- US 5625126 A [0244]

ES 2 332 916 T3

- US 5633425 A [0244]
- US 5661016 A [0244]
- 5 • WO 8101145 A [0245]
- WO 8807378 A [0245]
- 10 • US 4975278 A [0245]
- WO 9308829 A [0250]
- 15 • WO 9627011 A [0252]
- US 4676980 A [0258] [0258]
- WO 9100360 A [0258]
- 20 • WO 92200373 A [0258]
- EP 03089 A [0258]
- WO 9411026 A [0262]
- 25 • US 4485045 A [0264]
- US 4544545 A [0264]
- 30 • US 5013556 A [0264]
- US 3773919 A [0273]
- EP 616812 A [0276]
- 35 • EP 307247 A [0327]
- US 5122469 A [0336]
- US 05024729 B [0367]
- 40 • US 60138385 B [0367]
- US 60144790 B [0367]
- 45 • US 60146843 B [0367]
- US 60148188 B [0367]
- US 60149320 B [0367]
- 50 • US 60149327 B [0367]
- US 60149396 B [0367]
- 55 • US 60150114 B [0367]
- US 60151700 B [0367]
- US 60151734 B [0367]

60 Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- **Boring.** *CA Cancel J. Clin.*, 1993, vol. 43, 7 [0002]
- 65 • **Hunter.** *Cell*, 1991, vol. 64, 1129 [0004]
- **Bishop.** *Cell*, 1991, vol. 64, 235-248 [0004]

ES 2 332 916 T3

- **Alitalo** *et al.* *Adv. Cancer Res.*, 1986, vol. 47, 235-281 [0005]
- **Slamon** *et al.* *Science*, 1987, vol. 235, 177-182 [0006]
- 5 • **Slamon** *et al.* *Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0006]
- **Schwab** *et al.* *Genes Chromosomes Cancer*, 1990, vol. 1, 181-193 [0007]
- 10 • **Ravdin; Chamness**. *Gene*, 1995, vol. 159, 19-27 [0007]
- **Hynes**; *Stern. Biochim Biophys. Acta*, 1994, vol. 1198, 165-184 [0007]
- 15 • **Baselga** *et al.* *Oncolgy*, 1997, vol. 11 (3), 43-48 [0007]
- **Baselga** *et al.* *J. Clin. Oncol.*, 1996, vol. 14, 737-744 [0007]
 - Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs. **Murakami** *et al.* *The Molecular Basis of Cancer*. WB Saunders, 1995, 13 [0051]
- 20 • **Wilman**. Prodrugs in Cancer Chemotherapy. *Biochemical Society Transactions*, 1986, vol. 14, 375-382 [0054]
 - Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. **Stella** *et al.* *Directed Drug Delivery*. *Humana Press*, 1985, 147-267 [0054]
- 25 • **Nielsen** *et al.* *Prot. Eng.*, 1997, vol. 10, 1-6 [0062]
- von **Heinje** *et al.* *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 14, 4683-4690 [0062]
- 30 • **Altschul** *et al.* *Nucleic Acids Res.*, 1997, vol. 25, 3389-3402 [0066] [0073]
- **Altschul** *et al.* *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0068] [0075]
- 35 • **Ausubel** *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience Publishers, 1995 [0084]
- **Sambrook** *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Press*, 1989 [0086]
- 40 • **Kabat** *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest. *National Institute of Health*, 1991 [0098]
- **Clothia; Lesk**. *J. Mol. Biol.*, 1987, vol. 196, 901-917 [0098]
- 45 • **Zapata** *et al.* *Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0099]
- **Kohler**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0105]
- 50 • **Clackson**. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0105]
- **Marks** *et al.* *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0105]
- **Morrison** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 6851-6855 [0106]
- 55 • **Jones**. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0107]
- **Reichmann** *et al.* *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0107]
- **Presta**. *Curro Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0107]
- 60 • **Pluckthun**. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. *Springer-Verlag*, 1994, vol. 113, 269-315 [0108]
- **Hollinger** *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0109] [0255]
- 65 • **Carter** *et al.* *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 13, 4331 [0126]
- **Zoller**. *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 10, 6487 [0126]
- 70 • **Wells** *et al.* *Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0126]
- **Wells** *et al.* *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 1986, vol. 317, 41-5 [0126]

ES 2 332 916 T3

- **Cunningham; Wells.** *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0127]
- **Creighton.** *The Proteins*. W.H. Freeman & Co, [0127]
- 5 • **Chothia.** *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0127]
- T.E. **Creighton.** *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W.H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0129]
- 10 • **Aplin; Wriston.** *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0132]
- **Hakimuddin et al.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0133]
- 15 • **Edge et al.** *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0133]
- **Thotakura et al.** *Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0133]
- 20 • **Field et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2165 [0136]
- **Evan et al.** *Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0136]
- 25 • **Paborsky et al.** *Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0136]
- **Hopp et al.** *BioTechnology*, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0136]
- 30 • **Martin et al.** *Science*, 1992, vol. 255, 192-194 [0136]
- **Skinner et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0136]
- **Lutz-Freyermuth.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0136]
- 35 • **Stewart et al.** *Solid-Phase Peptide Synthesis*. W.H. Freeman Co, 1969 [0138]
- **Merrifield.** *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0138]
- 40 • **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0140]
- **Dieffenbach et al.** *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 [0140]
- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. IRL Press, 1991 [0144]
- 45 • **Shaw et al.** *Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0145]
- **Graham; van der Eb.** *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0145]
- **Solinsen.** *J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0145]
- 50 • **Hsiao et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0145]
- **Keown et al.** *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0145]
- **Mansour et al.** *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0145]
- 55 • **Beach; Nurse.** *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0147]
- **Fleer et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0147]
- **Louvencourt et al.** *J. Bacteriol.*, 1983, 737 [0147]
- 60 • **Vanden Berg et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0147]
- **Sreekrishna et al.** *J. Basic Microbiol.*, 1988, vol. 28, 265-278 [0147]
- **Case et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0147]
- 65 • **Ballance et al.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0147]
- **Tilburn.** *Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0147]

ES 2 332 916 T3

- **Yelton** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0147]
- **Kelly; Hynes.** *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0147]
- 5 • **C. Anthony.** *The Biochemistry of Methylotrophs*, 1982, vol. 269 [0147]
- **Graham** et al. *J. Gen. Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0148]
- 10 • **Urlaub; Chasin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0148]
- **TM4. Mather.** *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0148]
- 15 • **Urlaub** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0153]
- **Stinchcomb.** *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0153]
- **Kingsman** et al. *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0153]
- **Tschemper** et al. *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0153]
- 20 • **Jones.** *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0153]
- **Chang** et al. *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0154]
- 25 • **Goeddel** et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0154]
- **Goeddel.** *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0154]
- 30 • **deBoer** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0154]
- **Hitzeman** et al. *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0155]
- **Hess** et al. *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0155]
- 35 • **Holland.** *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0155]
- **Gething** et al. *Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0160]
- **Mantel** et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0160]
- 40 • **Thomas.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0161] [0184]
- **Deutscher.** *Methods in Enzymology*. 1990, vol. 182 [0164]
- 45 • **Scopes.** *Protein Purification: Principles and Practice*. *Springer-Verlag*, 1982 [0164]
- **Gray** et al. *Radiation Res.*, 1994, vol. 137, 275-289 [0171]
- 50 • **S. Gelmini** et al. *Clin. Chem.*, 1997, vol. 43, 752 [0174]
- **Stewart** et al. *Genome Research*, 1997, vol. 7, 422-433 [0186]
- **Zola.** *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*. *CRC Press. Inc*, 1987, 147-158 [0188]
- 55 • **Small** et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1985, vol. 5, 642-648 [0194]
- **The Nude Mouse in Oncology Research**. *CRC Press. Inc*, 1991 [0196]
- 60 • **Karmali** et al. *Br. J. Cancer*, 1983, vol. 48, 689-696 [0197]
- **Drebin** et al. *PNAS USA*, 1986, vol. 83, 9129-9133 [0199]
- **Wang** et al. *Cancer Research*, 1994, vol. 54, 4726-4728 [0200]
- 65 • **Too** et al. *Cancer Research*, 1995, vol. 55, 681-684 [0200]
- **DeLeo** et al. *J. Exp. Med.*, 1977, vol. 146, 720 [0202]

ES 2 332 916 T3

- **Palladino** et al. *J. Immunol.*, 1987, vol. 138, 4023-4032 [0202]
- **Zupi** et al. *Br. J. Cancer*, 1980, vol. 41 (4), 309 [0203]
- 5 • **Zacharski**. *Haemostasis*, 1986, vol. 16, 300-320 [0203]
- **Rygaard; Spang-Thomsen**. Proc. 6th Int. Workshop on Immune-Deficient Animals. 1989, 301 [0204]
- 10 • **Van der Putten** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 6148-615 [0205]
- 15 • **Thompson** et al. *Cell*, 1989, vol. 56, 313-321 [0205]
- **Lo**. *Mol. Cell Biol.*, 1983, vol. 3, 1803-1814 [0205]
- 15 • **Lavitrano** et al. *Cell*, 1989, vol. 57, 717-73 [0205]
- **Lasko** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 6232-6236 [0206]
- 20 • **Thomas; Capecchi**. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0208]
- **Li** et al. *Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0208]
- **Bradley**. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach. *IRL*, 1987, 113-152 [0208]
- 25 • **Fields; Song**. *Nature*, 1989, vol. 340, 245-246 [0214]
- **Chien** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0214]
- 30 • **Chevray; Nathans**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 89, 5789-5793 [0214]
- **Coligan** et al. *Current Protocols in Immun.* 1991, vol. 1 [0216]
- 35 • **Lee** et al. *Nucl. Acids Res.*, 1979, vol. 6, 3073 [0220]
- **Cooney** et al. *Science*, 1988, vol. 241, 456 [0220]
- **Dervan** et al. *Science*, 1991, vol. 251, 1360 [0220]
- 40 • **Okano**. *Neurochem.*, 1991, vol. 56, 560 [0220]
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression. *CRC Press*, 1988 [0220]
- **Rossi**. *Current Biology*, 1994, vol. 4, 469-471 [0223] [0228]
- 45 • **Kohler; Milstein**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0233]
- **Coding**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0234]
- 50 • **Kozbor**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0235]
 - **Brodeur** et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. *Marcel Dekker, Inc*, 1987, 51-63 [0235]
- 55 • **Munson; Pollard**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0236]
- **Jones** et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0242]
- **Riechmann** et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0242]
- 60 • **Presta**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0242]
- **Jones** et al. *Nature*, vol. 321, 522-525 [0243]
- **Riechmann** et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0243]
- 65 • **Verhoeyen** et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0243]
- **Hoogenboom; Winter**. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0244]

ES 2 332 916 T3

- **Marks** et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0244]
- **Cole** et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. *Alan R. Liss*, 1985, 77 [0244]
- 5 • **Boerner** et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0244]
- **Marks** et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0244]
- 10 • **Lonberg** et al. *Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0244]
- **Morrison**. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0244]
- 15 • **Fishwild** et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0244]
- **Neuberger**. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0244]
- 20 • **Lonberg; Huszar**. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0244]
- **Massey**. *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0247]
- 25 • **Neuberger** et al. *Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0248]
- **Milstein; Cuello**. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0250]
- 30 • **Traunecker** et al. *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0250]
- **Suresh** et al. *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0251]
- 35 • **Brennan** et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0253]
- **Shalaby** et al. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 175, 217-225 [0254]
- 40 • **Kostelny** et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0255]
- **Gruber**. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0255]
- 45 • **Tutt** et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0256]
- **Caron** et al. *J. Exp. Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0259]
- 50 • **Shopes**. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0259]
- **Wolff** et al. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0259]
- 55 • **Stevenson** et al. *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0259]
- **Vitella** et al. *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0262]
- 60 • **Epstein** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0264]
- **Hwang** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0264]
- **Martin** et al. *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, 286-288 [0265]
- 65 • **Gabizon** et al. *J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0265]
- **Marasco** et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0267]
- **Remington's Pharmaceutical Sciences**. 1980 [0268] [0271]
- 60 • Chemotherapy Service. *Williams & Wilkins*, 1992 [0276]
- **Sambrook** et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Press*, 1989 [0286]
- 65 • **Ausubel**. *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Associates and Wiley Interscience, 1989 [0286]
- **Innis** et al. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *Academic Press. Inc*, 1990 [0286]

ES 2 332 916 T3

- **Harlow et al.** Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Press*, 1998 [0286]
- **Gait.** Oligonucleotide Synthesis. *IRL Press*, 1984 [0286]
- 5 • **R.I. Freshney.** *Animal Cell Culture*, 1987 [0286]
- **Coligan et al.** *Current Protocols in Immunology*, 1991 [0286]
- 10 • **Altshul et al.** *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0288]
- **Bolivar et al.** *Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0318]
- 15 • **Thimmappaya et al.** *Cell*, 1982, vol. 31, 543 [0328]
- **Sompanyrac et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 12, 7575 [0330]
- 20 • **Ausubel et al.** *Current Protocols of Molecular Biology*. *John Wiley and Sons*, 1997 [0334]
- **Lucas.** *Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24 (9), 1774-1779 [0334]
- **O'Reilly.** Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. *Oxford University Press*, 1994 [0345]
- 25 • **Rupert et al.** *Nature*, 1993, vol. 362, 175-179 [0346]

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido PRO7422 aislado.

5 (a) que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2;

10 (b) que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante de longitud completa del ADN plasmídico depositado bajo el número de acceso de ATCC PTA-551;

15 (c) que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido mostrado en la figura 2 que carece de su péptido señal asociado;

20 (d) que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2, con su péptido señal asociado; o

25 (e) que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2, que carece de su péptido señal asociado;

cuyo polipéptido se sobreexpresa en el cáncer de pulmón.

2. Polipéptido PRO7422, según la reivindicación 1, en el que el nivel de identidad en la secuencia es del 85%.

3. Polipéptido PRO7422, según la reivindicación 1, en el que el nivel de identidad en la secuencia es del 90%.

4. Polipéptido PRO7422, según la reivindicación 1, en el que el nivel de identidad en la secuencia es del 95%.

30 5. Polipéptido PRO7422 aislado, según la reivindicación 1, que además

(a) tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2;

35 (b) que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante de longitud completa del ADN depositado bajo el número de acceso de ATCC PTA-551;

(c) que tiene la secuencia de aminoácidos del polipéptido mostrado en la figura 2 que carece de su péptido señal asociado;

40 (d) que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2, con su péptido señal asociado; o

(e) que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2, que carece de su péptido señal asociado.

45 6. Molécula químérica que comprende un polipéptido PRO7422, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.

7. Ácido nucleico que tiene:

50 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2;

55 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido mostrado en la figura 2 que carece de su péptido señal asociado;

60 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2, con su péptido señal asociado;

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2, que carece de su péptido señal asociado;

65 (e) una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1;

ES 2 332 916 T3

(f) por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia codificante de longitud completa del ADN plasmídico depositado bajo el número de acceso de ATCC PTA-551;

cuyo ácido nucleico se amplifica en el cáncer de pulmón.

5

8. Ácido nucleico, según la reivindicación 7, en el que el nivel de identidad en la secuencia es del 85%.

10

9. Ácido nucleico, según la reivindicación 7, en el que el nivel de identidad en la secuencia es del 90%.

15

10. Ácido nucleico, según la reivindicación 7, en el que el nivel de identidad en la secuencia es del 95%.

20

11. Ácido nucleico aislado, según la reivindicación 7, que tiene además

25

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2;

30

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido mostrado en la figura 2 que carece de su péptido señal asociado;

20

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2, con su péptido señal asociado;

25

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2 que carece de su péptido señal asociado;

30

(e) la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1;

35

(f) la secuencia codificante de longitud completa del ADN plasmídico depositado bajo el número de acceso de ATCC PTA-551.

40

12. Vector que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.

45

13. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 12.

50

14. Proceso para producir un polipéptido PRO7422, según la reivindicación 1, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 13 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido y recuperar dicho polipéptido del cultivo celular.

55

15. Anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido PRO7422 según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

60

16. Anticuerpo, según la reivindicación 15, que es un anticuerpo monoclonal.

65

17. Anticuerpo, según la reivindicación 16, que comprende una región determinante de complementariedad (CDR) no humana o una región armazón (FR) humana.

70

18. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, que está marcado.

75

19. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, que es un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena única.

80

20. Molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19.

85

21. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 20.

90

22. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 21.

95

23. Procedimiento para producir un anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, comprendiendo dicho procedimiento cultivar la célula huésped según la reivindicación 22 en condiciones suficientes para permitir la expresión de dicho anticuerpo y recuperar dicho anticuerpo del cultivo celular.

100

24. Molécula de ácido nucleico aislada que se hibrida en condiciones astringentes a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido PRO7422, según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o el complemento de la misma, en el que dichas condiciones astringentes utilizan formamida al 50%, 5x SSC, fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2xSSC y formamida al 50% a 55°C, seguido de un

ES 2 332 916 T3

lavado que comprende 0,1 x SSC que contiene EDTA al 55°C, y donde dicha molécula de ácido nucleico se amplifica en cáncer de pulmón.

25. Procedimiento para determinar la presencia de un polipéptido PRO7422, según se define en cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 5, en una muestra sospechosa de contener dicho polipéptido, comprendiendo dicho procedimiento
exponer la muestra a un anticuerpo anti-PRO7422, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, y determinar la
unión de dicho anticuerpo a dicho polipéptido en dicha muestra.

26. Procedimiento, según la reivindicación 25, en el que dicha muestra comprende una célula sospechosa de con-
10 tener un polipéptido PRO7422 según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

27. Método de diagnóstico de un tumor de pulmón, comprendiendo dicho método:

(i) detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido PRO7422, según se define en cualquiera
15 de las reivindicaciones 1 a 5, (a) en una muestra a analizar de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) en
una muestra de control de células de tejido normal conocido del mismo tipo de célula, donde un nivel de expresión
superior en la muestra a analizar en comparación con la muestra de control es indicativo de la presencia del tumor en
el mamífero del cual se obtuvieron las células del tejido a analizar; o

(ii) (a) poner en contacto un anticuerpo anti-PRO7422, según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, con una
20 muestra a analizar de células de tejido obtenidas del mamífero, y una muestra de control de células de tejido normal
del mismo tipo de célula, y (b) detectar la formación de un complejo entre dicho anticuerpo y un polipéptido PRO7422
en la muestra a analizar y la muestra de control, donde la formación de una mayor cantidad de complejos en la muestra
a analizar es indicativa de la presencia de un tumor en dicho mamífero.

25 28. Kit de diagnóstico de cáncer de pulmón que comprende un anticuerpo anti-PRO7422 según cualquiera de las
reivindicaciones 15 a 19 y un portador en un envase adecuado.

29. Kit según la reivindicación 28, que comprende además instrucciones para utilizar dicho anticuerpo para detectar
30 la presencia de un polipéptido PRO7422 en una muestra sospechosa de contener el mismo.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 332 916 T3

FIGURA 1

ATGAGGAAGCTCCAGGGCAGGATGGTTACCTGCCTGGACAGCAAGATGATGGCTACACTAGCCCCATTCTCTGGCGCTGGATTTGCCACCAAGATCTCTCACCTCTGCCCTCACCTCTGCTGTACCTACAAGGTCTCCCAGATTCTCATCTGCCATAATCATGGACACAGCCCCAGGATGTGAGGACTCTCAGGGACCATCTGAGTTCCAGCTGGAATCTGGGCTGGTGGACTGGGAGTGGGAGTCAGGGCCTGCATTGGCTGACTTAGAGAGCACAGTTATTCCATCCATTGGAAATAAACATTGGATTCCCTGATC

ES 2 332 916 T3

FIGURA 2

**MMATLAPILWAPGFAHQISSPLALHLLYLQGLPDSHLPIIMDTAPGCAGLSGTIWSSSWNLGLVVEWEGR
GLHWADLESTVIPSINK**

Secuencia señal: Aminoácidos 1-15

Sitios de N-miristoilación: Aminoácidos 32-38; 50-56; 53-59; 72-78

ES 2 332 916 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

5 <120> Composiciones y métodos para el tratamiento de tumores

<130> CMD/FP6321921

10 <140> 05024729.5

<141> 2000-05-15

<150> US 60/138,385

15 <151> 1999-06-09

<150> US 60/144,790

<151> 1999-07-20

20 <150> US 60/146,843

<151> 1999-08-03

25 <150> US 60/148,188

<151> 1999-08-10

30 <150> US 60/149,320

<151> 1999-08-17

<150> US 60/149,327

<151> 1999-08-17

35 <150> US 60/149, 396

<151> 1999-08-17

40 <150> US 60/150, 114

<151> 1999-08-20

45 <150> US 60/151, 700

<151> 1999-08-31

<150> US 60/151, 734

50 <151> 1999-08-31

<160> 66

55 <210> 1

<211> 520

<212> DNA

<213> *Homo Sapien*

60

ES 2 332 916 T3

<400> 1

5 cggtcatgc gcccgcct gtggctggc ctggctggc tgctgctggc 50
 gccccgcgg gacgcccgg gaaccccgag cgcgtcgcg ggaccgcga 100
 gctacccgca cctggagggc gacgtgcgt ggcggccct ctttcctcc 150
10 actcacttct tcctgcgt ggatcccggc ggccgcgtgc agggcaccgg 200
 ctggcgccac gccaggaca gatccctgga gatccgtct gtacacgtgg 250
 gcgtcgttgt catcaaagca gtgtcctcag gtttacgt gccccatgaac 300
15 cgccggggcc gcctctacgg gtcgcactc tacaccgtgg actgcaggtt 350
 ccgggagcgc atcgaagaga acggccacaa cacctacgcc tcacagcgct 400
 ggccgcgcgg cgccagccc atgttcctgg cgctggacag gaggggggggg 450
20 ccccggccag gcccgggac gcccgggtac cacctgtccg cccacttct 500
 gccccgtcctg gtctcctgag 520

25 <210> 2
<211> 170
<212> PRT
<213> *Homo Sapien*

30 <400> 2

35 Met Arg Arg Arg Leu Trp Leu Gly Leu Ala Trp Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

40 Arg Ala Pro Asp Ala Ala Gly Thr Pro Ser Ala Ser Arg Gly Pro
 20 25 30

45 Arg Ser Tyr Pro His Leu Glu Gly Asp Val Arg Trp Arg Arg Leu
 35 40 45

50 Phe Ser Ser Thr His Phe Phe Leu Arg Val Asp Pro Gly Gly Arg
 50 55 60

55 Val Gln Gly Thr Arg Trp Arg His Gly Gln Asp Ser Ile Leu Glu
 65 70 75

60 Ile Arg Ser Val His Val Gly Val Val Val Ile Lys Ala Val Ser
 80 85 90

65 Ser Gly Phe Tyr Val Ala Met Asn Arg Arg Gly Arg Leu Tyr Gly
 95 100 105

70 Ser Arg Leu Tyr Thr Val Asp Cys Arg Phe Arg Glu Arg Ile Glu
 110 115 120

75 Glu Asn Gly His Asn Thr Tyr Ala Ser Gln Arg Trp Arg Arg Arg
 125 130 135

80 Gly Gln Pro Met Phe Leu Ala Leu Asp Arg Arg Gly Gly Pro Arg
 140 145 150

85 Pro Gly Gly Arg Thr Arg Arg Tyr His Leu Ser Ala His Phe Leu
 155 160 165

90 Pro Val Leu Val Ser
 170

ES 2 332 916 T3

<210> 3
<211> 841
<212> ADN
5 <213> *Homo Sapien*

<400> 3

10 ggcggcga gcagtctgaa tgccagaatg gataaccgtt ttgctacagc 50
atttgtaatt gcttgtgtgc ttagcctcat ttccaccatc tacatggcag 100
cctccattgg cacagacttc tggtatgaat atcgaagtcc agttcaagaa 150
15 aattccagtg atttgaataa aagcatctgg gatgaattca ttagtcatga 200
ggcagatgaa aagacttata atgatgact tttcgatac aatggcacag 250
tgggattgtg gagacggtgt atcaccatac ccaaaaacat gcattggat 300
20 agcccaccag aaaggacaga gtcatttgat gtggtcacaa aatgtgtgag 350
tttcacacta actgagcagt tcatggagaa atttgttgat cccggaaacc 400
25 acaatagcgg gattgatctc cttaggacct atcttggcg ttgccagttc 450
cttttacctt ttgtgagttt aggtttgatg tgctttgggg ctttgatcgg 500
30 actttgtgct tgcatttgcc gaagcttata tcccaccatt gccacggca 550
ttctccatct cttgcagat accatgctgt gaagtccagg ccacatggag 600
gtgtcctgtg tagatgctcc agctgaaatc ccaagctaag ctcccaactg 650
35 acagccaaaca tcatttccag ccatgtgtgg gagccatcct ggatgtccag 700
ccttaacaag cttcagagg acttcagcca cagctattat cttactacat 750
40 ctttgtgaga ctctaataaa gaaccaacta gctgagccca atcaacctat 800
ggaactgata gaaataaaaat gaattgttgt tttgtgccgt t 841

45 <210> 4
<211> 184
<212> PRT
50 <213> *Homo Sapien*

55

60

65

ES 2 332 916 T3

<400> 4

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

45 <210> 5

<211> 1130

<212> ADN

50 <213> *Homo Sapien*

55

60

65

ES 2 332 916 T3

<400> 5

5 gggcctggcg atccggatcc cgcaaggcg cgctggctgc tgcccccgtg 50
tctgtcgta tggtgccccct ctgggtgtat ctggtggcgg cagtttgct 100
catcgccctg atcctcttcc tgactcgcag ccggggtcgg gcggcagcag 150
10 ctgacggaga accactgcac aatgaggaag agagggcagg agcaggccag 200
gtaggccgct ctttgccccca ggagtctgaa gaacagagaa ctggaagcag 250
15 acccccggcgt cggagggact tgggcagccg tctacaggcc cagcgtcgag 300
cccagcaggt ggcctggaa gacggggatg agaatgtggg tcaaactgtt 350
attccagccc aggaggaaga aggcatcgag aagccagcag aagttcaccc 400
20 aacagggaaa attggagcca agaaactacg gaagctagag gaaaaacagg 450
ctcgaaaggc tcagcgagag gcagaggagg ctgaacgtga agaacggaaa 500
25 cgcctagagt cccaacgtga ggccgaatgg aagaaggaag aggaacggct 550
tcgcctgaag gaagaacaga aggaggagga agagaggaag gctcaggagg 600
30 agcagggcccg gccccatcac gaggagtacc tgaaactgaa ggaggccttc 650
gtggtagaag aagaaggtgt tagcgaaacc atgactgagg agcagtctca 700
cagcttcctg acagaattca tcaattacat caagaagtcc aaggttgtgc 750
35 ttttggaaaga tctggcttcc cagatggcc taaggactca ggacgccata 800
aaccgcatcc agacactgct gacgggggg actctaacag gtgtgattga 850
40 cgaccggggc aagtttatct acataacccc agaggaactg gctgccgtgg 900
ccaatttcat ccgacagcgg ggccgggtgt ccatcacaga gcttgcctcag 950
gccagcaact ccctcatctc ctggggccag gaccccttg cccaggcttc 1000
45 agcctgactc cagtccttcc ttgagtgat cctgtggcct acatgtgtct 1050
tcatccttcc ctaatgccgt cttggggcag ggatgaaata tgaccagaaa 1100
gttgtggatt aaaggcctgt gaatactgaa 1130

50

<210> 6

<211> 315

55 <212> PRT

<213> *Homo Sapien*

60

65

ES 2 332 916 T3

<400> 6

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

65 <210> 7

<211> 3476

ES 2 332 916 T3

<212> ADN

<213> *Homo Sapien*

5 <400> 7

gctctatgcc gcctacaccttgc ctctcgccgc tgctgccggc gccgaagcag 50
10 agaaggcagc gggtcccgtg accgtcccga gagccccgcg ctcccgaacca 100
ggggggcgccccgg gcggccccgg ggagggcgccc gcagggggcg ggaaagaaaa 150
15 gggggttttg tgctgcgcgg ggagggccgg cgccctcttc cgaatgtcct 200
gcggcccccaag cctctcctca cgctcgcgca gtctccgcgg cagtctcagc 250
tgcaagctgca ggactgagcc gtgcacccgg aggagacccc cggaggaggc 300
20 gacaaacttc gcagtgcgcgc gacccaacccc cagccctggg tagcctgcag 350
catggcccaag ctgttcctgc ccctgctggc agccctggc ctggcccaagg 400
25 ctcctgcagc ttttagcagat gttcttggaaag gagacagctc agaggaccgc 450
gcttttcgcgc tgccatcgcc gggcgacgcg ccactgcagg gcgtgctcg 500
30 cggcgccctc accatccctt gccacgtcca ctacctgcgg ccaccgcccga 550
gccgcgcggc tgtgctggc tctccgcgg tcaagtggac tttcctgtcc 600
35 cggggccggg aggcagaggt gctgggtggc cggggagtgcc gcgtcaaggt 650
gaacgaggcc taccggttcc gcgtggcaact gcctgcgtac ccagcgtcgc 700
tcaccgacgt ctccctggcg ctgagcgagc tgccgcggccaa cgactcaggt 750
40 atctatcgct gtgaggtcca gcacggcatc gatgacagca gcgacgctgt 800
ggaggtcaag gtcaaagggg tcgtctttct ctaccgagag ggctctgccc 850
45 gctatgcttt ctcctttctt ggggcccagg aggccctgtgc ccgcatttgg 900
gccccacatcg ccaccccgga gcagctctat gccgcctacc ttgggggcta 950
tgagcaatgt gatgctggct ggctgtcgga tcagaccgtg aggtatccca 1000
50 tccagacccc acgagaggcc ttttacggag acatggatgg cttccccggg 1050
gtccggaaact atggtgtggat ggacccggat gacctctatg atgtgtactg 1100
55 ttatgctgaa gacctaataatg gagaactgtt cctgggtgac cctccagaga 1150
agctgacatt ggaggaagca cggcgctact gccaggagcg gggtgcagag 1200
60 attgccacca cgggccaact gtatgcagcc tggatggtg gcctggacca 1250
ctgcagccca ggggtggcttag ctgatggcag tgtgcgtac cccatcgta 1300
cacccagccca gcgcgtgtggt gggggcttgc ctgggtgtcaa gactcttcc 1350
65 ctcttccccca accagactgg cttccccaaat aagcacagcc gcttcaacgt 1400

ES 2 332 916 T3

ctactgcttc cgagactcg cgccagccttc tgccatccct gaggcctcca 1450
5 acccagcctc caaccaggcc tctgatggac tagaggctat cgtcacagtg 1500
acagagaccc tggaggaact gcagctgcct caggaagcca cagagagtga 1550
atcccgtggg gccatctact ccatccccat catggaggac ggaggaggtg 1600
10 gaagctccac tccagaagac ccagcagagg cccctaggac gctcctagaa 1650
tttggaaacac aatccatggt accgccccacg gggttcttag aagaggaagg 1700
taaggcattg gaggaagaag agaaaatatga agatgaagaa gagaaagagg 1750
15 aggaagaaga agaggaggag gtggaggatg aggctctgtg ggcattggccc 1800
agcgagctca gcagccccggg ccctgaggcc tctctccca ctgagccagc 1850
20 agcccaggag aagtcaactct cccaggcgcc agcaaggca gtcctgcagc 1900
ctggtgcatc accacttcct gatggagagt cagaagcttc caggcctcca 1950
agggtccatg gaccacctac tgagactctg cccactccca gggagaggaa 2000
25 cctagcatcc ccatcacctt ccactcttgt tgaggcaaga gaggtggggg 2050
aggcaactgg tggccttagag ctatctggg tccctcgagg agagagcgag 2100
gagacaggaa gctccgaggg tgccccttcc ctgcttccag ccacacgggc 2150
30 ccctgagggt accagggagc tggaggcccc ctctgaagat aattctggaa 2200
gaactgcccc agcagggacc tcagtgcaagg cccagccagt gctgccact 2250
35 gacagcgcca gccgaggtgg agtggccgtg gtccccgcat caggtgactg 2300
tgtccccagc ccctgccaca atggtgggac atgcttggag gaggaggaag 2350
40 gggtccgctg cctatgtctg cctggctatg gggggacct gtgcgtatgtt 2400
ggcctccgt tctgcaaccc cggctggac gccttccagg ggcctgtcta 2450
caagcacttt tccacacgaa ggagctggga ggaggcagag acccagtgcc 2500
45 ggtatgtacgg cgccgcacatcg gccagcatca gcacacccga ggaacaggac 2550
ttcatcaaca accggtaccg ggagtaccag tggatcgac tcaacgacag 2600
gaccatcgaa ggcgacttct tgtggtcgga tggcgtcccc ctgctctatg 2650
50 agaactggaa ccctgggcag cctgacagct acttcctgtc tggagagaac 2700
tgcgtggtca tggtgtggca tgatcaggaa caatggagtg acgtgccctg 2750
55 caactaccac ctgtcctaca cctgcaagat ggggctggtg tccctgtgggc 2800
cgccacccgga gctgcccctg gctcaagtgt tcggccgccc acggctgcgc 2850
tatgaggtgg acactgtgtc tgcgtaccgg tgccggaaag gactggccca 2900
60 gcgcaatctg ccgctgatcc gatgccaaga gaacggtcgt tgggaggcccc 2950
cccagatctc ctgtgtgccc agaagacctg cccgagctct gcacccagag 3000

ES 2 332 916 T3

gaggaccag aaggacgtca ggggaggcta ctgggacgct ggaaggcgct 3050
 gttgatcccc cttccagcc ccatgccagg tcccttaggg gcaaggcctt 3100
 5 gaacactgcc ggccacagca ctgcctgtc acccaaattt tccctcacac 3150
 cttgcgtcc cgccaccaca ggaagtgaca acatgacgag gggtggtgct 3200
 ggagtccagg tgacagttcc tgaaggggct tctggaaat acctaggagg 3250
 10 ctccagccca gcccaggccc tctccctta ccctggcac cagatcttcc 3300
 atcagggccg gagtaaatcc ctaagtgcct caactgcctt ctccctggca 3350
 15 gccatcttgt cccctctatt cctctaggga gcactgtgcc cactcttct 3400
 gggtttcca aggaaatggg cttgcaggat ggagtgtctg taaaatcaac 3450
 aggaaataaa actgtgtatg agccca 3476

20 <210> 8
 <211> 911
 <212> PRT
 25 <213> *Homo Sapien*
 <400> 8

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

ES 2 332 916 T3

	185	190	195
5	Tyr Leu Gly Gly Tyr Glu Gln Cys Asp Ala Gly Trp Leu Ser Asp 200	205	210
	Gln Thr Val Arg Tyr Pro Ile Gln Thr Pro Arg Glu Ala Cys Tyr 215	220	225
10	Gly Asp Met Asp Gly Phe Pro Gly Val Arg Asn Tyr Gly Val Val 230	235	240
	Asp Pro Asp Asp Leu Tyr Asp Val Tyr Cys Tyr Ala Glu Asp Leu 245	250	255
15	Asn Gly Glu Leu Phe Leu Gly Asp Pro Pro Glu Lys Leu Thr Leu 260	265	270
	Glu Glu Ala Arg Ala Tyr Cys Gln Glu Arg Gly Ala Glu Ile Ala 275	280	285
20	Thr Thr Gly Gln Leu Tyr Ala Ala Trp Asp Gly Gly Leu Asp His 290	295	300
	Cys Ser Pro Gly Trp Leu Ala Asp Gly Ser Val Arg Tyr Pro Ile 305	310	315
25	Val Thr Pro Ser Gln Arg Cys Gly Gly Leu Pro Gly Val Lys 320	325	330
	Thr Leu Phe Leu Phe Pro Asn Gln Thr Gly Phe Pro Asn Lys His 335	340	345
30	Ser Arg Phe Asn Val Tyr Cys Phe Arg Asp Ser Ala Gln Pro Ser 350	355	360
	Ala Ile Pro Glu Ala Ser Asn Pro Ala Ser Asn Pro Ala Ser Asp 365	370	375
	Gly Leu Glu Ala Ile Val Thr Val Thr Glu Thr Leu Glu Glu Leu 380	385	390
40	Gln Leu Pro Gln Glu Ala Thr Glu Ser Glu Ser Arg Gly Ala Ile 395	400	405
	Tyr Ser Ile Pro Ile Met Glu Asp Gly Gly Gly Ser Ser Thr 410	415	420
45	Pro Glu Asp Pro Ala Glu Ala Pro Arg Thr Leu Leu Glu Phe Glu 425	430	435
	Thr Gln Ser Met Val Pro Pro Thr Gly Phe Ser Glu Glu Glu Gly 440	445	450
50	Lys Ala Leu Glu Glu Glu Glu Lys Tyr Glu Asp Glu Glu Glu Lys 455	460	465
	Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Val Glu Asp Glu Ala Leu Trp 470	475	480
55	Ala Trp Pro Ser Glu Leu Ser Ser Pro Gly Pro Glu Ala Ser Leu 485	490	495
	Pro Thr Glu Pro Ala Ala Gln Glu Lys Ser Leu Ser Gln Ala Pro		

ES 2 332 916 T3

	500	505	510
5	Ala Arg Ala Val Leu Gln Pro Gly Ala Ser Pro Leu Pro Asp Gly 515	520	525
	Glu Ser Glu Ala Ser Arg Pro Pro Arg Val His Gly Pro Pro Thr 530	535	540
10	Glu Thr Leu Pro Thr Pro Arg Glu Arg Asn Leu Ala Ser Pro Ser 545	550	555
	Pro Ser Thr Leu Val Glu Ala Arg Glu Val Gly Glu Ala Thr Gly 560	565	570
15	Gly Pro Glu Leu Ser Gly Val Pro Arg Gly Glu Ser Glu Glu Thr 575	580	585
	Gly Ser Ser Glu Gly Ala Pro Ser Leu Leu Pro Ala Thr Arg Ala 590	595	600
20	Pro Glu Gly Thr Arg Glu Leu Glu Ala Pro Ser Glu Asp Asn Ser 605	610	615
	Gly Arg Thr Ala Pro Ala Gly Thr Ser Val Gln Ala Gln Pro Val 620	625	630
25	Leu Pro Thr Asp Ser Ala Ser Arg Gly Gly Val Ala Val Val Pro 635	640	645
	Ala Ser Gly Asp Cys Val Pro Ser Pro Cys His Asn Gly Gly Thr 650	655	660
30	Cys Leu Glu Glu Glu Gly Val Arg Cys Leu Cys Leu Pro Gly 665	670	675
	Tyr Gly Gly Asp Leu Cys Asp Val Gly Leu Arg Phe Cys Asn Pro 680	685	690
35	Gly Trp Asp Ala Phe Gln Gly Ala Cys Tyr Lys His Phe Ser Thr 695	700	705
	Arg Arg Ser Trp Glu Glu Ala Glu Thr Gln Cys Arg Met Tyr Gly 710	715	720
40	Ala His Leu Ala Ser Ile Ser Thr Pro Glu Glu Gln Asp Phe Ile 725	730	735
	Asn Asn Arg Tyr Arg Glu Tyr Gln Trp Ile Gly Leu Asn Asp Arg 740	745	750
45	Thr Ile Glu Gly Asp Phe Leu Trp Ser Asp Gly Val Pro Leu Leu 755	760	765
	Tyr Glu Asn Trp Asn Pro Gly Gln Pro Asp Ser Tyr Phe Leu Ser 770	775	780
50	Gly Glu Asn Cys Val Val Met Val Trp His Asp Gln Gly Gln Trp 785	790	795
	Ser Asp Val Pro Cys Asn Tyr His Leu Ser Tyr Thr Cys Lys Met 800	805	810
55	Gly Leu Val Ser Cys Gly Pro Pro Glu Leu Pro Leu Ala Gln		

ES 2 332 916 T3

	815	820	825
	Val Phe Gly Arg Pro Arg Leu Arg Tyr	Glu Val Asp Thr Val	Leu
5	830	835	840
	Arg Tyr Arg Cys Arg Glu Gly Leu Ala	Gln Arg Asn Leu Pro	Leu
	845	850	855
10	Ile Arg Cys Gln Glu Asn Gly Arg Trp	Glu Ala Pro Gln Ile	Ser
	860	865	870
	Cys Val Pro Arg Arg Pro Ala Arg Ala	Leu His Pro Glu Glu	Asp
	875	880	885
15	Pro Glu Gly Arg Gln Gly Arg Leu Leu	Gly Arg Trp Lys Ala	Leu
	890	895	900
20	Leu Ile Pro Pro Ser Ser Pro Met Pro	Gly Pro	
	905	910	
	<210> 9		
	<211> 2663		
25	<212> ADN		
	<213> <i>Homo Sapien</i>		
	<400> 9		
30	cccaactcgcc ggtttggcgg gagggagggg ctttgccgcag gccccgttcc	50	
	cgcggccctt ccatgcggcc cgccccgatt gcgtgtggc tgcgccttgtt	100	
	cttggccctg gcccttgcgc gccccgggc tgggggtgg gccccgggtcc	150	
35	gagccccat ctatgtcagc agctggggccg tccagggtgtc ccagggttaac	200	
	cgggagggtcg agcgcctggc acgcaaattc ggcttcgtca acctggggcc	250	
40	gatcttctct gacgggcagt actttcacct gcggcaccgg ggcgtggtcc	300	
	agcagtcctt gacccgcac tggggccacc gcctgcacctt gaagaaaaac	350	
	cccaagggtgc agtgggttcca gcagcagacg ctgcagcggc gggtaaacg	400	
45	ctctgtcggt gtgcccacgg acccctggtt ctccaagcag tggtacatga	450	
	acagcgaggc ccaaccagac ctgagcatcc tgcaggcctg gagtcagggg	500	
50	ctgtcaggcc agggcatcgt ggtctctgtc ctggacgtg gcatcgagaa	550	
	ggaccacccg gacctctggg ccaactacga cccctggcc agctatgact	600	
	tcaatgacta cgacccggac ccccagcccc gctacacccc cagcaaagag	650	
55	aaccggcacg ggacccgctg tgctggggag gtggccgcga tggccaacaa	700	
	tggcttctgt ggtgtgggg tcgtttcaa cgccccaaatc ggaggcgtac	750	
	gatgtctgga cggtaccatc accgatgtca tcgaggccca gtcgtgagc	800	
60	ctgcagccgc agcacatcca catttacagc gccagctggg gtcccgagga	850	
	cgacggccgc acggtggacg gccccggcat cctcaccgc gaggccttcc	900	
65	ggcgtggtgtt gaccaagggc cgccggggc tggcacaacgt cttcatctgg	950	

ES 2 332 916 T3

gcctcgggca acggcggcct gcactacgac aactgcaact gcgacggcta 1000
caccaacagc atccacacgc tttccgtggg cagcaccacc cagcagggcc 1050
5 gcgtgccctg gtacagcga aacctgcgcct ccaccctcac caccacctac 1100
agcagcggcg tggccaccga cccccagatc gtcaccacgg acctgcatca 1150
cggtgtcaca gaccagcaca cgggcacctc ggctcagcc ccactggcgg 1200
10 ccggcatgat cgccctagcg ctggaggcca acccgttccct gacgtggaga 1250
gacatgcagc acctgggtgtt ccgcgcgtcc aagccggcgc acctgcaggc 1300
15 cgaggactgg aggaccaacg gcgtggggcg ccaagtgagc catcaactacg 1350
gatacgggct gctggacgcc gggctgctgg tggacaccgc ccgcacctgg 1400
ctgcccaccc agccgcagag gaagtgcgc gtcggggtcc agagccgccc 1450
20 caccccccattc ctgcccgtga tctacatcag gaaaaacgta tcggcctgcg 1500
ccggcctcca caactccatc cgctcgctgg agcacgtgca ggccgcagctg 1550
acgctgtcct acagccggcg cggagacctg gagatctcgc tcaccagccc 1600
25 catgggcacg cgctccacac tcgtggccat acgacccttg gacgtcagca 1650
ctgaaggcta caacaactgg gtcttcatgt ccaccactt ctggatgag 1700
aaccacagg gcgtgtggac cctggccta gagaacaagg gctactattt 1750
30 caacacgggg acgttgtacc gctacacgct gctgctctat gggacggccg 1800
aggacatgac agcgcggcct acagggcccc aggtgaccag cagcgcgtgt 1850
gtgcagcggg acacagaggg gctgtgccag gcgtgtgacg gccccgccta 1900
catcctggga cagctctgcc tggcctactg ccccccgcgg ttcttcaacc 1950
40 acacaaggct ggtgaccgct gggctgggc acacggcggc gcccgcgtg 2000
agggtctgct ccagctgcca tgcctcctgc tacacctgcc gggcggctc 2050
cccgaggac tgcacccctt gtccccatc ctccacgcgtg gaccagcagc 2100
45 agggctctg catggacccc accacccccc acagccgccc ccggcttaga 2150
gctggccct gtccccacca ccgctgccc gcctcgccca tggtgctgag 2200
cctcctggcc gtgaccctcg gaggccccgt cctctgcggc atgtccatgg 2250
50 acctcccaact atacgcctgg ctctccgtg ccagggccac ccccacaaa 2300
ccccaggctt ggctgccagc tggAACCTGA agttgtcagc tcagaaagcg 2350
accttgcggcc cgcctgggtc cctgacagggc actgctgcca tgctgcctcc 2400
55 ccaggctggc cccagaggag cgagcaccag cacccgacgc ctggcctgcc 2450
agggatgggc cccgtggaac cccgaagcct ggcgggagag agagagagag 2500
aagtctcctc tgcattttgg gtttggcag gagttggctg gggggagagg 2550
60 ctggagcacc caaaaagcca gggaaagtg gagggagaga aacgtgacac 2600
tgtccgtctc gggcaccgcg tccaaacctca gagttgcaa ataaaggtt 2650
65 cttagaaggt gaa 2663

ES 2 332 916 T3

<210> 10
 <211> 755
 <212> PRT
 5 <213> *Homo Sapien*
 <400> 10

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

ES 2 332 916 T3

	Ser Ala Ser Trp Gly Pro Glu Asp Asp Gly Arg Thr Val Asp Gly		
	260	265	270
5	Pro Gly Ile Leu Thr Arg Glu Ala Phe Arg Arg Gly Val Thr Lys		
	275	280	285
	Gly Arg Gly Gly Leu Gly Thr Leu Phe Ile Trp Ala Ser Gly Asn		
	290	295	300
10	Gly Gly Leu His Tyr Asp Asn Cys Asn Cys Asp Gly Tyr Thr Asn		
	305	310	315
	Ser Ile His Thr Leu Ser Val Gly Ser Thr Thr Gln Gln Gly Arg		
	320	325	330
15	Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ala Ser Thr Leu Thr Thr Thr		
	335	340	345
20	Tyr Ser Ser Gly Val Ala Thr Asp Pro Gln Ile Val Thr Thr Asp		
	350	355	360
	Leu His His Gly Cys Thr Asp Gln His Thr Gly Thr Ser Ala Ser		
	365	370	375
25	Ala Pro Leu Ala Ala Gly Met Ile Ala Leu Ala Leu Glu Ala Asn		
	380	385	390
	Pro Phe Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Arg Ala		
	395	400	405
30	Ser Lys Pro Ala His Leu Gln Ala Glu Asp Trp Arg Thr Asn Gly		
	410	415	420
	Val Gly Arg Gln Val Ser His His Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp		
	425	430	435
35	Ala Gly Leu Leu Val Asp Thr Ala Arg Thr Trp Leu Pro Thr Gln		
	440	445	450
40	Pro Gln Arg Lys Cys Ala Val Arg Val Gln Ser Arg Pro Thr Pro		
	455	460	465
	Ile Leu Pro Leu Ile Tyr Ile Arg Glu Asn Val Ser Ala Cys Ala		
	470	475	480
45	Gly Leu His Asn Ser Ile Arg Ser Leu Glu His Val Gln Ala Gln		
	485	490	495
	Leu Thr Leu Ser Tyr Ser Arg Arg Gly Asp Leu Glu Ile Ser Leu		
	500	505	510
50	Thr Ser Pro Met Gly Thr Arg Ser Thr Leu Val Ala Ile Arg Pro		
	515	520	525
	Leu Asp Val Ser Thr Glu Gly Tyr Asn Asn Trp Val Phe Met Ser		
	530	535	540
55	Thr His Phe Trp Asp Glu Asn Pro Gln Gly Val Trp Thr Leu Gly		
	545	550	555
60	Leu Glu Asn Lys Gly Tyr Tyr Phe Asn Thr Gly Thr Leu Tyr Arg		
	560	565	570

ES 2 332 916 T3

	Tyr Thr Leu Leu Leu Tyr Gly Thr Ala Glu Asp Met Thr Ala Arg		
	575	580	585
5	Pro Thr Gly Pro Gln Val Thr Ser Ser Ala Cys Val Gln Arg Asp		
	590	595	600
	Thr Glu Gly Leu Cys Gln Ala Cys Asp Gly Pro Ala Tyr Ile Leu		
	605	610	615
10	Gly Gln Leu Cys Leu Ala Tyr Cys Pro Pro Arg Phe Phe Asn His		
	620	625	630
	Thr Arg Leu Val Thr Ala Gly Pro Gly His Thr Ala Ala Pro Ala		
	635	640	645
15	Leu Arg Val Cys Ser Ser Cys His Ala Ser Cys Tyr Thr Cys Arg		
	650	655	660
	Gly Gly Ser Pro Arg Asp Cys Thr Ser Cys Pro Pro Ser Ser Thr		
	665	670	675
20	Leu Asp Gln Gln Gly Ser Cys Met Gly Pro Thr Thr Pro Asp		
	680	685	690
	Ser Arg Pro Arg Leu Arg Ala Ala Ala Cys Pro His His Arg Cys		
25	695	700	705
	Pro Ala Ser Ala Met Val Leu Ser Leu Leu Ala Val Thr Leu Gly		
	710	715	720
30	Gly Pro Val Leu Cys Gly Met Ser Met Asp Leu Pro Leu Tyr Ala		
	725	730	735
	Trp Leu Ser Arg Ala Arg Ala Thr Pro Thr Lys Pro Gln Val Trp		
	740	745	750
35	Leu Pro Ala Gly Thr		
	755		

40 <210> 11
<211> 1161
<212> ADN
<213> *Homo Sapien*

45 <220>
<221> no seguro
<222> 1149
50 <223> base desconocida

<400> 11

55	gccccgggcgg ctgcccttgg gtgtccctt ccctgcccga cacccagacc 50
	gaccttgacc gcccacctgg caggagcagg acaggacggc cggacgcggc 100
	catggccgag ctccccgggc ctttcctctg cggggccctg ctaggcttcc 150
60	tgtgcctgag tgggctggcc gtggaggtga aggtacccac agagccgctg 200
	agcacgcccc tggggaaagac agccgagctg acctgcacct acagcacgtc 250
	ggtgggagac agcttcgccc tggagtggag ctttgtcag cctggaaac 300
65	ccatctctga gtcccatcca atcctgtact tcaccaatgg ccatctgtat 350

ES 2 332 916 T3

5 ccaactggtt ctaagtcaaa gcgggtcagc ctgcttcaga acccccccac 400
agtgggggtg gccacactga aactgactga cgtccacccc tcagatactg 450
gaacctacct ctgccaagtc aacaaccac cagatttcta caccaatggg 500
ttggggctaa tcaaccttac tgtgctggtt ccccccagta atcccttatg 550
cagtcagagt ggacaaacct ctgtggagg ctctactgca ctgagatgca 600
gctcttccga gggggctcct aagccagtgt acaactgggt gcgtcttgg 650
acttttcccttta caccttctcc tggcagcatg gttcaagatg aggtgtctgg 700
ccagctcatt ctcaccaacc tctccctgac ctcctcgggc acctaccgct 750
gtgtggccac caaccagatg ggcagtgcac cctgtgagct gaccctctct 800
gtgaccgaac cctcccaagg ccgagtgcc ggagctctga ttggggtgct 850
cctgggcgtg ctgttgctgt cagttgctgc gttctgcctg gtcaggttcc 900
agaaaagagag ggggaagaag cccaaggaga catatgggg tagtgacctt 950
25 cgggaggatg ccatcgctcc tggtatctct gagcacactt gtatgaggc 1000
tgattcttagc aagggttcc tggaaagacc ctcgtctgcc agcaccgtga 1050
cgaccaccaa gtccaaagctc cctatggtcg tgtgacttct cccgatccct 1100
gagggcggtg aggggaaata tcaataatta aagtctgtgg gtacccttna 1150
aaaaaaaaaa a 1161

35 <210> 12
<211> 327
<212> PRT
40 <213> *Homo Sapien*

<400> 12

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

ES 2 332 916 T3

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

45 <210> 13

<211> 2015

<212> ADN

<213> *Homo Sapien*

50 <400> 13

	ggaaaaggta cccgcgagag acagccagca gttctgtgga gcagcgtgg 50
	ccggcttagga tgggctgtct ctggggtctg gctctgcccc ttttcttctt 100
55	ctgctggag gttggggctct ctgggagctc tgcaggcccc agcacccgca 150
	gagcagacac tgcgatgaca acggacgaca cagaagtgcc cgctatgact 200
60	ctagcaccgg gccacgccc tctggaaact caaacgctga gcgctgagac 250
	ctcttctagg gcctaacc cagccggccc cattccagaa gcagagacca 300
	ggggagccaa gagaatttcc cctgcaagag agaccaggag tttcacaaaa 350
65	acatctccca acttcatggt gctgatcgcc acctccgtgg agacatcagc 400

ES 2 332 916 T3

5 cgccagtgcc agccccgagg gagctggaaat gaccacagt cagaccatca 450
caggcagtga tcccggagaa gccatcttg acacccttg caccgatgac 500
agctctgaag aggcaaagac actcacaatg gacatattga cattggctca 550
cacctccaca gaagctaagg gcctgtcctc agagagcagt gcctcttccg 600
10 acggcccca tccagtcac accccgtcac gggcctcaga gagcagcgcc 650
tcttccgacg gccccatcc agtcatcacc ccgtcacggg cctcagagag 700
cagcgccctc tccgacggcc cccatccagt catcaccccg tcatggtccc 750
15 cgggatctga tgtcaactctc ctgcgtgaag ccctgggtac tgtcacaac 800
atcgaggtta ttaattgcag catcacagaa atagaaacaa caacttccag 850
catccctggg gcctcagaca tagatctcat ccccacggaa ggggtgaagg 900
20 cctcgccac ctccgatcca ccagctctgc ctgactccac tgaagcaaaa 950
ccacacatca ctgaggtcac agcctctgcc gagaccctgt ccacagccgg 1000
caccacagag tcagctgcac ctcatgccac gggtgggacc ccactcccc 1050
25 ctaacagcgc cacagaaaga gaagtgcacag cacccggggc cacgaccctc 1100
agtggagctc tggcacagt tagcaggaat cccctggaaag aaacctcagc 1150
30 cctctctgtt gagacaccaa gttacgtcaa agtctcagga gcagctccgg 1200
tctccataga ggctgggtca gcagtgccca aaacaacttc ctgtgggg 1250
agctctgtt cctcctacag cccctcgaa gccgcctca agaacttcac 1300
35 cccttcagag acaccgacca tggacatcgc aaccaagggg ccctccccca 1350
ccagcaggga ccctttccct tctgtccctc cgactacaac caacagcagc 1400
40 cgagggacga acagcacctt agccaagatc acaacctcag cgaagaccac 1450
gatgaagccc caacagccac gcccacgact gccggacga ggccgaccac 1500
agacgtgagt gcaggtgaaa atggaggttt cctcctcctg cggctgagtg 1550
45 tggcttcccc ggaagacctc actgacccca gagtggcaga aaggctgatg 1600
cagcagctcc accgggaact ccacgcccac gcgcctcaact tccaggctc 1650
50 cttaactgcgt gtcaggagag gctaacggac atcagctgca gccaggcatg 1700
tcccgtatgc caaaagaggg tgctgcccct agcctggggc cccaccgaca 1750
gactgcagct gcgttactgt gctgagaggt acccagaagg ttcccatgaa 1800
55 gggcagcatg tccaagcccc taacccaga tgtggcaaca ggaccctcgc 1850
tcacatccac cggagtgtat gtatggggag gggcttcacc tggtccca 1900
ggtgtccctt gactcacctt ggcacatgtt ctgtgtttca gtaaaagagag 1950
60 acctgatcac ccatctgtgt gcttccatcc tgcataaaa ttcactcagt 2000
gtggcccaaa aaaaa 2015

<210> 14

65 <211> 482

<212> PRT

<213> *Homo Sapien*

ES 2 332 916 T3

<400> 14

	Met Gly Cys Leu Trp Gly Leu Ala Leu Pro Leu Phe Phe Phe Cys	
5	1 5 10 15	
	Trp Glu Val Gly Val Ser Gly Ser Ser Ala Gly Pro Ser Thr Arg	
	20 25 30	
10	Arg Ala Asp Thr Ala Met Thr Thr Asp Asp Thr Glu Val Pro Ala	
	35 40 45	
	Met Thr Leu Ala Pro Gly His Ala Ala Leu Glu Thr Gln Thr Leu	
	50 55 60	
15	Ser Ala Glu Thr Ser Ser Arg Ala Ser Thr Pro Ala Gly Pro Ile	
	65 70 75	
20	Pro Glu Ala Glu Thr Arg Gly Ala Lys Arg Ile Ser Pro Ala Arg	
	80 85 90	
	Glu Thr Arg Ser Phe Thr Lys Thr Ser Pro Asn Phe Met Val Leu	
	95 100 105	
25	Ile Ala Thr Ser Val Glu Thr Ser Ala Ala Ser Gly Ser Pro Glu	
	110 115 120	
	Gly Ala Gly Met Thr Thr Val Gln Thr Ile Thr Gly Ser Asp Pro	
30	125 130 135	
	Glu Glu Ala Ile Phe Asp Thr Leu Cys Thr Asp Asp Ser Ser Glu	
	140 145 150	
35	Glu Ala Lys Thr Leu Thr Met Asp Ile Leu Thr Leu Ala His Thr	
	155 160 165	
	Ser Thr Glu Ala Lys Gly Leu Ser Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser	
40	170 175 180	
	Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro Ser Arg Ala Ser Glu Ser	
	185 190 195	
45	Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile Thr Pro Ser Arg	
	200 205 210	
	Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ser Ser Asp Gly Pro His Pro Val Ile	
50	215 220 225	
	Thr Pro Ser Trp Ser Pro Gly Ser Asp Val Thr Leu Leu Ala Glu	
	230 235 240	
55	Ala Leu Val Thr Val Thr Asn Ile Glu Val Ile Asn Cys Ser Ile	
	245 250 255	
	Thr Glu Ile Glu Thr Thr Ser Ser Ile Pro Gly Ala Ser Asp	
	260 265 270	
60	Ile Asp Leu Ile Pro Thr Glu Gly Val Lys Ala Ser Ser Thr Ser	

ES 2 332 916 T3

	275	280	285
	Asp Pro Pro Ala Leu Pro Asp Ser Thr Glu Ala Lys Pro His Ile		
	290	295	300
5	Thr Glu Val Thr Ala Ser Ala Glu Thr Leu Ser Thr Ala Gly Thr		
	305	310	315
10	Thr Glu Ser Ala Ala Pro His Ala Thr Val Gly Thr Pro Leu Pro		
	320	325	330
	Thr Asn Ser Ala Thr Glu Arg Glu Val Thr Ala Pro Gly Ala Thr		
	335	340	345
15	Thr Leu Ser Gly Ala Leu Val Thr Val Ser Arg Asn Pro Leu Glu		
	350	355	360
	Glu Thr Ser Ala Leu Ser Val Glu Thr Pro Ser Tyr Val Lys Val		
	365	370	375
20	Ser Gly Ala Ala Pro Val Ser Ile Glu Ala Gly Ser Ala Val Gly		
	380	385	390
25	Lys Thr Thr Ser Phe Ala Gly Ser Ser Ala Ser Ser Tyr Ser Pro		
	395	400	405
	Ser Glu Ala Ala Leu Lys Asn Phe Thr Pro Ser Glu Thr Pro Thr		
	410	415	420
30	Met Asp Ile Ala Thr Lys Gly Pro Phe Pro Thr Ser Arg Asp Pro		
	425	430	435
	Leu Pro Ser Val Pro Pro Thr Thr Thr Asn Ser Ser Arg Gly Thr		
	440	445	450
35	Asn Ser Thr Leu Ala Lys Ile Thr Thr Ser Ala Lys Thr Thr Met		
	455	460	465
40	Lys Pro Gln Gln Pro Arg Pro Arg Leu Pro Gly Arg Gly Arg Pro		
	470	475	480
	Gln Thr		
	<210> 15		
45	<211> 332		
	<212> ADN		
	<213> <i>Homo Sapien</i>		
50	<400> 15		
	atgaggaagc tccagggcag gatggttac ctgcctggac agcaagatga 50		
	tggctacact agccccatt ctctggcgcc ctggatttgc ccaccagatc 100		
55	tcctcacctc ttgcccttca cctcctgctg tacctacaag gtctccccga 150		
	ttctcatctg cccataatca tggacacagc cccaggatgt gcaggactct 200		
	cagggaccat ctggagttcc agctgaaatc tgggcctggt ggagtggag 250		
60	tggggcaggg gcctgcattt ggctgactta gagagcacag ttattccatc 300		
	catatgaaa taaacatttt ggattcctga tc 332		
	<210> 16		
65	<211> 88		
	<212> PRT		
	<213> <i>Homo Sapien</i>		

ES 2 332 916 T3

<400> 16

Met Met Ala Thr Leu Ala Pro Ile Leu Trp Ala Pro Gly Phe Ala
1 5 10 15

5 His Gln Ile Ser Ser Pro Leu Ala Leu His Leu Leu Leu Tyr Leu
20 25 30

10 Gln Gly Leu Pro Asp Ser His Leu Pro Ile Ile Met Asp Thr Ala
35 40 45

15 Pro Gly Cys Ala Gly Leu Ser Gly Thr Ile Trp Ser Ser Ser Trp
50 55 60

Asn Leu Gly Leu Val Glu Trp Glu Trp Gly Arg Gly Leu His Trp
65 70 75

20 Ala Asp Leu Glu Ser Thr Val Ile Pro Ser Ile Trp Lys
80 85

<210> 17

<211> 1302

25 <212> ADN

<213> *Homo Sapien*

<220>

30 <221> no seguro

<222> 1218-1253

<223> base desconocida

35 <400> 17

tttgcagtgg ggtccttcctc tggcctccctg ccccttcctgc tgctgctgct 50
40 gcttcattt ctggcagccc aggggtggggg tggcctgcag gcagcgctgc 100
tggcccttga ggtggggctg gtgggtctgg gggccttcata cctgctccctt 150
tgtacagccc tgcacactgcc ctccagttt ttcctactcc tggcccagg 200
45 taccgcactg gggccgtcc tgggcctgag ctggcgccga ggcctcatgg 250
gtgttcccct gggccttggaa gctgcctggc tcttagcttg gccaggccta 300
50 gctctacctc tggtggttat ggcagcgggg ggcagatggg tgcggcagca 350
gggccccccgg gtgcgccggg gcatatctcg actctggttt cgggttctgc 400
55 tgcgcctgtc acccatggcc ttccgggccc tgcaggctg tggggctgt 450
ggggaccggg gtctgtttgc actgtacccc aaaaccaaca aggatggctt 500
ccgcagccgc ctgcccgtcc ctggggcccg gcggcgtaat ccccgcacca 550
60 cccaacacccc attagctctg ttggcaaggg tctgggtcct gtgcaagggc 600
tggaaactggc gtctggcactg ggccagccag ggtagcat cccacttgcc 650
65 cccgtgggcc atccacacac tggccagctg gggcctgctt cggggtaac 700

ES 2 332 916 T3

<210> 18

<211> 197

30 <212> PRT

<213> *Homo Sapien*

<400> 18

35

Met Gly Val Pro Leu Gly Leu Gly Ala Ala Trp Leu Leu Ala Trp
1 5 10 15

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

Trp Val Arg Gln Gln Gly Pro Arg Val Arg Arg Gly Ile Ser Arg
35 40 45

45

Leu Trp Leu Arg Val Leu Leu Arg Leu Ser Pro Met Ala Phe Arg
50 55 60

Ala Leu Gln Gly Cys Gly Ala Val Gly Asp Arg Gly Leu Phe Ala
 65 70 75
 Leu Tyr Pro Lys Thr Asn Lys Asp Gly Phe Arg Ser Arg Leu Pro

Val Pro Gly Pro Arg Arg Arg Asn Pro Arg Thr Thr Gln His Pro

55

Leu Ala Leu Leu Ala Arg Val Trp Val Leu Cys Lys Gly Trp Asn

Trp Arg Leu Ala Arg Ala Ser Gln Gly Leu Ala Ser His Leu Pro

Pro Trp Ala Ile His Thr Leu Ala Ser Trp Gly Leu Leu Arg Gly

65

Glenn Bros. Theatres, Inc., 201-203 South Second Street, Indianapolis, Indiana.

ES 2 332 916 T3

155 160 165
Gln Leu Gly Pro Pro Ala Ser Arg Gln Pro Leu Pro Gly Thr Leu
170 175 180
5 Ala Gly Arg Arg Ser Arg Thr Arg Gln Ser Arg Ala Leu Pro Pro
185 190 195
10 Trp Arg

<210> 19
<211> 2329
15 <212> ADN
<213> *Homo Sapien*

<400> 19

20 atccctcgac ctcgacccac gcgtccgctg gaaggtggcg tgccctcctc 50
 tggctggta catgcagctc ccactggccc ttgttctcgat ctgcctgctg 100
25 gtacacacag cttccgtgt agtggaggc caggggtggc aggcgttcaa 150
 gaatgatgcc acggaaatca tccccgagct cggagagtag cccgagcctc 200
 caccggagct ggagaacaac aagaccatga accgggcgga gaacggaggg 250
30 cggcctcccc accacccctt tgagacaaa gacgtgtccg agtacagctg 300
 cccgcagctg cacttcaccc gctacgtgac cgatgggccc tgccgcagcg 350
35 ccaagccggt caccgagctg gtgtgtccg gccagtgcgg cccggcgcgc 400
 ctgctgccc acgccatcg ggccggcaag tggtgccgac ctatgggcc 450
 cgacttccgc tgcattcccc accgctaccg cgccgcagcgc gtgcagctgc 500
40 tgtgtcccg tggtgaggcg cccgcgcgc gcaaggtgcg cctggtgcc 550
 tcgtgcaagt gcaagcgcct cacccgcttc cacaaccagt cggagctcaa 600
45 ggacttccgg accgaggccg ctcggccgca gaagggccgg aagccgcgc 650
 cccgcgcgcg gagcgcacaaa gccaaccagg ccgagctgga gaacgcctac 700
50 tagagccgc cccgcgcgc ccccacccgc gggcgcgcgc gccctgaacc 750
 cgcgcgcgc atttctgtcc tctgcgcgtg gtttgattgt ttatattca 800
 ttgtaaatgc ctgcaaccca gggcaggggg ctgagacatt ccaggccctg 850
55 aggaatcccg ggcgcggca aggccccct cagccgcac gctgaggggt 900
 cccacggggc aggggaggga attgagagtc acagacactg agccacgcag 950
 cccgcctct gggccgcct acctttgctg gtcccacttc agaggaggca 1000
60 gaaatggaag catttcacc gccctgggt ttaaggag cgggtgtggca 1050
 gtggaaagt ccagggactg gttaaagaaag ttggataaga ttccccctg 1100
65 cacctcgctg cccatcagaa agcctgaggc gtgcccagag cacaagactg 1150

ES 2 332 916 T3

ggggcaactg tagatgtggc ttcttagtcct ggctctgcc a ctaacttcct 1200
5 gtgtaacctt gaactacaca attctccttc gggacacctaa tttccacttt 1250
gtaaaatgag ggtggagggtg ggaataggat ctcgaggaga ctattggcat 1300
10 atgattccaa ggactccagt gcctttgaa tggcagagg tgagagagag 1350
agagagaaag agagagaatg aatgcagttg cattgattca gtgccaagg 1400
cacttccaga attcagagtt gtgatgctct cttctgacag ccaaagatga 1450
15 aaaacaaaca gaaaaaaaaa agtaaagagt ctatttatgg ctgacatatt 1500
tacggctgac aaactcctgg aagaagctat gctgcttccc agcctggctt 1550
20 ccccgatgt ttggctacct ccaccctcc atctcaaaga aataacatca 1600
tccattgggg tagaaaaagga gagggtccga gggtggtggg agggatagaa 1650
atcacatccg ccccaacttc ccaaagagca gcatccctcc cccgacccat 1700
25 agccatgttt taaagtcacc ttccgaagag aagtgaaagg ttcaaggaca 1750
ctggccttgc aggccccagg gagcagccat cacaaactca cagaccagca 1800
30 catccctttt gagacaccgc cttctgccc caactcacgg acacatttct 1850
gcctagaaaa cagcttctta ctgctttac atgtgatggc atatcttaca 1900
35 ctaaaagaat attattgggg gaaaaactac aagtgctgta catatgctga 1950
gaaactgcag agcataatag ctgccaccca aaaatcttt tgaaaatcat 2000
40 ttccagacaa cctcttactt tctgtgttgt ttttaattgt taaaaaaaaa 2050
aagttttaaa cagaagcaca tgacatatga aagcctgcag gactggcgt 2100
tttttggca attcttccac gtgggacttg tccacaagaa tgaaagttagt 2150
45 gttttttaaa gagtaagtt acatattat tttctcactt aagttattta 2200
tgcaaaagtt tttctttagt agaatgacaa tgttaatatt gctttatgaa 2250
50 ttaacagtct gttcttccag agtccagaga cattgttaat aaagacaatg 2300
aatcatgaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2329

<210> 20

55 <211> 213

<212> PRT

<213> *Homo Sapien*

60

65

ES 2 332 916 T3

<400> 20

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

<210> 21

55 <211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

60 <220>

<223> Sonda de oligonucléótidos sintética

<400> 21

65

cagcgaaccg ggtgccgggt c 21

ES 2 332 916 T3

<210> 22
<211> 22
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética
<400> 22

gagcgacgag cgcgcagcga ac 22

15 <210> 23
<211> 43
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética
<400> 23

atactgcgat cgctaaacca ccatgcgccc ccgcctgtgg ctg 43

30 <210> 24
<211> 21
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
40 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética
<400> 24

gccggccctct cagggcctca g 21

45 <210> 25
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50

<220>
55 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética
<400> 25

cccacgtgta cagagcggat ctc 23

60 <210> 26
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

ES 2 332 916 T3

<400> 26
gagaccagga cgggcaggaa gtg 23

5 <210> 27
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

15 <400> 27
caggcacctt ggggagccgc c 21

20 <210> 28
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<221> Secuencia artificial
<222> completa
30 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 28
cccacgtgta cagagcgat ctc 23

35 <210> 29
<211> 23
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 29
gagaccagga cgggcaggaa gtg 23

50 <210> 30
<211> 44
55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 30
ctctacgggt actgcagggt ccgggagcgc atcgaagaga acgg 44

65 <210> 31
<211> 21

ES 2 332 916 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

 <400> 31

10 atgcagctcc cactggccct g 21

 <210> 32
15 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

 <400> 32

25 ctagtaggcg ttctccagct cggcctg 27

 <210> 33
30 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

 <400> 33

40 ctcccgctgc atccccgacc gctaccgcgc gcagcgcgtg 40

 <210> 34
45 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

55 <400> 34

 gcgtcggtgg catcaaag 18

60 <210> 35
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

ES 2 332 916 T3

<400> 35
tgca~~gtccac~~ ggtgttagag 19

5 <210> 36
<211> 22
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

15 <400> 36
cttctacgtg gccatgaacc gc 22

20 <210> 37
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

30 <400> 37
cctggagatc cgctctgta 19

35 <210> 38
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

45 <400> 38
ctttgatgac cacgacgccc a 21

<210> 39

50 <211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 39

60 acgtaga~~aggc~~ ctgaggacac t 21

<210> 40
<211> 19
65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 332 916 T3

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

5 <400> 40
gatgctccag ctgaaatcc 19
<210> 41

10 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 41

20 cacatggctg gaaatgatg 19
<210> 42

25 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 42

35 aagctaagct cccaaactgac agcca 25
<210> 43
<211> 21

40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 43

50 tggcctacat gtgtcttcat c 21
<210> 44
<211> 24

55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
60 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 44
cacaactttc tggtcattt ccat 24
<210> 45
<211> 21

ES 2 332 916 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 45
10 cctgccccaa gacggcatta g 21

<210> 46
<211> 18

15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 46
25 cctgggcacc agatcttc 18

<210> 47
<211> 18

30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 47
40 agggcagttg aggcaatt 18

<210> 48
<211> 23

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 48
55 catcagggcc ggagtaaatc cct 23

<210> 49
<211> 21

<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 49
tccatggacc tcccaactata c 21

ES 2 332 916 T3

<210> 50
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética
10
<400> 50
gctgacaact tcaggttcca 20

15 <210> 51
<211> 20
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética
25
<400> 51
accccccacca aaccccagg 20

30 <210> 52
<211> 24
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética
40 <400> 52
gatctctgag cacacttgta tgag 24

45 <210> 53
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética
55 <400> 53
ggcagacgag ggtctttc 18

<210> 54
60 <211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

ES 2 332 916 T3

<400> 54
caggaacccc ttgctagaat cagcc 25

5 <210> 55
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

15 <400> 55
cccagaaggt tccccatga 18

<210> 56
20 <211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

30 <400> 56
gggtcctgtt gccacatc 18

<210> 57
35 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 57

45 cagcatgtcc aagccctaa ccc 23

<210> 58
50 <211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 58

60 tctcccgat tctcatctg 19

<210> 59
<211> 19

65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 332 916 T3

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

5 <400> 59
ccctgagagt cctgcacat 19
<210> 60

10 <211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 60

20 cccataatca tggacacagc ccc 23
<210> 61
<211> 24

25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 61

30 <210> 62
<211> 19

35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 62

40 cctggggtaa gtgagcaaa 19
<210> 63
<211> 26

45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 63

50 cctctctttt cacccacctt cctcag 26
<210> 64
<211> 23

55 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 64

60 ccttcgtttt cttttttttt cttttttttt 27
<210> 65
<211> 24

65 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 332 916 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 64

10 gggactgggtt aagaaagttg gat 23

<210> 65
<211> 18

15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 65

25 cgccctcaggc tttctgat 18

<210> 66
<211> 21

30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> Sonda de oligonucléotidos sintética

<400> 66

40 agattcccccc ttgcacacctcg c 21

45

50

55

60

65