



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 317 664**

⑤1 Int. Cl.:

**C12N 15/16** (2006.01)

**C07K 14/63** (2006.01)

**A61K 38/22** (2006.01)

**C07K 16/26** (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **98911928 .4**

⑨6 Fecha de presentación : **23.03.1998**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **0975760**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **02.02.2000**

⑤4 Título: **Homólogos de motilina.**

③0 Prioridad: **24.03.1997 US 822897**  
**24.03.1997 US 411020 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.04.2009**

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.04.2009**

⑦3 Titular/es: **ZymoGenetics, Inc.**  
**1201 Eastlake Avenue East**  
**Seattle, Washington 98102, US**

⑦2 Inventor/es: **Sheppard, Paul, O. y**  
**Deisher, Theresa A.**

⑦4 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

## DESCRIPCIÓN

Homólogos de motilina.

## 5 Antecedentes de la invención

Muchos de los péptidos reguladores que son importantes en el mantenimiento de la homeostasis nutricional se encuentran en el entorno gastrointestinal. Estos péptidos pueden ser sintetizados en el sistema digestivo y actuar localmente, pero también pueden ser identificados en el cerebro. Además, también se encuentra lo inverso, es decir, los péptidos se sintetizan en el cerebro pero se halla que regulan células en el tracto gastrointestinal. Este fenómeno ha sido denominado “eje del cerebro-intestino” y es importante para dar la señal de saciedad, regular la temperatura corporal, y otros procesos fisiológicos que requieren una retroalimentación entre el cerebro y el intestino.

Las hormonas peptídicas del intestino incluyen gastrina, colecistoquinina (CCK; del inglés, cholecystokinin), secretina, péptido inhibitorio gástrico (GIP; del inglés, gastric inhibitory peptide), polipéptido intestinal vasoactivo (VIP; del inglés, vasoactive intestinal polypeptide), motilina, somatostatina, péptido pancreático (PP), sustancia P y neuropeptido Y (NPY), y utilizan diversos mecanismos de acción diferentes. Por ejemplo, la gastrina, la motilina y la CCK actúan como hormonas de tipos endocrino y neurocrino. Se cree que otras, tales como la gastrina y el GIP, actúan exclusivamente de un modo endocrino. Otros modos de acción incluyen una combinación de acciones endocrinas, neurocrinas y paracrinas (somatostatina), una acción exclusivamente neurocrina (NPY), y una combinación de acciones neurocrinas y paracrinas (VIP y Sustancia P). La mayoría de las acciones de las hormonas intestinales son mediadas por receptores unidos a membrana y activan sistemas de segundo mensajero. Para una revisión de los péptidos intestinales, véase Mulvihill *et al.* en *Basic and Clinical Endocrinology*, páginas 551-570, 4ª edición, compilado por F. S. Greenspan y J. D. Baxter, Appleton y Lange, Norwalk, Connecticut, EE.UU., 1994.

Muchos de estos péptidos intestinales son sintetizados como moléculas precursoras inactivas que requieren múltiples escisiones peptídicas para resultar activadas. La familia conocida como familia de “glucagón-secretina”, que incluye VIP, gastrina, secretina, motilina, glucagón y galanina, ejemplifica péptidos regulados por múltiples escisiones y modificaciones posttraduccionales.

La motilina es un péptido de 22 aminoácidos hallado en el tejido intestinal de especies de mamífero (W. Domschke, *Digestive Diseases* 22 (5): 454-461, 1977). Se han identificado las secuencias de DNA y de aminoácidos de la premotilina porcina (Patente de EE.UU. n° 5.006.469). La motilina ha sido identificada como un factor capaz de aumentar la motilidad gástrica, afectando a la función secretora del estómago al estimular la secreción de pepsina (Brown *et al.*, *Canadian J. of Physiol. Pharmacol.* 49: 399-405, 1971), y una evidencia reciente sugiere un papel en la regulación mioeléctrica del estómago y el intestino delgado. Los aumentos cíclicos de motilina se han correlacionado con la fase III del complejo mioeléctrico interdigestivo y con la contracción del duodeno por el hambre (Chey *et al.* en *Gut Hormones*, compilado por S. R. Bloom, páginas 355-358, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1978; Lee *et al.*, *Am J. Digestive Diseases* 23: 789-795, 1978; e Itoh *et al.*, *Am J. Digestive Diseases* 23: 929-935, 1978). Se ha demostrado que la motilina y los compuestos análogos de motilina producen la contracción del músculo liso gastrointestinal pero no de otros tipos de células musculares lisas (Strunz *et al.*, *Gastroenterology* 68, 1485-1491, 1975).

La presente invención se dirige a una nueva proteína secretada con homología con respecto a la motilina, de la que se ha hallado que es transcrita en el sistema gastrointestinal. El descubrimiento de este nuevo péptido es importante para la elucidación ulterior de cómo el organismo mantiene su homeostasis nutricional y para el desarrollo de terapias que intervengan en esos procesos, así como para otros usos que resultarán evidentes a partir de las enseñanzas presentes.

La presente invención proporciona una molécula polipeptídica aislada que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del resto 24 al resto 37;

(b) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del resto 24 al resto 41;

(c) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del resto 24 al resto 117;

(d) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del resto 1 al resto 37; y

(e) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del resto 1 al resto 117;

polipéptido que es capaz de estimular la motilidad gástrica o la absorción de glucosa.

La presente invención también proporciona una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

## ES 2 317 664 T3

(a) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 70 al nucleótido 111;

(b) secuencias nucleotídicas degeneradas de (a);

(c) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 70 al nucleótido 120;

(d) secuencias nucleotídicas degeneradas de (c);

(e) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 70 al nucleótido 351;

(f) secuencias nucleotídicas degeneradas de (e);

(g) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 1 al nucleótido 111;

(h) secuencias nucleotídicas degeneradas de (g); y

(i) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 1 al nucleótido 351;

polinucleótido que codifica un polipéptido capaz de estimular la motilidad gástrica o la absorción de glucosa.

La presente invención proporciona además un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 2 o a un fragmento de dicho polipéptido, fragmento que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) del resto 24 al resto 117 de la ID. SEC. nº 2; y

(b) del resto 24 al resto 37 de la ID. SEC. nº 2.

La presente invención también proporciona un método para producir un anticuerpo, que comprende las operaciones siguientes: inocular en un animal un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 2, de los restos 24 a 117; y

(b) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 2, de los restos 24 a 37;

polipéptido que provoca una respuesta inmune en el animal para producir el anticuerpo, y aislar el anticuerpo del animal.

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un polipéptido purificado como el definido en la Reivindicación 1, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención proporciona además un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente unidos:

un promotor de transcripción;

un polinucleótido como el definido en la Reivindicación 3; y

un terminador de transcripción.

La presente invención también proporciona una célula en cultivo en la que se ha introducido un vector de expresión como el anteriormente definido, célula que expresa el polipéptido codificado por el polinucleótido.

Más aún, la presente invención proporciona el uso de un polipéptido como el definido en la Reivindicación 1, polipéptido que consiste en los restos 24 a 37 de la ID. SEC. nº 2, para la fabricación de un medicamento para estimular la motilidad gástrica, polipéptido que, en uso, aumenta el tiempo de tránsito o el vaciamiento gástrico de una sustancia ingerida.

La presente invención proporciona así un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos mostrada en la ID. SEC. nº 2, del resto 24 al resto 37.

En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula polinucleotídica aislada como la definida en las reivindicaciones, que codifica un polipéptido, seleccionada del grupo que consiste en: (a) moléculas polinucleotídicas que consisten en una secuencia de nucleótidos como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido 70 al nucleótido 111; y (b) secuencias nucleotídicas degeneradas de (a).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido aislado como el definido en las reivindicaciones, seleccionado del grupo que consiste en: (a) moléculas polipeptídicas que consisten en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del resto 24 al resto 37.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión como el definido en las reivindicaciones, que comprende los siguientes elementos operativamente unidos: un promotor de transcripción; un segmento de DNA seleccionado del grupo que consiste en: (a) moléculas polinucleotídicas que consisten en una secuencia de nucleótidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 1, del nucleótido 70 al nucleótido 111, y (b) secuencias nucleotídicas degeneradas de (a); y un terminador de transcripción.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula en cultivo como la definida en las reivindicaciones, en la que se ha introducido un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente unidos: un promotor de transcripción; un segmento de DNA seleccionado del grupo que consiste en: (a) moléculas polinucleotídicas que consisten en una secuencia de nucleótidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 1, del nucleótido 70 al nucleótido 111, y (b) secuencias nucleotídicas degeneradas de (a); y un terminador de transcripción; célula que expresa el polipéptido codificado por el segmento de DNA.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un polipéptido purificado como el definido en las reivindicaciones, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. n° 2, del resto 24 al resto 117.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un polipéptido zsig33, que comprende: cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión como el definido en las reivindicaciones de modo que dicha célula exprese un polipéptido codificado por el segmento de DNA; y recuperar el polipéptido.

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso, como se define en las reivindicaciones, de un polipéptido que consiste en los restos 24-37 de la ID. SEC. n° 2, para la fabricación de un medicamento para estimular la motilidad gástrica, polipéptido que, en uso, aumenta el tiempo de tránsito o el vaciamiento gástrico de una sustancia ingerida.

### Descripción detallada de la invención

Antes de describir con detalle la presente invención, puede ser útil definir ciertos términos aquí utilizados.

El término “ortólogo” significa un polipéptido o proteína obtenida de una especie, que es el equivalente funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la evolución de las especies.

Los “parálogos” son proteínas distintas, aunque estructuralmente relacionadas, generadas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen a través de duplicaciones génicas. Por ejemplo, la  $\alpha$ -globina, la  $\beta$ -globina y la mioglobina son parálogas entre sí.

La expresión “variante alélica” significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutaciones y puede dar lugar a un polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silentes (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. La expresión “variante alélica” se usa también aquí para significar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

La frase “vector de expresión” significa una molécula de DNA, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés, operativamente unido a segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión proceden generalmente de DNA plasmídico o vírico, o pueden contener elementos de ambos.

El término “aislado”, cuando se aplica a una molécula polinucleotídica, significa que el polinucleótido ha sido extraído de su entorno genético natural y, por ello, carece de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para uso en sistemas para la producción de proteínas genéticamente construidas. Dichas moléculas aisladas son aquellas que son separadas de su ambiente natural e incluyen clones de cDNA y genómicos. Las moléculas de DNA aisladas de la presente invención carecen de otros genes con los que están normalmente asociadas, pero pueden incluir regiones 5' y 3' no traducidas presentes en la naturaleza, tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para quien tiene una experiencia normal en la técnica (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316: 774-78, 1985). Cuando se aplica a una proteína, el término “aislado” indica que la proteína se halla en un estado distinto del de su ambiente nativo, tal como separada de sangre y tejido animal. En una forma preferida, la proteína aislada carece sustancialmente de otras proteínas, particularmente de otras proteínas de origen animal. Se prefiere obtener la proteína en una forma muy purificada, es decir, con una pureza superior a 95%, más preferiblemente una pureza superior a 99%.

La expresión “operativamente unido”, cuando hace referencia a segmentos de DNA, significa que los segmentos están dispuestos de modo que actúan de acuerdo con sus fines previstos; por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa por todo el segmento de codificación hasta el terminador.

5 El término “polinucleótido” significa un polímero, de cadena sencilla o doble, de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen RNA y DNA, y pueden ser aislados de fuentes naturales, sintetizados *in vitro* o preparados a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas.

10 La expresión “complementos de moléculas polinucleotídicas” significa moléculas polinucleotídicas que tienen una secuencia de bases complementaria y una orientación inversa con respecto a una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de 5' CCCGTGCAT 3'.

15 La expresión “secuencia nucleotídica degenerada” significa una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula polinucleotídica de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, tanto el triplete GAU como el GAC codifican Asp).

20 El término “promotor” significa una porción de un gen que contiene secuencias de DNA que proporcionan la unión de la RNA polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras se hallan comúnmente, aunque no siempre, en las regiones no codificadoras 5' de los genes.

25 La expresión “secuencia señal secretora” significa una secuencia de DNA que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en la que es sintetizado. El polipéptido más grande es comúnmente escindido para que se separe el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

30 El término “receptor” significa una proteína asociada a la célula, que se une a una molécula bioactiva (es decir, un ligando) y media en el efecto del ligando sobre la célula. Los receptores unidos a membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios que comprende un dominio extracelular que se une al ligando y un dominio efector intracelular que está típicamente implicado en la transducción de señales. La unión del ligando al receptor da lugar a un cambio conformacional en el receptor, que causa una interacción entre el dominio efector y otra(s) molécula(s) en la célula. Esta interacción conduce a su vez a una alteración en el metabolismo de la célula. Los procesos metabólicos que están ligados a interacciones de receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos de la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos de inositol e hidrólisis de fosfolípidos. La mayoría de los receptores nucleares también presentan una estructura de múltiples dominios, incluyendo un dominio amino-terminal de transactivación, un dominio de unión a DNA y un dominio de unión al ligando. En general, los receptores pueden estar unidos a la membrana o ser citosólicos o nucleares; y pueden ser monómeros (por ejemplo, el receptor de la hormona estimuladora del tiroides y el receptor beta-adrenérgico) o multímeros (por ejemplo, el receptor de PDGF, el receptor de la hormona del crecimiento, el receptor de IL-3, el receptor de GM-CSF, el receptor de G-CSF, el receptor de eritropoyetina y el receptor de IL-6).

40 La expresión “pareja de complemento/anticomplemento” significa grupos no idénticos que forman una pareja estable y no covalentemente asociada bajo las condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de una pareja de complemento/anticomplemento. Otras parejas de complemento/anticomplemento ejemplares incluyen parejas de receptor/ligando, parejas de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), parejas de polinucleótidos sentido/antisentido, y similares. Cuando es deseable la subsiguiente disociación de la pareja de complemento/anticomplemento, la pareja de complemento/anticomplemento tiene preferiblemente una afinidad de unión  $< 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

50 La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de una nueva secuencia de DNA humana que codifica un nuevo polipéptido secretado que presenta homología con la motilina, del cual el compuesto homólogo más cercano es la motilina porcina (mostrada en las ID. SEC. números 3 y 4). La motilina es un miembro de una familia de polipéptidos que regulan la fisiología gastrointestinal. La familia de polipéptidos importantes en cuanto a la regulación gastrointestinal a la que pertenece la motilina incluye glucagón, gastrina, galanina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Estos polipéptidos son sintetizados en una forma precursora que requiere múltiples pasos de procesamiento hasta la forma activa. Cuando el procesamiento acarrea la separación de una secuencia señal seguida de la escisión de uno o más péptidos accesorios para que se libere el péptido activo, la motilina, el VIP y la galanina son particularmente relevantes para el polipéptido de la presente invención. El péptido activo resultante es generalmente pequeño (10-30 aminoácidos) y puede requerir otras modificaciones postraduccionales, tales como amidación, sulfatación o modificación de restos glutámicos con ácido pirrolidonacarboxílico.

60 Un análisis de la distribución tisular del mRNA que corresponde a este nuevo DNA mostró que la expresión era máxima en el estómago, seguida de unos niveles de expresión evidentes aunque disminuidos en el intestino delgado y el páncreas. La EST también está presente en bancos de cDNA de pulmón. El polipéptido ha sido denominado zsig33.

65 Los nuevos polinucleótidos y polipéptidos zsig33 de la presente invención fueron inicialmente identificados buscando secuencias que poseyeran una supuesta señal de secreción en una base de datos de ESTs. Se descubrió una secuencia de EST y se previó que estaba relacionada con la familia de la motilina. La secuencia de EST procedía de un banco pancreático fetal.

El nuevo polipéptido codificado por el cDNA de longitud completa tiene 117 aminoácidos. La prevista secuencia señal tiene 23 restos de aminoácido (los restos de aminoácido 1 a 23 de la ID. SEC. nº 2). Se previó que el péptido activo tendría 16 restos de aminoácido (los restos de aminoácido 24 a 41 de la ID. SEC. nº 2), con una escisión C-terminal detrás del resto de aminoácido 41 de la ID. SEC. nº 2 (Ser). Sin embargo, muchos de los péptidos del intestino-cerebro requieren múltiples escisiones. Por ejemplo, el péptido progastrina tiene 101 aminoácidos y es escindido por el extremo N para dar lugar a péptidos sucesivamente más pequeños (G34, G17 y G14) (Sugano *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260: 11.724-11.729, 1985). Otros péptidos que requieren múltiples pasos de procesamiento incluyen el glucagón, en el que la escisión C-terminal da lugar al péptido 1 similar al glucagón y el péptido 2 similar al glucagón, y la galanina, cuyo procesamiento acarrea la escisión de un péptido C-terminal conocido como GMAP. Por lo tanto, se sintetizó un péptido adicional basándose en una escisión detrás del aminoácido 37 de la ID. SEC. nº 2 (Gln), y resultó un péptido de 14 aminoácidos con actividad biológica [del resto de aminoácido 24 (Gly) al resto de aminoácido 37 (Gln) de la ID. SEC. nº 2].

El péptido C-terminal (aminoácidos 42 a 117 de la ID. SEC. nº 2) puede tener también cierta actividad especializada. El procesamiento del péptido activo para la motilina (mostrado en la ID. SEC. nº 4) da lugar a la liberación de un péptido C-terminal de 70 aminoácidos, del resto de aminoácido 50 (Ser) al resto de aminoácido 119 (Lys), conocido como péptido asociado a la motilina (MAP; del inglés, *motilin-associated peptide*). Adelman *et al.* (Patente de EE.UU. nº 5.006.469) han propuesto la hipótesis de que el MAP desempeña un papel en la regulación de la digestión, el apetito y la absorción de nutrientes.

Los aminoácidos muy conservados del polipéptido zsig33 pueden ser utilizados como una herramienta para identificar nuevos miembros de la familia. Por ejemplo, se puede utilizar la transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR; del inglés, *reverse transcription-polymerase chain reaction*) para multiplicar secuencias que codifican el motivo conservado a partir de RNA obtenido de una diversidad de fuentes tisulares. Utilizando secuencias de la presente invención, se han identificado dos de tales dominios conservados. El primer dominio se encuentra en los restos de aminoácido 31 a 36 de la ID. SEC. nº 2, donde el motivo identificado es Glu X Gln Arg X Gln, siendo X cualquier resto de aminoácido (mostrado en la ID. SEC. nº 5), y el segundo dominio se encuentra en los restos de aminoácido 78 a 84 de la ID. SEC. nº 2, donde el motivo identificado es Ala Pro X Asp X Gly Ile, siendo X cualquier resto de aminoácido (mostrado en la ID. SEC. nº 6). En particular, los cebadores muy degenerados diseñados a partir de estas secuencias son útiles para este fin.

Los expertos en la técnica reconocerán enseguida que, a la vista de la degeneración del código genético, es posible una considerable variación de secuencias entre estas moléculas polinucleotídicas que codifican la ID. SEC. nº 2, incluyendo todas las secuencias de RNA al sustituir T por U. De este modo, la presente invención contempla polinucleótidos que codifican el polipéptido zsig33 y sus equivalentes de RNA. En la Tabla 1 se exponen los códigos de una letra utilizados para representar posiciones nucleotídicas degeneradas. Las "resoluciones" son los nucleótidos representados mediante una letra del código. El "complemento" indica el código para el(los) nucleótido(s) complementario(s). Por ejemplo, el código Y significa C o T, y su complemento R significa A o G, siendo A complementario de T y siendo G complementario de C.

TABLA 1

|    | Nucleótido | Resolución | Nucleótido | Complemento |
|----|------------|------------|------------|-------------|
| 45 | A          | A          | T          | T           |
|    | C          | C          | G          | G           |
|    | G          | G          | C          | C           |
| 50 | T          | T          | A          | A           |
|    | R          | A/G        | Y          | C/T         |
|    | Y          | C/T        | R          | A/G         |
| 55 | M          | A/C        | K          | G/T         |
|    | K          | G/T        | M          | A/C         |
|    | S          | C/G        | S          | C/G         |
| 60 | W          | A/T        | W          | A/T         |
|    | H          | A/C/T      | D          | A/G/T       |
|    | B          | C/G/T      | V          | A/C/G       |
|    | V          | A/C/G      | B          | C/G/T       |
| 65 | D          | A/G/T      | H          | A/C/T       |
|    | N          | A/C/G/T    | N          | A/C/G/T     |

## ES 2 317 664 T3

En la Tabla 2 se exponen los codones degenerados que abarcan todos los posibles codones para un aminoácido dado.

TABLA 2

| Aminoácido | Código de una letra | Codones                 | Codón degenerado |
|------------|---------------------|-------------------------|------------------|
| Cys        | C                   | TGC TGT                 | TGY              |
| Ser        | S                   | AGC AGT TCA TCC TCG TCT | WSN              |
| Thr        | T                   | ACA ACC ACG ACT         | ACN              |
| Pro        | P                   | CCA CCC CCG CCT         | CCN              |
| Ala        | A                   | GCA GCC GCG GCT         | GCN              |
| Gly        | G                   | GGA GGC GGG GGT         | GGN              |
| Asn        | N                   | AAC AAT                 | AAY              |
| Asp        | D                   | GAC GAT                 | GAY              |
| Glu        | E                   | GAA GAG                 | GAR              |
| Gln        | Q                   | CAA CAG                 | CAR              |
| His        | H                   | CAC CAT                 | CAY              |
| Arg        | R                   | AGA AGG CGA CGC CGG CGT | MGN              |
| Lys        | K                   | AAA AAG                 | AAR              |
| Met        | M                   | ATG                     | ATG              |
| Ile        | I                   | ATA ATC ATT             | ATH              |
| Leu        | L                   | CTA CTC CTG CTT TTA TTG | YTN              |
| Val        | V                   | GTA GTC GTG GTT         | GTN              |
| Phe        | F                   | TTC TTT                 | TTY              |
| Tyr        | Y                   | TAC TAT                 | TAY              |
| Trp        | W                   | TGG                     | TGG              |
| Ter        | .                   | TAA TAG TGA             | TRR              |
| Asn Asp    | B                   |                         | RAY              |
| Glu Gln    | Z                   |                         | SAR              |
| Cualquiera | X                   |                         | NNN              |

Quien tiene una experiencia normal en la técnica apreciará que se introduce cierta ambigüedad a la hora de determinar un codón degenerado, representativo de todos los posibles codones que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, en ciertas circunstancias, el codón degenerado para serina (WSN) puede codificar arginina (AGR) y, en ciertas circunstancias, el codón degenerado para arginina (MGN) puede codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican fenilalanina y leucina. De esta manera, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, pero quien tiene una experiencia normal en la técnica puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. n° 2. Las secuencias variantes pueden ser fácilmente examinadas en cuanto a su funcionalidad, como aquí se describe.

En realizaciones preferidas de la invención, los polinucleótidos aislados se hibridarán con regiones de tamaño similar de la ID. SEC. nº 1, o con una secuencia complementaria de las mismas, bajo condiciones rigurosas. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan de modo que la temperatura sea aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmica (T<sub>m</sub>) de la secuencia específica en una fuerza iónica y un pH definidos. El T<sub>m</sub> es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda perfectamente correspondiente. Son condiciones rigurosas típicas aquéllas en que la concentración de sal es al menos aproximadamente 0,02 M en un pH de 7 y la temperatura es al menos aproximadamente 60°C.

Como se indicó previamente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen DNA y RNA. Los métodos para aislar DNA y RNA son bien conocidos en la técnica. Se prefiere generalmente aislar el RNA del estómago, aunque también se puede preparar DNA utilizando RNA de otros tejidos o se puede aislar como DNA genómico. Se puede preparar RNA total utilizando una extracción con guanidina-HCl seguida de un aislamiento por centrifugación en un gradiente de CsCl (Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18: 52-94, 1979). Se prepara poli(A)+ RNA a partir del RNA total usando el método de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1408-1412, 1972). Se prepara DNA complementario (cDNA) a partir de poli(A)+ RNA usando métodos conocidos. Los polinucleótidos que codifican polipéptidos zsig33 son luego identificados y aislados mediante, por ejemplo, hibridación o PCR.

En la presente solicitud se describen polipéptidos y polinucleótidos equivalentes de otras especies (ortólogos). Son de particular interés los polipéptidos zsig33 de otras especies de mamífero, incluyendo proteínas murinas, de rata, porcinas, ovinas, bovinas, caninas, felinas, equinas y de otros primates. Los ortólogos de las proteínas humanas pueden ser clonados usando información y composiciones proporcionadas por la presente solicitud, en combinación con técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, se puede clonar un cDNA usando mRNA obtenido de un tipo tisular o celular que exprese la proteína. Las fuentes de mRNA adecuadas pueden ser identificadas al sondear transferencias Northern con sondas diseñadas a partir de las secuencias aquí descritas. Luego se prepara un banco a partir del mRNA de una línea tisular o celular positiva. Un cDNA que codifica el ortólogo zsig33 puede ser luego aislado mediante una diversidad de métodos, tal como sondando con un cDNA humano completo o parcial o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas basadas en las secuencias descritas. También se puede clonar un cDNA utilizando la reacción en cadena de la polimerasa, o PCR (Mullis, Patente de EE.UU. nº 4.683.202), usando cebadores diseñados a partir de las secuencias aquí descritas. En un método adicional, se puede utilizar el banco de cDNA para transformar o transfectar células huésped, y la expresión del cDNA de interés puede ser detectada con un anticuerpo hacia zsig33. También se pueden aplicar técnicas similares al aislamiento de clones genómicos.

Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia descrita en la ID. SEC. nº 1 y el polipéptido codificado por ella representan un único alelo del gen zsig33 humano y el polipéptido, y que se espera que tengan lugar variación alélica y corte y empalme alternativos. Se pueden clonar variantes alélicas sondando bancos de cDNA o genómicos de diferentes individuos de acuerdo con procedimientos estándares. Se describen aquí variantes alélicas de la secuencia de DNA mostrada en la ID. SEC. nº 1, incluyendo aquéllas que contienen mutaciones silentes y aquéllas en que las mutaciones dan lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos, así como las proteínas que son el producto de la variación alélica de la ID. SEC. nº 2.

En la presente solicitud también se describen polipéptidos zsig33 aislados que son sustancialmente homólogos a los polipéptidos de la ID. SEC. nº 2 y sus ortólogos. La expresión "sustancialmente homólogo" se usa aquí para significar polipéptidos que tienen 50%, preferiblemente 60%, más preferiblemente al menos 80%, de identidad de secuencia con respecto a las secuencias mostradas en la ID. SEC. nº 2 o sus ortólogos. Más preferiblemente, dichos polipéptidos tendrán una identidad de al menos 90%, y muy preferiblemente de 95% o más, con respecto a la ID. SEC. nº 2 o sus ortólogos. El porcentaje de identidad de secuencias es determinado por métodos convencionales. Véanse, por ejemplo, Altschul *et al.*, *Bull. Math. Bio.* 48: 603-616 (1986), y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10.915-10.919 (1992). En resumen, se alinean dos secuencias de aminoácidos para optimizar las calificaciones de alineación usando una penalización de apertura de hueco de 10, una penalización de extensión de hueco de 1 y la matriz de calificación "blossom 62" de Henikoff y Henikoff (*ibídem*), mostrada en la Tabla 3 (los aminoácidos se indican mediante los códigos de una letra estándares).

TABLA 3

|    | A | R  | N  | D  | C  | Q  | E  | G  | H  | I  | L  | K  | M  | F  | P  | S  | T  | W  | Y  | V  |   |
|----|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| 5  | A | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|    | R | -1 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|    | N | -2 | 0  | 6  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| 10 | D | -2 | -2 | 1  | 6  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|    | C | 0  | -3 | -3 | -3 | 9  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|    | Q | -1 | 1  | 0  | 0  | -3 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| 15 | E | -1 | 0  | 0  | 2  | -4 | 2  | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|    | G | 0  | -2 | 0  | -1 | -3 | -2 | -2 | 6  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|    | H | -2 | 0  | 1  | -1 | -3 | 0  | 0  | -2 | 8  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| 20 | I | -1 | -3 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -4 | -3 | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|    | L | -1 | -2 | -3 | -4 | -1 | -2 | -3 | -4 | -3 | 2  | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
|    | K | -1 | 2  | 0  | -1 | -3 | 1  | 1  | -2 | -1 | -3 | -2 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |   |
| 25 | M | -1 | -1 | -2 | -3 | -1 | 0  | -2 | -3 | -2 | 1  | 2  | -1 | 5  |    |    |    |    |    |    |   |
|    | F | -2 | -3 | -3 | -3 | -2 | -3 | -3 | -3 | -1 | 0  | 0  | -3 | 0  | 6  |    |    |    |    |    |   |
|    | P | -1 | -2 | -2 | -1 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | -1 | -2 | -4 | 7  |    |    |    |    |   |
| 30 | S | 1  | -1 | 1  | 0  | -1 | 0  | 0  | 0  | -1 | -2 | -2 | 0  | -1 | -2 | -1 | 4  |    |    |    |   |
|    | T | 0  | -1 | 0  | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | 1  | 5  |    |    |    |   |
|    | W | -3 | -3 | -4 | -4 | -2 | -2 | -3 | -2 | -2 | -3 | -2 | -3 | -1 | 1  | -4 | -3 | -2 | 11 |    |   |
|    | Y | -2 | -2 | -2 | -3 | -2 | -1 | -2 | -3 | 2  | -1 | -1 | -2 | -1 | 3  | -3 | -2 | -2 | 2  | 7  |   |
| 35 | V | 0  | -3 | -3 | -3 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | 3  | 1  | -2 | 1  | -1 | -2 | -2 | 0  | -3 | -1 | 4 |

Luego se calcula el porcentaje de identidad de la manera siguiente:

$$\frac{\text{Número total de apareamientos idénticos}}{[\text{longitud de la secuencia más larga más el número de huecos introducidos en la secuencia más larga con objeto de alinear las dos secuencias}]} \times 100$$

La identidad de secuencia de moléculas polinucleotídicas es determinada mediante métodos similares usando una relación como la anteriormente descrita.

Las proteínas y polipéptidos sustancialmente homólogos se caracterizan por tener una o más sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácido. Estos cambios son preferiblemente de naturaleza menor, es decir, sustituciones de aminoácido conservativas (véase la Tabla 4) y otras sustituciones que no afectan significativamente a la plegadura ni a la actividad de la proteína o el polipéptido; pequeñas supresiones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas prolongaciones amino- o carboxilo-terminales, tal como un resto amino-terminal de metionina, un pequeño péptido conector de hasta aproximadamente 20-25 restos, o una pequeña prolongación que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como un tramo de polihistidina, proteína A (Nilsson *et al.*, *EMBO J.* 4: 1075, 1985; Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 198: 3, 1991), glutatión S transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67: 31, 1988), proteína ligante de maltosa (Kellerman y Ferenci, *Methods Enzymol.* 90: 459-463, 1982; Guan *et al.*, *Gene* 67: 21-30, 1987), tiorredoxina, ubiquitina, proteína ligante de celulosa, polimerasa de T7, u otro epítipo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107 (1991). Los DNAs que codifican etiquetas de afinidad se pueden obtener de proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, EE.UU.; y New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, EE.UU.).

TABLA 4

*Sustituciones de aminoácido conservativas*

|    |            |                 |
|----|------------|-----------------|
| 5  | Básicos:   | arginina        |
|    |            | lisina          |
|    |            | histidina       |
| 10 | Ácidos:    | ácido glutámico |
|    |            | ácido aspártico |
|    | Polares:   | glutamina       |
| 15 |            | asparagina      |
|    | Hidrófobos | leucina         |
|    |            | isoleucina      |
| 20 |            | valina          |
|    | Aromáticos | fenilalanina    |
|    |            | triptófano      |
| 25 |            | tirosina        |
|    | Pequeños:  | glicocola       |
|    |            | alanina         |
| 30 |            | serina          |
|    |            | treonina        |
|    |            | metionina       |

35 Además de los 20 aminoácidos estándares, aminoácidos no estándares (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil-lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y  $\alpha$ -metilserina) pueden sustituir a restos de aminoácido de zsig33. Restos de aminoácido de zsig33 pueden ser sustituidos por un número limitado de aminoácidos no conservativos, aminoácidos que no son codificados por el código genético y aminoácidos artificiales. Los "aminoácidos artificiales" han sido  
 40 modificados después de la síntesis proteica y/o tienen su(s) cadena(s) lateral(es) con una estructura química diferente de la de los aminoácidos estándares. Los aminoácidos artificiales pueden ser químicamente sintetizados o, preferiblemente, son comercialmente asequibles, e incluyen ácido pipécólico, ácido tiazolidinacarboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina, y 3,3-dimetilprolina.

45 Los aminoácidos esenciales de los polipéptidos zsig33 de la presente invención pueden ser identificados de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis por barrido de alaninas (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-1085, 1989). En la segunda técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada resto de la molécula y se examinan las moléculas mutantes resultantes en cuanto a su actividad biológica (por ejemplo, estimulación de la contractilidad de las células gastrointestinales, modulación de  
 50 la incorporación de nutrientes y/o secreción de enzimas digestivas) para identificar los restos de aminoácido que son críticos para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708, 1996. Mediante el análisis físico de la estructura, según se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción de electrones y marcación por fotoafinidad, junto con la mutación de los aminoácidos del supuesto sitio de contacto, se pueden también determinar los sitios de la interacción ligando-receptor. Véanse, por  
 55 ejemplo, de Vos *et al.*, *Science* 255: 306-312, 1992; Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904, 1992; y Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309: 59-64, 1992. También se pueden inferir las identidades de los aminoácidos esenciales mediante un análisis de homologías con miembros relacionados de la familia de glucagón-secretina de las hormonas peptídicas del intestino-cerebro.

60 Se pueden hacer y examinar múltiples sustituciones de aminoácidos utilizando métodos conocidos de mutagénesis y exploración, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer (*Science* 241: 53-57, 1988) o Bowie y Sauer (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2152-2156, 1989). En resumen, estos autores describen métodos para mutar aleatoria y simultáneamente dos o más posiciones de un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional y secuenciar luego los polipéptidos mutados para determinar el espectro de las sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que  
 65 se pueden utilizar incluyen la presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, *Biochem.* 30: 10.832-10.837, 1991; Ladner *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.223.409; y Huse, Publicación WIPO WO 92/06204) y la mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, *Gene* 46: 145, 1986; Ner *et al.*, *DNA* 7: 127, 1988).

Se pueden combinar métodos de mutagénesis como los anteriormente descritos con métodos de exploración automatizados de alta eficacia, para detectar la actividad de polipéptidos mutados y clonados en células huésped. Las moléculas de DNA mutadas que codifican polipéptidos activos (por ejemplo, estimulación de la contractilidad de las células gastrointestinales, modulación de la incorporación de nutrientes y/o secreción de enzimas digestivas) pueden ser recuperadas de las células huésped y ser rápidamente secuenciadas utilizando un equipo moderno. Estos métodos permiten la rápida determinación de la importancia de restos de aminoácido individuales en un polipéptido de interés y pueden ser aplicados a polipéptidos de estructura desconocida.

Utilizando los métodos anteriormente discutidos, quien tiene una experiencia normal en la técnica puede identificar y/o preparar una diversidad de polipéptidos que sean sustancialmente homólogos a los restos 24 a 37 de la ID. SEC. n° 2 o variantes alélicas de los mismos y que conserven las propiedades de la proteína de tipo silvestre. Dichos polipéptidos pueden incluir también segmentos polipeptídicos adicionales como los anteriormente descritos de forma general.

Los polipéptidos de la presente invención, incluyendo proteínas de longitud completa y fragmentos de las mismas, pueden ser producidos de acuerdo con técnicas convencionales en células huésped genéticamente creadas. Son células huésped adecuadas aquellos tipos celulares que pueden ser transformados o transfectados con DNA exógeno y ser desarrollados en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas y células eucarióticas superiores en cultivo. Se prefieren las células eucarióticas, particularmente células de organismos multicelulares en cultivo. Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU., 1989, y Ausubel *et al.* (redactores), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, EE.UU., 1987, describen técnicas para manipular moléculas de DNA clonadas e introducir DNA exógeno en una diversidad de células huésped.

En general, una secuencia de DNA que codifica un polipéptido zsig33 de la presente invención está operativamente unida a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, que incluyen generalmente un promotor y un terminador de transcripción dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que, en ciertos sistemas, se pueden proporcionar marcadores seleccionables en vectores distintos, y se puede obtener la replicación del DNA exógeno por integración en el genoma de la célula huésped. La selección de los promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño rutinario dentro del nivel de experiencia normal en la técnica. Muchos de dichos elementos son descritos en la bibliografía y son asequibles a través de proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido zsig33 a la ruta secretora de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal secretora (también conocida como secuencia líder, preprosecuencia o presecuencia) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora puede ser la del polipéptido zsig33 o puede proceder de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA) o ser sintetizada *de novo*. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de DNA de zsig33 en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras están comúnmente dispuestas en 5' con respecto a la secuencia de DNA que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal pueden estar dispuestas en otra parte de la secuencia de DNA de interés (véanse, por ejemplo, Welch *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.037.743; y Holland *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.143.830).

Las células de mamífero en cultivo son también huéspedes preferidos en la presente invención. Los métodos para introducir DNA exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler *et al.*, *Cell* 14: 725, 1978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603, 1981; Graham y Van der Eb, *Virology* 52: 456, 1973), electroporación (Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1: 841-845, 1982), transfección mediada por DEAE-dextrano (Ausubel *et al.*, redactores, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, EE.UU., 1987), transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson *et al.*, *Focus* 15: 73, 1993); Ciccarone *et al.*, *Focus* 15: 80, 1993), y vectores víricos (A. Miller y G. Rosman, *BioTechniques* 7: 980-90, 1989; Q. Wang y M. Finer, *Nature Med.* 2: 714-16, 1996). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero en cultivo es descrita, por ejemplo, por Levinson *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.713.339; Hagen *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.784.950; Palmiter *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.579.821; y Ringold, Patente de EE.UU. n° 4.656.134. Las células de mamífero en cultivo preferidas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC n° CRL 1650), COS-7 (ATCC n° CRL 1651), BHK 570 (ATCC n° CRL 10314), 293 (ATCC n° CRL 1573; Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36: 59-72, 1977) y ovárica de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1, ATCC n° CCL 61). En la técnica se conocen adecuadas líneas celulares adicionales, que son asequibles de depositarias públicas tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; del inglés, American Type Culture Collection), Rockville, Maryland, EE.UU. En general, se prefieren promotores de transcripción potentes, tales como promotores del virus 40 de simios (SV-40; del inglés, simian virus 40) o de citomegalovirus. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de genes de la metalotioneína (Patentes de EE.UU. números 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

Se usa generalmente la selección por fármacos para seleccionar las células de mamífero en cultivo en las que se ha insertado DNA extraño. A dichas células se hace comúnmente referencia como "transfectantes". A las células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su progenie se hace referencia como "transfectantes estables". Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección se lleva a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar. Pueden usarse también sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento al que se hace referencia como "multiplicación". La multiplicación se lleva a cabo cultivando transfectantes

en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y aumentando luego la cantidad de agente selectivo para seleccionar las células que producen niveles elevados de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable y multiplicable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. Pueden usarse también otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, y puromicina acetiltransferasa). Se pueden usar marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tal como la proteína fluorescente verde, o proteínas de la superficie celular tales como CD4, CD8, MHC de Clase I y fosfatasa alcalina placentaria, para separar las células transfectadas de las células no transfectadas mediante un medio tal como separación celular activada por fluorescencia (FACS; del inglés, fluorescence activated cell sorting) o tecnología de separación con glóbulos magnéticos.

También se pueden utilizar otras células eucarióticas superiores como huéspedes, incluyendo células vegetales, células de insecto y células aviares. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para que se expresen genes en células vegetales ha sido revisado por Sinkar *et al.*, *J. Biosci. (Bangalore)* 11: 47-58, 1987. Guarino *et al.*, Patente de EE.UU. nº 5.162.222, y la publicación WIPO WO 94/06463 describen la transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos extraños en ellas. Las células de insecto pueden ser infectadas con un baculovirus recombinante, comúnmente procedente del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV; del inglés, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus). El DNA que codifica el polipéptido zsig33 es insertado en el genoma baculovírico en lugar de la secuencia de codificación del gen de la polihedrina de AcNPV mediante uno de dos métodos. El primero es el método tradicional de recombinación homóloga de DNA entre AcNPV de tipo silvestre y un vector de transferencia que contiene el zsig33 flanqueado por secuencias de AcNPV. Se infectan células de insecto adecuadas, por ejemplo, células Sf9, con AcNPV de tipo silvestre y se transfectan con un vector de transferencia que comprende un polinucleótido zsig33 operativamente unido a un promotor, un terminador y secuencias flanqueadoras del gen de la polihedrina de AcNPV. Véanse L. A. King y R. D. Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Londres, Chapman & Hall; D. R. O'Reilly *et al.*, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York, EE.UU., Oxford University Press, 1994; y C. D. Richardson, redactor, *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology*, Totowa, New Jersey, EE.UU., Humana Press, 1995. La recombinación natural en una célula de insecto dará lugar a un baculovirus recombinante que contiene zsig33 conducido por el promotor de la polihedrina. Se preparan reservas víricas recombinantes mediante métodos comúnmente usados en la técnica.

En el segundo método para preparar un baculovirus recombinante se usa un sistema basado en transposones descrito por Luckow (V. A. Luckow *et al.*, *J. Virol.* 67: 4566-79, 1993). Este sistema se vende en el kit Bac-to-Bac (Life Technologies, Rockville, Maryland, EE.UU.). En este sistema se utiliza un vector de transferencia, pFastBac1™ (Life Technologies), que contiene un transposón Tn7 para introducir el DNA que codifica el polipéptido zsig33 en un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande llamado "bácmido". El vector de transferencia pFastBac1™ usa el promotor de la polihedrina de AcNPV para conducir la expresión del gen de interés, zsig33 en este caso. Sin embargo, se puede modificar pFastBac1™ en un grado considerable. Se puede quitar el promotor de la polihedrina y se puede sustituir por el promotor de la proteína básica de baculovirus (también conocido como promotor Pcor, p6.9 o MP), que se expresa antes en la infección baculovírica y del que se ha mostrado que es ventajoso para la expresión de proteínas secretadas. Véanse M. S. Hill-Perkins y R. D. Possee, *J. Gen. Virol.* 71: 971-6, 1990; B. C. Bonning *et al.*, *J. Gen. Virol.* 75: 1551-6, 1994; y G. D. Chazenbalk y B. Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270: 1543-9, 1995. En dichas construcciones de vectores de transferencia se puede usar una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, se pueden construir vectores de transferencia que sustituyan las secuencias señal secretoras de zsig33 nativas por secuencias señal secretoras derivadas de proteínas de insecto. Por ejemplo, en las construcciones se puede usar una secuencia señal secretora de glucosil transferasa ecdisteroide (EGT; del inglés, ecdysteroid glucosyltransferase), melitina de abeja (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) o gp67 de baculovirus (PharMingen, San Diego, California, EE.UU.), para sustituir la secuencia señal secretora de zsig33 nativa. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en marco con un DNA que codifica una etiqueta epitópica en el extremo C o N del polipéptido zsig33 expresado, tal como, por ejemplo, una etiqueta epitópica Glu-Glu (T. Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7952-4, 1985). Usando una técnica conocida en este campo técnico, se transforma *E. coli* con un vector de transferencia que contiene zsig33 y se explora en cuanto a bácmidos que contengan un gen LacZ interrumpido, indicativo de un baculovirus recombinante. El DNA bácmido que contiene el genoma de baculovirus recombinante es aislado usando técnicas habituales y es usado para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo, células Sf9. Posteriormente se produce el virus recombinante que expresa zsig33. Se preparan reservas víricas recombinantes mediante métodos comúnmente usados en la técnica.

El virus recombinante se usa para infectar células huésped, típicamente una línea celular procedente del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, Distrito de Columbia, EE.UU., 1994. Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveO™ (Invitrogen) procedente de *Trichoplusia ni* (Patente de EE.UU. nº 5.300.435). Se usan medios exentos de suero comercialmente asequibles para desarrollar y mantener las células. Son medios adecuados: Sf900 II™ (Life Technologies) y ESF 921™ (Expression Systems) para las células Sf9; y ExcellO405™ (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, EE.UU.) y Express FiveO™ (Life Technologies) para las células de *T. ni*. Las células son cultivadas desde una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 x 10<sup>5</sup> células hasta una densidad de 1-2 x 10<sup>6</sup> células, momento en que una reserva vírica recombinante es añadida con una multiplicidad de infección (MOI; del inglés, multiplicity of infection) de 0,1 a 10, más típicamente próxima a 3. Las células infectadas con el virus recombinante producen típicamente el polipéptido zsig33 recombinante a las 12-72 horas después de la infección y lo secretan al medio con una eficacia variable. El cultivo se recolecta normalmente a las 48 horas después

de la infección. Se utiliza una centrifugación para separar las células del medio (sobrenadante). El sobrenadante que contiene el polipéptido zsig33 es filtrado a través de filtros microporosos, normalmente con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ . Los procedimientos usados son generalmente descritos en manuales de laboratorio aseptibles (L. A. King y R. D. Possee, *ibidem*; D. R. O'Reilly *et al.*, *ibidem*; C. D. Richardson, *ibidem*). La subsiguiente purificación del polipéptido zsig33 a partir del sobrenadante puede realizarse usando métodos aquí descritos.

También se pueden usar células fúngicas, incluyendo células de levadura, y particularmente células de los géneros *Saccharomyces* y *Pichia*, en la presente invención, tal como para producir fragmentos de zsig33 o fusiones polipeptídicas. Por ejemplo, Kawasaki, Patente de EE.UU. n° 4.599.311; Kawasaki *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.931.373; Brake, Patente de EE.UU. n° 4.870.008; Welch *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.037.743; y Murray *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.845.075, describen métodos para transformar células de levadura con DNA exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas. Las células transformadas son seleccionadas mediante el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente la resistencia a fármacos o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente concreto (por ejemplo, leucina). Un sistema vector preferido para uso en levadura es el sistema vector POT1 descrito por Kawasaki *et al.* (Patente de EE.UU. n° 4.931.373), que permite que las células transformadas sean seleccionadas mediante crecimiento en medios que contienen glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para uso en levadura incluyen los de genes de enzimas glicolíticas (véanse, por ejemplo, Kawasaki, Patente de EE.UU. n° 4.599.311; Kingsman *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.615.974; y Bitter, Patente de EE.UU. n° 4.977.092) y de genes de alcohol deshidrogenasa. Véanse también las Patentes de EE.UU. números 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454. En la técnica se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia methanolica* y *Candida maltosa*. Véanse, por ejemplo, Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* 132: 3459-3465, 1986, y Cregg, Patente de EE.UU. n° 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* de acuerdo con los métodos de McKnight *et al.*, Patente de EE.UU. n° 4.935.349, que se incorpora aquí por referencia. Sumino *et al.*, Patente de EE.UU. n° 5.162.228, describen métodos para transformar *Acremonium chrysogenum*. Lambowitz, Patente de EE.UU. n° 4.486.533, describe métodos para transformar *Neurospora*.

Las células huésped transformadas o transfectadas son cultivadas de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento de las células huésped escogidas. En la técnica se conoce una diversidad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, medios que incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios pueden también contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de crecimiento seleccionará generalmente las células que contienen el DNA exógenamente añadido, mediante, por ejemplo, selección por fármacos o deficiencia de un nutriente esencial que es complementado por el marcador seleccionable llevado por el vector de expresión o introducido en la célula huésped por cotransfección. Las células de *P. methanolica* son cultivadas en un medio que comprende fuentes adecuadas de carbono, nitrógeno y oligonutrientes a una temperatura de aproximadamente 25°C a 35°C. Los cultivos líquidos son provistos de una aireación suficiente por un medio convencional, tal como el sacudimiento de pequeños matraces o el burbujeo en fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolica* es YEPD [D-glucosa al 2%, peptona Bacto™ (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) al 2%, extracto de levadura Bacto™ (Difco Laboratories) al 1%, adenina al 0,004% y L-leucina al 0,006%].

Los polipéptidos zsig33 recombinantes expresados pueden ser purificados usando fraccionamiento y/o métodos y medios para purificación convencionales. Para el fraccionamiento de las muestras, se pueden usar la precipitación con sulfato amónico y la extracción con ácidos o agentes caotrópicos. Las operaciones de purificación ejemplares pueden incluir hidroxipatito, exclusión por tamaños, cromatografía de resolución rápida en estado líquido para proteínas y cromatografía de alta eficacia en estado líquido y fase inversa. Los medios de intercambio aniónico adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliácridamida, sílices especiales, y similares. Se prefieren los derivados de PEI, DEAE, QAE y Q, siendo particularmente preferido el DEAE Fast-Flow Sepharose (Pharmacia, Piscataway, New Jersey, EE.UU.). Los medios cromatográficos ejemplares incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl Butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, Pennsylvania, EE.UU.), Octyl-Sepharose (Pharmacia) y similares; y resinas poliacrílicas tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen glóbulos de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, glóbulos de agarosa, glóbulos de agarosa reticulada, glóbulos de poliestireno, resinas de poliácridamida reticulada y similares, que son insolubles bajo las condiciones en que se van a usar. Estos soportes pueden ser modificados con grupos reactivos que permiten la fijación de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidrato de carbono. Los ejemplos de químicas de copulación incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida, y derivados carboxílicos y amínicos para químicas de copulación con carbohidratos. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y ampliamente usados en la técnica, y son aseptibles de proveedores comerciales. Los métodos para unir polipéptidos receptores a medios de soporte son bien conocidos en la técnica. La selección de un método concreto es una cuestión de diseño rutinario y viene determinada en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles & Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser aislados por explotación de su pequeño tamaño y su bajo pI. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención se pueden unir a intercambiadores aniónicos en valores de pH bajos. Otros métodos de purificación incluyen la purificación de proteínas glicosiladas por cromatografía de

afinidad sobre lectina y cromatografía de intercambio iónico (*Methods in Enzymol.*, volumen 182, “Guide to Protein Purification”, redactado por M. Deutscher, Acad. Press, San Diego, 1990, páginas 529-39). Alternativamente, se puede construir una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad (por ejemplo, polihistidina, proteína ligante de maltosa, o un dominio inmunoglobulínico), para facilitar la purificación.

Se pueden usar ventajosamente procedimientos para la replegadura (y, opcionalmente, la reoxidación) de proteínas. Se prefiere purificar la proteína hasta una pureza > 80%, más preferiblemente hasta una pureza > 90% y, aún más preferiblemente, > 95%, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro, es decir, más de 99,9% puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, una proteína purificada está sustancialmente exenta de otras proteínas, particularmente de otras proteínas de origen animal.

Los polipéptidos zsig33 o los fragmentos de los mismos pueden ser también preparados mediante síntesis química. Los polipéptidos zsig33 pueden ser monómeros o multímeros; glicosilados o no glicosilados; con o sin grupos PEG covalentemente unidos; amidados o no amidados; y sulfatados o no sulfatados; y pueden incluir o no un resto inicial del aminoácido metionina. Por ejemplo, los polipéptidos zsig33 pueden ser también sintetizados mediante síntesis exclusiva en fase sólida, métodos parciales en fase sólida, condensación de fragmentos o síntesis clásica en disolución. Los polipéptidos se preparan preferiblemente mediante síntesis peptídica en fase sólida, como describe, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149, 1963. La síntesis se lleva a cabo con aminoácidos que tienen protegido el extremo amínico alfa. Los aminoácidos trifuncionales con cadenas laterales lábiles son también protegidos con grupos adecuados para evitar que se produzcan reacciones químicas indeseadas durante la ensambladura de los polipéptidos. El grupo protector del amino alfa es selectivamente eliminado para permitir que tenga lugar la reacción subsiguiente en el extremo amínico. Las condiciones para la eliminación del grupo protector del amino alfa no eliminan los grupos protectores de las cadenas laterales.

Los grupos protectores del amino alfa son aquellos conocidos por ser útiles en el campo de la síntesis gradual de polipéptidos. Se incluyen grupos protectores de tipo acilo (por ejemplo, formilo, trifluoroaceto y acetilo), grupos protectores de tipo arilo (por ejemplo, biotínilo), grupos protectores de tipo uretano aromático [por ejemplo, benciloxycarbonilo (Cbz), benciloxycarbonilo sustituido y 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc)], grupos protectores de uretano alifático [por ejemplo, t-butiloxycarbonilo (tBoc), isopropiloxycarbonilo y ciclohexiloxycarbonilo], y grupos protectores de tipo alquilo (por ejemplo, bencilo y trifenilmetilo). Los grupos protectores preferidos son tBoc y Fmoc.

Los grupos protectores de cadenas laterales seleccionados deben permanecer intactos durante la copulación y no deben ser eliminados durante la desprotección del grupo protector del extremo amínico ni bajo las condiciones la copulación. Los grupos protectores de cadenas laterales deben ser además eliminables tras la compleción de la síntesis utilizando condiciones de reacción que no alteren el polipéptido acabado. En la química de tBoc, los grupos protectores de cadenas laterales para aminoácidos trifuncionales se basan sobre todo en bencilo. En la química de Fmoc, se basan sobre todo en terc-butilo o tritilo.

En la química de tBoc, los grupos protectores de cadenas laterales preferidos son tosilo para la arginina, ciclohexilo para el ácido aspártico, 4-metilbencilo (y acetamidometilo) para la cisteína, bencilo para el ácido glutámico, la serina y la treonina, benciloximetilo (y dinitrofenilo) para la histidina, 2-Cl-benciloxycarbonilo para la lisina, formilo para el triptófano y 2-bromobencilo para la tirosina. En la química de Fmoc, los grupos protectores de cadenas laterales preferidos son 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo (Pmc) o 2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofuran-5-sulfonilo (Pbf) para la arginina, tritilo para la asparagina, la cisteína, la glutamina y la histidina, terc-butilo para el ácido aspártico, el ácido glutámico, la serina, la treonina y la tirosina, y tBoc para la lisina y el triptófano.

Para la síntesis de fosfopéptidos, se utiliza la incorporación directa del grupo fosfato o su incorporación después de la ensambladura. En la estrategia de incorporación directa, el grupo fosfato sobre la serina, la treonina o la tirosina puede ser protegido mediante metilo, bencilo o terc-butilo en la química de Fmoc, o mediante metilo, bencilo o fenilo en la química de tBoc. En la química de Fmoc también se puede utilizar la incorporación directa de fosfotirosina sin protección del fosfato. En la estrategia de incorporación después de la ensambladura, los grupos hidroxilo no protegidos de la serina, la treonina o la tirosina son derivatizados en fase sólida con di-terc-butyl-, dibencil- o dimetil-N,N'-diisopropilfosforamidita y son luego oxidados con hidroperóxido de terc-butilo.

La síntesis en fase sólida se lleva normalmente a cabo desde el extremo carboxílico copulando el aminoácido con amino alfa protegido (cadena lateral protegida) con un soporte sólido adecuado. Se forma un enlace éster cuando la fijación se hace a una resina clorometílica, clorotrílica o hidroximetílica, y el polipéptido resultante tendrá un grupo carboxilo libre en el extremo C. Alternativamente, cuando se usan una resina amídica tal como una resina de bencidrilamina o de p-metilbencidrilamina (para la química de tBoc), y una resina amídica Rink o una resina PAL (para la química de Fmoc), se forma un enlace amídico y el polipéptido resultante tendrá un grupo carboxamida en el extremo C. Estas resinas, basadas en poliestireno o poliamida o injertadas con polietilenglicol, con o sin un asa o un conector, con o sin el primer aminoácido fijado, son comercialmente asequibles, y sus preparaciones han sido descritas por Stewart *et al.*, “Solid Phase Peptide Synthesis” (2ª edición; Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, EE.UU., 1984); Bayer y Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3: 3 (1986); y Atherton *et al.*, “Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach”, IRL Press, Oxford, 1989.

El aminoácido C-terminal, con la cadena lateral, si fuera necesario, y el grupo amino alfa protegidos, es fijado a una resina hidroximetilica usando diversos agentes activadores que incluyen diciclohexilcarbodiimida (DCC), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIPCDI) y carbonildiimidazol (CDI). Puede ser fijado directamente a la resina clorometilica o clorotritilica en su forma de sal de cesio-tetrametilamonio o en presencia de trietilamina (TEA) o diisopropiletilamina (DIEA). La fijación del primer aminoácido a una resina amídica es igual que la formación de un enlace amídico durante las reacciones de copulación.

Después de la fijación al soporte de resina, el grupo protector del amino alfa es eliminado utilizando diversos reactivos que dependen de la química de protección (por ejemplo, tBoc y Fmoc). El grado de eliminación de Fmoc puede ser determinado a 300-320 nm o mediante una célula de conductividad. Después de la eliminación del grupo protector del amino alfa, los restantes aminoácidos protegidos son gradualmente copulados en el orden requerido para obtener la secuencia deseada.

Para las reacciones de copulación, se pueden utilizar diversos agentes activadores, que incluyen DCC, DIPCDI, hexafluorofosfato de 2-cloro-1,3-dimetilimidio (CIP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio (BOP) y su compuesto análogo de pirrolidina (PyBOP), hexafluorofosfato de bromo-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBroP), hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio (HBTU) y su compuesto análogo de tetrafluoroborato (TBTU) o su compuesto análogo de pirrolidina (HBPYU), y hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-uronio (HATU) y su compuesto análogo de tetrafluoroborato (TATU) o su compuesto análogo de pirrolidina (HAPYU). Los aditivos catalíticos más comunes usados en las reacciones de copulación incluyen 4-dimetilaminopiridina (DMAP), 3-hidroxi-3,4-dihidro-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (HODhbt), N-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 1-hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt). Cada aminoácido protegido se utiliza en exceso (> 2,0 equivalentes), y las copulaciones se llevan normalmente a cabo en N-metilpirrolidona (NMP) o en DMF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o mezclas de los mismos. El grado de compleción de la reacción de copulación puede ser determinado en cada etapa mediante, por ejemplo, la reacción con ninhidrina de la manera descrita por Kaiser *et al.*, *Anal. Biochem.* **34**: 595, 1970.

Después de la ensambladura completa del péptido deseado, el péptido es escindido de la resina con un reactivo con agentes supresores apropiados. Los péptidos de Fmoc son normalmente escindidos y desprotegidos mediante TFA con agentes supresores (por ejemplo, H<sub>2</sub>O, etanoditiol, fenol y tioanisol). Los péptidos de tBoc son normalmente escindidos y desprotegidos con HF líquido durante 1-2 horas a una temperatura de -5 a 0°C, lo que escinde el polipéptido de la resina y elimina la mayor parte de los grupos protectores de cadenas laterales. Se usan normalmente agentes supresores, tales como anisol, sulfuro de dimetilo y p-tiocresol, con el HF líquido para evitar que los cationes formados durante la escisión alquilen y acilen los restos de aminoácido presentes en el polipéptido. El grupo formilo del triptófano y el grupo dinitrofenilo de la histidina han de ser eliminados, respectivamente, por piperidina y tiofenilo en DMF antes de la escisión con HF. El grupo acetamidometilo de la cisteína puede ser eliminado mediante acetato de mercurio (II) y, alternativamente, mediante yodo, trifluoroacetato de talio (III) o tetrafluoroborato de plata, los cuales oxidan simultáneamente la cisteína hasta cistina. Otros ácidos fuertes utilizados para la escisión y desprotección de péptidos de tBoc incluyen el ácido trifluorometanosulfónico (TFMSA) y el trifluoroacetato de trimetilsililo (TMSOTf).

La actividad de las moléculas de la presente invención puede ser medida utilizando una diversidad de ensayos que permiten medir la estimulación de la contractilidad de las células gastrointestinales, la modulación de la incorporación de nutrientes y/o la secreción de enzimas digestivas. Son particularmente interesantes los cambios en la contractilidad de las células musculares lisas; por ejemplo, la respuesta contráctil de segmentos de duodeno de mamífero o de otro tejido de músculos lisos gastrointestinales (Depoortere *et al.*, *J. Gastrointestinal Motility* **1**: 150-159, 1989). En un ensayo ejemplar *in vivo* se utiliza un micrómetro ultrasónico para medir los cambios dimensionales, radialmente entre comisuras y longitudinalmente con respecto al plano de la base valvular (Hansen *et al.*, *Society of Thoracic Surgeons* **60**: S384-390, 1995).

En el marco clínico, la motilidad gástrica se mide generalmente como el tiempo requerido para el vaciamiento gástrico y el subsiguiente tiempo de tránsito a través del tracto gastrointestinal. Los barridos de vaciamiento gástrico son bien conocidos por los expertos en la técnica y, en pocas palabras, comprenden el uso de un agente oral de contraste, tal como bario, o una comida radiomarcada. Se pueden medir independientemente sólidos y líquidos. Se radiomarca un alimento o líquido de ensayo con un isótopo (por ejemplo, <sup>99m</sup>Tc) y, después de la ingestión o la administración, se miden el tiempo de tránsito a través del tracto gastrointestinal y el vaciamiento gástrico mediante visualización utilizando cámaras gamma (Meyer *et al.*, *Am. J. Dig. Dis.* **21**: 296, 1976; Collins *et al.*, *Gut* **24**: 1117, 1983; Maughan *et al.*, *Diabet. Med.* **13**, Supp. **5**: S6-10, 1996; y Horowitz *et al.*, *Arch. Intern. Med.* **145**: 1467-1472, 1985). Estos estudios pueden ser llevados a cabo antes y después de la administración de un agente de promotilidad para cuantificar la eficacia del fármaco.

Los ensayos en que se mide la capacidad de los polipéptidos zsig33 para afectar a la proliferación o la diferenciación celulares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los ensayos en que se mide proliferación incluyen ensayos tales como la quimiosensibilidad al colorante rojo neutro (Cavanaugh *et al.*, *Investigational New Drugs* **8**: 347-354, 1990), la incorporación de nucleótidos radiomarcados (Cook *et al.*, *Analytical Biochem.* **179**: 1-7, 1989), la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) al DNA de células en proliferación (Portsmann *et al.*, *J. Immunol. Methods* **82**: 169-179, 1985) y el uso de sales de tetrazolio (Mosmann, *J. Immunol. Methods* **65**: 55-63, 1983; Alley *et al.*, *Cancer Res.* **48**: 589-601, 1988; Marshall *et al.*, *Growth Reg.* **5**: 69-84, 1995; y Scudiero *et al.*, *Cancer Res.* **48**: 4827-4833, 1988). Los ensayos en que se mide diferenciación incluyen, por ejemplo, la medición de marcadores de la superficie celular asociados con la expresión de un tejido específica de la fase, la actividad enzimática, la actividad

funcional o cambios morfológicos (Watt, *FASEB* 5: 281-284, 1991; Francis, *Differentiation* 57: 63-75, 1994; y Raes, *Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses*, 161-171, 1989).

Se pueden utilizar ensayos para medir otras respuestas celulares, que incluyen quimiotaxis, adhesión, cambios en la afluencia a canales iónicos, regulación de los niveles de segundos mensajeros y liberación de neurotransmisores. Dichos ensayos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, en "Basic & Clinical Endocrinology Series", Volumen 3, *Cytochemical Bioassays: Techniques & Applications*, Chayen, compilado por Chayen y Bitensky, Dekker, New York, EE.UU., 1983.

A la vista de la distribución tisular observada para zsig33, los agonistas (incluyendo el ligando/sustrato/cofactor, etc. naturales) y los antagonistas tienen un enorme potencial en las aplicaciones tanto *in vitro* como *in vivo*. Los compuestos identificados como agonistas de zsig33 son útiles para promover la estimulación de la contractilidad de las células gastrointestinales, la modulación de la incorporación de nutrientes y/o la secreción de enzimas digestivas *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, los compuestos agonistas son útiles como componentes de medios definidos para cultivo celular y regulan la incorporación de nutrientes y, por lo tanto, son útiles para promover específicamente el crecimiento y/o desarrollo de células gastrointestinales tales como las células G y las células enterocromafines, y la mucosa epitelial del estómago, el duodeno, el yeyuno próximo, el antro y el fundus.

La familia de los péptidos del intestino-cerebro ha sido asociada con funciones neurológicas y del sistema nervioso central. Por ejemplo, se ha mostrado que el NPY, un péptido con receptores tanto en el cerebro como en el intestino, estimula el apetito cuando se administra al sistema nervioso central (Gehlert, *Life Sciences* 55 (6): 551-562, 1994). Se ha identificado inmunorreactividad hacia motilina en diferentes regiones del cerebro, particularmente el cerebelo, y en la hipófisis (Gasparini *et al.*, *Hum. Genetics* 94 (6): 671-674, 1994). Se ha hallado que la motilina coexiste con el neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico en el cerebelo (Chan-Patay, *Proc. Sym. 50th Anniv. Meet. Br. Pharmacol. Soc.*: 1-24, 1982). Estudios fisiológicos han proporcionado cierta evidencia de que la motilina ejerce un efecto sobre la conducta relativa a la comida (Rosenfield *et al.*, *Phys. Behav.* 39 (6): 735-736, 1987), el control de la vejiga y la liberación de la hormona del crecimiento hipofisaria. Se ha mostrado que otros péptidos del intestino-cerebro, tales como la CCK, la encefalina, el VIP y la secretina, están implicados en el control de la presión sanguínea, la frecuencia cardíaca, la conducta y la modulación del dolor, además de ser activos en el sistema digestivo. Por lo tanto, podría esperarse que zsig33, o cierta porción del mismo, presentara cierta asociación neurológica.

Usando cambios específicos del sitio en las secuencias de aminoácidos y de DNA de la presente invención, se pueden preparar compuestos análogos que sean antagonistas, agonistas o agonistas parciales (Macielay *et al.*, *Peptides: Chem. Struct. Biol.*, página 659, 1996). Los antagonistas son útiles para estados clínicos asociados con una hipermotilidad gastrointestinal, tales como la diarrea y la enfermedad de Crohn. Los antagonistas son también útiles como reactivos de investigación para caracterizar sitios de interacción de ligando-receptor.

También se puede utilizar un polipéptido que se une al ligando de zsig33 para la purificación del ligando. El polipéptido es inmovilizado en un soporte sólido, tal como glóbulos de agarosa, agarosa reticulada, vidrio, resinas celulósicas, resinas basadas en sílice, poliestireno, poliácridamida reticulada o materiales similares que son estables bajo las condiciones de uso. Los métodos para unir polipéptidos a soportes sólidos son conocidos en la técnica e incluyen química de aminas, activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo y activación con hidrazida. El medio resultante será generalmente configurado en forma de columna, y los fluidos que contienen el ligando serán hechos pasar a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. El ligando es luego eluido utilizando cambios en la concentración de sal, agentes caotrópicos (guanidina-HCl) o el pH para romper la unión de ligando-receptor.

Se puede emplear ventajosamente un sistema de ensayo en que se usa un receptor (o un anticuerpo o un miembro de una pareja de complemento/anticomplemento) que se une al ligando o un fragmento ligante del receptor, y un instrumento biosensor comercialmente asequible (BIAcore™, Pharmacia Biosensor, Piscataway, New Jersey, EE.UU.). Dicho receptor, anticuerpo, miembro de una pareja de complemento/anticomplemento o fragmento es inmovilizado en la superficie de un chip receptor. El uso de este instrumento es descrito por Karlsson, *J. Immunol. Methods* 145: 229-40, 1991, y por Cunningham y Wells, *J. Mol. Biol.* 234: 554-63, 1993. Un receptor, anticuerpo, miembro o fragmento es fijado covalentemente, usando una química de aminas o sulfhidrilos, a fibras de dextrano que están fijadas a una película de oro dentro de la célula de flujo. Se hace pasar una muestra de ensayo a través de la célula. Si está presente un ligando, epítipo o miembro opuesto de la pareja de complemento/anticomplemento en la muestra, se unirá al receptor, anticuerpo o miembro inmovilizado, respectivamente, lo que causará un cambio en el índice de refracción del medio que se detecta como un cambio en la resonancia del plasmón superficial de la película de oro. Este sistema permite la determinación de velocidades de asociación y disociación, a partir de las cuales puede calcularse la afinidad de unión, y la valoración de la estequiometría de la unión.

Los polipéptidos receptores que se unen al ligando pueden ser también usados en otros sistemas de ensayo conocidos en la técnica. Dichos sistemas incluyen el análisis de Scatchard para determinación de la afinidad de unión (véase Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-72, 1949) y ensayos calorimétricos (Cunningham *et al.*, *Science* 253: 545-48, 1991; Cunningham *et al.*, *Science* 245: 821-25, 1991).

También se pueden utilizar polipéptidos zsig33 para preparar anticuerpos que se unan específicamente a epítopos, péptidos o polipéptidos de zsig33. Los métodos para preparar anticuerpos policlonales y monoclonales son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU., 1989; y J. G. R. Hurrell, redactor, *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, EE.UU., 1982). Como resultará evidente para quien tiene experiencia normal en la técnica, se pueden generar anticuerpos policlonales a partir de una diversidad de animales de sangre caliente, tales como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, gallinas, conejos, ratones y ratas.

La inmunogenicidad de un polipéptido zsig33 puede ser aumentada por medio del uso de un agente adyuvante, tal como alúmina (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como las fusiones de zsig33 o de una porción del mismo con un polipéptido inmunoglobulínico o con la proteína ligante de maltosa. El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción polipeptídica es de “tipo hapteno”, dicha porción puede ser ventajosamente unida o enlazada a un vehículo macromolecular [tal como hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH; del inglés, *keyhole limpet hemocyanin*), albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, *bovine serum albumin*) o toxoide tetánico] para la inmunización.

Cómo se utiliza aquí, el término “anticuerpos” incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos ligantes de antígeno tales como los fragmentos proteolíticos F(ab')<sub>2</sub> y Fab. También se incluyen anticuerpos intactos o fragmentos genéticamente contruidos, tales como anticuerpos quiméricos, fragmentos Fv, anticuerpos de cadena única y similares, así como péptidos y polipéptidos ligantes de antígeno sintéticos. Los anticuerpos no humanos se pueden humanizar injertando sólo regiones determinantes de la complementariedad (CDRs; del inglés, *complementarity determining regions*) no humanas en regiones constantes y de entramado humanas, o incorporando los dominios variables no humanos completos (opcionalmente “encubriéndolos” con una superficie de tipo humano por sustitución de restos expuestos, siendo el resultado un anticuerpo “enchapado”). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden conservar restos no humanos en los dominios de entramado de regiones variables humanas para potenciar unas características ligantes apropiadas. Por medio de la humanización de anticuerpos, se puede aumentar la semivida biológica y se reduce el potencial de reacciones inmunes negativas tras la administración a seres humanos. Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos aquí útiles incluyen la exposición *in vitro* de linfocitos a la proteína o péptido zsig33, y la selección de bancos de presentación de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, por medio del uso de una proteína o péptido zsig33 inmovilizada o marcada).

Se define que los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido zsig33 con una afinidad de unión ( $K_a$ ) de  $10^6 \text{ M}^{-1}$  o mayor, preferiblemente de  $10^7 \text{ M}^{-1}$  o mayor, más preferiblemente de  $10^8 \text{ M}^{-1}$  o mayor, y muy preferiblemente de  $10^9 \text{ M}^{-1}$  o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser fácilmente determinada por quien tiene una experiencia normal en la técnica (por ejemplo, mediante un análisis de Scatchard).

Para detectar anticuerpos que se unen específicamente a proteínas o péptidos zsig33, se puede utilizar una diversidad de ensayos conocidos por los expertos en la técnica. En *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (redactores), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, se describen con detalle ensayos ejemplares. Los ejemplos representativos de dichos ensayos incluyen: inmunolectroforesis concurrente, radioinmunoensayo, radioinmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, *enzyme-linked immunosorption assay*), ensayo de transferencia Western o de transferencia en forma de punto, ensayo de inhibición o competición, y ensayo sándwich. Además, los anticuerpos pueden ser explorados en cuanto a su unión a la proteína o péptido zsig33 mutante frente a la de tipo silvestre.

Los anticuerpos hacia zsig33 pueden ser utilizados para etiquetar células que expresan zsig33, para aislar zsig33 mediante purificación por afinidad; para ensayos diagnósticos para determinar los niveles circulantes de polipéptidos zsig33; para detectar o cuantificar el zsig33 soluble como marcador de una patología o enfermedad subyacente; en métodos analíticos en que se emplea FACS; para explorar bancos de expresión; para generar anticuerpos antiidiotípicos; y como anticuerpos neutralizantes o como antagonistas para bloquear la actividad de zsig33 *in vitro* e *in vivo*. Las etiquetas o marcadores directos adecuados incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las etiquetas o marcadores indirectos se pueden caracterizar por el uso de biotina-avidina u otras parejas de complemento/anticomplemento como productos intermedios. También se pueden conjugar directa o indirectamente los presentes anticuerpos con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares, y se pueden utilizar estos productos de conjugación para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo*.

Las moléculas de la presente invención pueden ser utilizadas para identificar y aislar receptores que median en la función de zsig33. Por ejemplo, se pueden inmovilizar proteínas y péptidos de la presente invención en una columna y se pueden desarrollar preparaciones de membranas a lo largo de la columna (*Immobilized Affinity Ligand Techniques*, redactado por Hermanson *et al.*, Academic Press, San Diego, California, EE.UU., 1992, páginas 195-202). También se pueden radiomarcarse (*Methods in Enzymol.*, volumen 182, “Guide to Protein Purification”, redactado por M. Deutscher, Acad. Press, San Diego, 1990, 721-737) o marcar por fotoafinidad (Brunner *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.* 62: 483-514, 1993, y Fedan *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 33: 1167-1180, 1984) las proteínas y péptidos, y se pueden identificar proteínas específicas de la superficie celular.

Los polipéptidos, el ácido nucleico y/o los anticuerpos de la presente invención pueden ser utilizados en el tratamiento de trastornos asociados con la contractilidad de las células gastrointestinales, la secreción de enzimas digestivas y ácidos, la motilidad gastrointestinal, el reclutamiento de enzimas digestivas; la inflamación, particularmente en lo que afecta al sistema gastrointestinal; la enfermedad por reflujo y la regulación de la absorción de nutrientes. Los estados específicos que se beneficiarán del tratamiento con moléculas de la presente invención incluyen pero no se limitan a, gastroparesis diabética, gastroparesis posquirúrgica, vagotomía, pseudoobstrucción intestinal idiopática crónica y enfermedad por reflujo gastroesofágico. Otros usos adicionales incluyen el vaciamiento gástrico para estudios radiológicos, la estimulación de la contracción de la vesícula biliar y la antrectomía.

Los efectos motores y neurológicos de las moléculas de la presente invención les hacen útiles para el tratamiento de la obesidad y de otros trastornos metabólicos en que la retroalimentación neurológica modula la absorción nutricional. Las moléculas de la presente invención son útiles para regular la saciedad, la absorción y el metabolismo de la glucosa, y trastornos gastrointestinales asociados con neuropatías.

Las moléculas de la presente invención son también útiles como aditivos para preparaciones antihipoglucémicas que contienen glucosa y como potenciadores de la adsorción para fármacos orales que requieren una acción rápida de nutrientes. Además, las moléculas de la presente invención pueden ser utilizadas para estimular la liberación de insulina provocada por glucosa.

Para uso farmacéutico, las proteínas de la presente invención pueden ser formuladas para distribución parenteral, particularmente intravenosa o subcutánea, e inhalación nasal de acuerdo con métodos convencionales. La administración intravenosa puede ser por infusión o inyección en bolo a lo largo de un periodo típico de una a varias horas. En general, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir una proteína zsig33 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como disolución salina, disolución salina tamponada, dextrosa al 5% en agua o similar. Las formulaciones pueden incluir además uno o más excipientes, conservantes, agentes solubilizadores, agentes tampón, albúmina para evitar la pérdida de proteínas en las superficies de los viales, etc. Los métodos de formulación son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, redactado por Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, EE.UU., 1990. Las dosis terapéuticas estarán generalmente en el intervalo de 0,1 a 100  $\mu\text{g/kg}$  de peso del paciente por día, preferiblemente de 0,5-20  $\mu\text{g/kg}$  por día, siendo determinada la dosis exacta por el clínico de acuerdo con normas aceptadas teniendo en cuenta la naturaleza y la gravedad del estado que se trata, las características del paciente etc. La determinación de la dosis está dentro del nivel de la experiencia normal en la técnica. Las proteínas pueden ser administradas para un tratamiento agudo, durante una semana o menos, a menudo durante un periodo de uno a tres días, o pueden ser utilizadas en un tratamiento crónico, durante varios meses o años. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de zsig33 es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la motilidad gástrica y en los parámetros utilizados para medir cambios en la absorción nutricional. Los ensayos específicos para realizar dichas mediciones son conocidos por quienes tienen una experiencia normal en la técnica.

## 40 Ejemplos

### Ejemplo 1

La exploración de una base de datos de cDNA en cuanto a cDNAs que contuvieran una secuencia de secreción reveló una etiqueta de secuencia expresada (EST; del inglés, *expressed sequence tag*) que tenía homología con la motilina. El cDNA es de un banco de cDNA pancreático fetal humano.

La confirmación de la secuencia de la EST se realizó mediante análisis de secuencias del cDNA a partir del cual se originó la EST. Este cDNA estaba contenido en un plásmido y fue cortado utilizando sitios de clonación. Los análisis revelaron que el cDNA abarcaba la región de codificación completa del DNA que codifica zsig33.

### Ejemplo 2

Se llevaron a cabo transferencias Northern usando transferencias tisulares múltiples humanas y transferencias Master de RNA humano en forma de punto, de Clontech (Palo Alto, California, EE.UU.). La sonda era el oligonucleótido ZC12,494 (ID. SEC. n° 7), de aproximadamente 40 pares de bases (bp; del inglés, *base pairs*). La sonda fue terminalmente marcada utilizando polinucleótido quinasa de T4 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) y el tampón directo para polinucleótido quinasa de T4 (Life Technologies, Inc.). La sonda fue purificada usando columnas de empuje NUCRAP (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.). Se utilizó la disolución EXPRESSHYB (Clontech) para la prehibridación y como una disolución de hibridación para las transferencias Northern. La hibridación tuvo lugar a 42°C, y las transferencias se lavaron en SSC 2X y SDS al 0,05% a temperatura ambiental, lo que fue seguido de un lavado en SSC 1X y SDS al 0,1% a 71°C. Se observó un transcrito de aproximadamente 600 bp en forma de señal intensa en el estómago, viéndose señales más débiles en el páncreas y el intestino delgado.

## ES 2 317 664 T3

### Ejemplo 3

Se anestesiaron dos machos de rata Sprague-Dawley de aproximadamente 12 semanas de edad (Harlan, Indianapolis, Indiana, EE.UU.) con uretano y se expusieron sus estómagos por medio de una pequeña incisión abdominal. Se pusieron dos cristales transductores de 2,4 mm (Sonometrics, Ontario, Canadá) en la porción antral del estómago de modo que se pudieran determinar las contracciones circulares como un cambio en la distancia entre los dos cristales. Los cristales se fijaron con adhesivo tisular VETBOND (3M, St. Paul, Minnesota, EE.UU.).

Se aplicaron tópicamente 10  $\mu$ l de acetilcolina 1  $\mu$ M al estómago, entre los dos cristales, y resultó un aumento rápido, aunque transitorio, de la distancia entre los dos cristales. 10  $\mu$ l de norepinefrina (NE) en concentración 1  $\mu$ M causó una reducción de la distancia entre los dos cristales. La amplitud de la disminución provocada por NE era aproximadamente el 50% del aumento de distancia provocado por la acetilcolina. Ambas respuestas fueron transitorias.

Un testigo negativo de 10  $\mu$ l de disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) aplicada tópicamente entre los cristales no causó efecto alguno.

Se disolvió un péptido zsig33 de 14 aminoácidos [del resto de aminoácido 24 (Gly) al resto de aminoácido 37 (Gln) de la ID. SEC. n° 2] en PBS y se aplicaron tópicamente 10  $\mu$ l de la disolución para una concentración final de 1  $\mu$ g, 10  $\mu$ g o 100  $\mu$ g. El zsig33 en una cantidad de 1  $\mu$ g provocaba un aumento y una disminución rítmicos y continuos de la distancia entre cristales. Parecía que este efecto era dependiente de la dosis, con respuestas aumentadas tanto en frecuencia como en amplitud cuando se examinaron las contracciones con 10  $\mu$ g y 100  $\mu$ g.

### Ejemplo 4

Se adaptaron ocho hembras de ratón ob/ob de aproximadamente 6 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine, EE.UU.) a un programa de alimentación diario de 4 horas durante dos semanas. Después de dos semanas en el programa de alimentación, los ratones recibieron 100  $\mu$ g de un péptido zsig33 de 14 aminoácidos [del resto de aminoácido 24 (Gly) al resto de aminoácido 37 (Gln) de la ID. SEC. n° 2] en 100  $\mu$ l de BSA estéril al 0,1% mediante sonda gástrica oral inmediatamente después de su periodo de comida (posprandialmente). Treinta minutos más tarde, los ratones fueron estimulados oralmente con un volumen de 0,5 ml de glucosa al 25%. Se realizaron sangrías retroorbitales para determinar los niveles séricos de glucosa. Se extrajo sangre antes de la administración de zsig33, antes de la estimulación oral con glucosa, y 1, 2, 4 y 20 horas después de la estimulación con glucosa.

Cuando se administró oralmente el péptido zsig33 en una cantidad de 100  $\mu$ g 30 minutos antes de la estimulación oral con glucosa, se vio una absorción postprandial aumentada de glucosa.

### Ejemplo 5

Se sintetizó un péptido zsig33-1, correspondiente a del resto de aminoácido 24 (Gly) al resto de aminoácido 37 (Gln) de la ID. SEC. n° 2, mediante una síntesis peptídica en fase sólida utilizando el sintetizador peptídico modelo 431A (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, California, EE.UU.). Como resina de soporte inicial, se utilizó una resina de Fmoc-glutamina (0,63 milimoles/g; Advanced Chemtech, Louisville, Kentucky, EE.UU.). Para la síntesis se usaron cartuchos de 1 milimol de aminoácido (Anaspec, Inc, San Jose, California, EE.UU.). Como reactivos de síntesis se usó una mezcla de hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt), N,N-diisopropiletilamina, N-metilpirrolidona, diclorometano (todos de Applied Biosystems/Perkin Elmer) y piperidina (Aldrich Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.).

Se utilizó el software Peptide Companion (Peptides International, Louisville, Kentucky, EE.UU.) para predecir el potencial de agregación y el nivel de dificultad para la síntesis del péptido zsig33-1. La síntesis se llevó a cabo utilizando programas de copulación individuales de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

El péptido fue escindido de la fase sólida siguiendo el procedimiento estándar para escisión con TFA (de acuerdo con el manual para escisión de péptidos, Applied Biosystems/Perkin Elmer). La purificación del péptido se realizó por cromatografía de alta eficacia en estado líquido y fase inversa usando una columna C18 semipreparativa de 10  $\mu$ m (Vydac, Hesperial, California, EE.UU.). Se recogieron las fracciones eluidas de la columna y se analizaron en cuanto a una masa y una pureza correctas mediante espectrometría de masas con electropulverización. Se recogieron dos conjuntos del material eluido. Los resultados del análisis mediante espectrometría de masas indicaron que ambos conjuntos contenían la forma purificada de zsig33 con una masa de 1600 dáltones. Esta era la masa esperada, por lo que los conjuntos fueron combinados, congelados y liofilizados.

### Ejemplo 6

Se mapeó zsig33 en el cromosoma 3 utilizando el conjunto "GeneBridge 4" de híbridos por radiación (Research Genetics, Inc., Huntsville, Alabama, EE.UU.) comercialmente asequible. El conjunto GeneBridge 4 de híbridos por radiación contiene DNAs de cada uno de 93 clones híbridos por radiación, más dos DNAs testigo (el donante HFL y el receptor A23). Un servidor WWW públicamente disponible (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) permite mapear en relación con el Whitehead Institute/MIT Center en cuanto al mapa de

## ES 2 317 664 T3

híbridos por radiación del genoma humano del Genome Research (el mapa de híbridos por radiación del “WICGR”), que se construyó con el conjunto GeneBridge 4 de híbridos por radiación.

Para el mapeo de zsig33 con el conjunto “GeneBridge 4” de híbridos por radiación, se dispusieron 20  $\mu$ l de mezclas de reacción en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) y se utilizaron en un termociclador “RoboCycler Gradient 96” (Stratagene). Cada una de las 95 mezclas de reacción PCR consistía en 2  $\mu$ l de tampón KlenTaq 10X para reacciones PCR (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, California, EE.UU.), 1,6  $\mu$ l de mezcla de dNTPs (2,5 mM cada uno, Perkin-Elmer, Foster City, California, EE.UU.), 1  $\mu$ l de cebador sentido, ZC13,166 (ID. SEC. n° 8), 1  $\mu$ l de cebador antisentido, ZC13,167 (ID. SEC. n° 9), 2  $\mu$ l de “RediLoad” (Research Genetics, Inc., Huntsville, Alabama, EE.UU.), 0,4  $\mu$ l de mezcla de polimerasas Advantage KlenTaq 50X (Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng de DNA de un clon híbrido individual o de testigo, y ddH<sub>2</sub>O para un volumen total de 20  $\mu$ l. Las mezclas de reacción fueron cubiertas con una cantidad igual de aceite mineral y fueron selladas. Las condiciones del cicladador de PCR fueron las siguientes: 1 ciclo inicial de 5 minutos de desnaturalización a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de hibridación a 64°C y 1,5 minutos de extensión a 72°C, seguidos de 1 ciclo final de extensión de 7 minutos a 72°C. Las mezclas de reacción fueron sometidas a separación mediante electroforesis en un gel de agarosa NuSieve GTG al 3% (FMC Bioproducts, Rockland, Maine, EE.UU.).

Los resultados mostraron que zsig33 mapea a 10,43 cR\_3000 del marcador estructural AFMA216ZG1 en el mapa de híbridos por radiación del cromosoma 3 del WICGR. Los marcadores estructurales proximales y distales eran AFMA216ZG1 y D3S1263, respectivamente. La utilización de marcadores circundantes permite situar a zsig33 en la región 3p26.1 del mapa integrado del cromosoma 3 de la base de datos LDB (The Genetic Location Database, Universidad de Southampton, servidor WWW: [http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public\\_html/](http://cedar.genetics.soton.ac.uk/public_html/)).

### Ejemplo 7

Se evaluó el efecto del péptido zsig33 (aminoácidos 24 a 37 de la ID. SEC. n° 2), tópicamente aplicado, sobre el tránsito de rojo fenol a través de los estómagos de machos de rata Sprague-Dawley (Harlan, Indianápolis, Indiana, EE.UU.) en ayunas. Las ratas (6 animales de 8 semanas de edad) fueron dejadas en ayunas 24 horas antes de ser anestesiadas con uretano (0,5 ml/100 gramos de disolución al 25%). Tras ser anestesiados, los animales fueron sondados gástricamente a través de la boca con 1 ml de disolución de rojo fenol (50 mg/ml en una disolución de metilcelulosa al 2%).

Se expuso el estómago de cada animal por medio de una pequeña incisión abdominal y, cinco minutos después de la sonda, se aplicó tópicamente 1  $\mu$ g de péptido zsig33 o de un testigo de 14 aminoácidos de un péptido de secuencia mixta al estómago. La cantidad de rojo fenol que quedaba en el estómago fue determinada midiendo la densidad óptica del contenido del estómago extraído, 30 minutos después de la sonda.

El péptido zsig33 reducía la cantidad de rojo fenol que quedaba en el estómago en aproximadamente un 25% en comparación con el péptido mixto, lo que indica que el péptido zsig33 potenciaba el vaciamiento gástrico en esas ratas.

### Ejemplo 8

Se adaptaron dieciseis hembras de ratón ob/ob de 8 semanas de edad (Jackson Labs, Bar Harbor, Maine, EE.UU.) a un programa especial de alimentación diario de 4 horas durante dos semanas. Se dejó que se alimentaran diariamente *ad libitum* de 7:30 a 11:30 horas de la mañana. Después de dos semanas en el programa de alimentación, los ratones fueron divididos en dos grupos de 8. A un grupo se le administró 1,0  $\mu$ g de zsig33-1 (péptido de 14 aminoácidos)/ratón y al otro el vehículo (un péptido de secuencia mixta de 14 aminoácidos) en 100  $\mu$ l de BSQA estéril al 0,1% mediante sonda gástrica oral justo antes de recibir el alimento y al final del período de alimentación de 4 horas. Los ratones recibieron inyecciones dos veces al día durante catorce días, tiempo durante el cual se midieron diariamente la ingesta de alimentos y el peso corporal. El día 14, inmediatamente después de la segunda sonda gástrica oral con el péptido zsig33-1, se estimularon oralmente los ratones con un volumen de 0,5 ml de glucosa al 25%. Inmediatamente antes de la administración del péptido zsig33-1 o del vehículo (t = 30 minutos), y también 0, 1, 2 y 4 horas después de la estimulación con glucosa, se realizaron sangrías retroorbitales para determinar los niveles séricos de glucosa.

Los resultados indicaron que zsig33-1, cuando se administró oralmente en una cantidad de 1  $\mu$ g/ratón, no produjo efecto alguno sobre las mediciones diarias de peso corporal y de ingesta de alimentos, ni sobre el aclaramiento de glucosa según se determinó el día 14.

### Ejemplo 9

#### A. Transferencia Northern de tejido intestinal

Se preparó una transferencia Northern usando mRNA de las fuentes siguientes:

1. RNA de la línea celular SW480 de adenocarcinoma colorrectal humano (Clontech, Palo Alto, California, EE.UU.).

2. RNA de tejido de intestino delgado humano (Clontech).

3. RNA de tejido de estómago humano (Clontech).

4. Línea celular de músculo liso intestinal humano (Hism; ATCC n° CRL-1692; American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, EE.UU.).

5. Línea celular de colon humano normal (FHC; ATCC n° CRL-1831; American Type Culture Collection).

6. Línea celular de intestino delgado fetal normal humano (FHs74 Int.; ATCC n° CCL241; American Type Culture Collection).

Se aislaron los RNAs totales de Hism, FHC y FHs74 Int por el método del guanidinio-ácido (Chomczynski *et al.*, *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987). Se seleccionaron los RNAs poliA<sup>+</sup> eluyendo el RNA total a través de una columna que retiene RNAs poliA<sup>+</sup> (Aviv *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 69: 1408-1412, 1972). Se sometieron 2 µg de RNA poliA<sup>+</sup> de cada muestra a separación en un gel de agarosa al 1,5% en formaldehído 2,2 M y tampón de fosfato. Se transfirieron los RNAs a una membrana Nytran (Schleicher y Schuell, Keene, New Hampshire, EE.UU.) en SSC 20X durante la noche. Se trató la transferencia en el aparato UV Stratilinker 2400 (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) ajustado a 0,12 julios. Luego se trató la transferencia en una estufa a 80°C durante una hora.

Usando el cDNA de longitud completa (mostrado en la ID. SEC. n° 1) multiplicado por PCR, se radiomarcaron aproximadamente 50 ng de DNA de zsig33 y 42,5 µl de agua con <sup>32</sup>P-dCTP usando un kit de glóbulos Rediprime (Amersham, Arlington Heights, Illinois, EE.UU.) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se hibridó la transferencia en EXPRESSHYB (Clontech) a 55°C durante la noche. Se lavó la transferencia a temperatura ambiental en SSC 2X y SDS al 0,1%, luego a 65°C en SSC 2X y SDS al 0,1%, y finalmente a 65°C en SSC 0,1X y SDS al 0,1%. Los resultados mostraron que zsig33 se hibridaba con RNA estomacal y no con otros RNAs de otros orígenes tisulares.

#### B. Transferencia Northern de tumor

Se analizaron una Transferencia II de un conjunto de tumores humanos - Northern Territory<sup>TM</sup> (Invitrogen, San Diego, California, EE.UU.) y una Transferencia de un conjunto de tumores de estómago humanos - Northern Territory<sup>TM</sup> (Invitrogen) en cuanto a los patrones de expresión de RNA de zsig33.

La transferencia del conjunto de tumores humanos contenía 20 µg de RNA total por carril y fue desarrollada en un gel desnaturizante de formaldehído al 1%. La transferencia contenía RNA de tumor esofágico, esófago normal, tumor de estómago, estómago normal, tumor de colon, colon normal, tumor rectal y recto normal. La transferencia del conjunto de tumores de estómago contenía RNA total aislado de tejidos tumorales y normales humanos de cuatro donantes diferentes. Se utilizaron 20 µg de RNA en cada carril de muestra, y en los carriles se alternaba un grupo normal y tumoral de cada donante.

Se prepararon sondas que eran el oligonucleótido ZC12,494 (ID. SEC. n° 7) de aproximadamente 40 bp. Las sondas fueron terminalmente marcadas usando polinucleótido quinasa de T4 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland, EE.UU.) y el tampón directo para polinucleótido quinasa de T4 (Life Technologies, Inc.). Las sondas fueron purificadas usando columnas de empuje NUCTRAP (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.). Tanto la transferencia de tumores como la transferencia de estómago fueron tratadas de la misma manera. Se utilizó la disolución EXPRESSHYB (Clontech) para la prehibridación y como una disolución de hibridación para las transferencias Northern. La hibridación tuvo lugar a 42°C, y las transferencias se lavaron en SSC 0,1X y SDS al 0,01% a 60°C, lo que fue seguido de un lavado en SSC 0,1X y SDS al 0,1% a 70°C. Los resultados indican claramente que zsig33 se expresa exclusivamente en tejido normal de estómago tanto en el conjunto de tumores humanos como en el conjunto de tumores de estómago humanos.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula polipeptídica aislada que comprende una secuencia polipeptídica seleccionada del grupo que  
5 consiste en:

(a) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº  
2, del resto 24 al resto 37;

10 (b) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº  
2, del resto 24 al resto 41;

(c) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº  
2, del resto 24 al resto 117;

15 (d) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº  
2, del resto 1 al resto 37; y

20 (e) una secuencia polipeptídica que consiste en una secuencia de aminoácidos como la mostrada en la ID. SEC. nº  
2, del resto 1 al resto 117;

polipéptido que es capaz de estimular la motilidad gástrica o la absorción de glucosa.

2. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 1, en  
25 combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. Una molécula polinucleotídica aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que  
consiste en:

30 (a) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido  
70 al nucleótido 111;

(b) secuencias nucleotídicas degeneradas de (a);

35 (c) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido  
70 al nucleótido 120;

(d) secuencias nucleotídicas degeneradas de (c);

40 (e) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido  
70 al nucleótido 351;

(f) secuencias nucleotídicas degeneradas de (e);

45 (g) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido  
1 al nucleótido 111;

(h) secuencias nucleotídicas degeneradas de (g); y

50 (i) la secuencia de nucleótidos que consiste en una secuencia como la mostrada en la ID. SEC. nº 1, del nucleótido  
1 al nucleótido 351;

polinucleótido que codifica un polipéptido capaz de estimular la motilidad gástrica o la absorción de glucosa.

55 4. El polinucleótido aislado de la Reivindicación 3, en que el polinucleótido es DNA.

5. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente unidos:

un promotor de transcripción;

60 un polinucleótido de acuerdo con la Reivindicación 3; y

un terminador de transcripción.

65 6. Una célula en cultivo en la que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 5,  
célula que expresa el polipéptido codificado por el polinucleótido.

7. Un método para producir un polipéptido, que comprende:

cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 5, por lo que dicha célula expresa un polipéptido codificado por el segmento de DNA; y

recuperar el polipéptido.

8. Uso de un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el polipéptido consiste en los restos 24 a 37 de la ID. SEC. nº 2, para la fabricación de un medicamento para estimular la motilidad gástrica, polipéptido que, en uso, aumenta el tiempo de tránsito o el vaciamiento gástrico de una sustancia ingerida.

9. Uso de la Reivindicación 8, en el que se mide el tiempo de tránsito o el vaciamiento gástrico utilizando una sustancia radiomarcada.

10. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 2 o a un fragmento de dicho polipéptido, en el que el fragmento consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) del resto 24 al resto 117 de la ID. SEC. nº 2; y

(b) del resto 24 al resto 37 de la ID. SEC. nº 2.

11. El anticuerpo de la Reivindicación 10, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

12. Un método para producir un anticuerpo, que comprende las operaciones siguientes: inocular en un animal un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 2, de los restos 24 a 117; y

(b) un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 2, de los restos 24 a 37;

en el que el polipéptido provoca una respuesta inmune en el animal para producir el anticuerpo, y aislar el anticuerpo del animal.

13. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de los restos de aminoácido 24 a 117 de la ID. SEC. nº 2.

14. El anticuerpo de la Reivindicación 13, en que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15. Un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que el polipéptido consiste en los restos 24 a 37 de la ID. SEC. nº 2, para estimular la motilidad gástrica, polipéptido que, en uso, aumenta el tiempo de tránsito o el vaciamiento gástrico de una sustancia ingerida.

# ES 2 317 664 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL

(i) SOLICITANTE: ZymoGenetics, Inc.  
1201 Eastlake Avenue East  
Seattle  
WA  
USA  
98102

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: HOMÓLOGOS DE MOTILINA

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7

(iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

(A) DESTINATARIO: ZymoGenetics, Inc.

(B) CALLE: 1201 Eastlake Avenue East

(C) CIUDAD: Seattle

(D) ESTADO: WA

(E) PAÍS: USA

(F) ZIP: 98102

(v) FORMA DE LECTURA DE ORDENADOR:

(A) TIPO DE MEDIO: Diskette

(B) ORDENADOR: IBM Compatible

(C) SISTEMA OPERATIVO: DOS

(D) SOFTWARE: FastSEQ PARA Windows, Versión 2.0

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE SOLICITUD:

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE SOLICITUR PRIORITARIA:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE SOLICITUD:

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

(A) NOMBRE: Sawislak, Deborah A

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 37.438

(C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 97-04PC

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

(A) TELÉFONO: 206-442-6672

(B) TELEFAX: 206-442-6678

(C) TELEX:

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 351 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

## ES 2 317 664 T3

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Secuencia Codificante

(B) LOCALIZACIÓN: 1...351

(D) OTRA INFORMACIÓN:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido señal

(B) LOCALIZACIÓN: 1...69

(D) OTRA INFORMACIÓN:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido maduro

(B) LOCALIZACIÓN: 70...351

(D) OTRA INFORMACIÓN:

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

|    |                                                                                                                                    |     |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 20 | ATG CCC TCC CCA GGG ACC GTC TGC AGC CTC CTG CTC CTC GGC ATG CTC<br>Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu | 48  |
|    | 1                      5                      10                      15                                                           |     |
| 25 | TGG CTG GAC TTG GCC ATG GCA GGC TCC AGC TTC CTG AGC CCT GAA CAC<br>Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His | 96  |
|    | 20                      25                      30                                                                                 |     |
| 30 | CAG AGA GTC CAG CAG AGA AAG GAG TCG AAG AAG CCA CCA GCC AAG CTG<br>Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu | 144 |
|    | 35                      40                      45                                                                                 |     |
| 40 | CAG CCC CGA GCT CTA GCA GGC TGG CTC CGC CCG GAA GAT GGA GGT CAA<br>Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln | 192 |
|    | 50                      55                      60                                                                                 |     |
| 45 | GCA GAA GGG GCA GAG GAT GAA CTG GAA GTC CGG TTC AAC GCC CCC TTT<br>Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe | 240 |
|    | 65                      70                      75                      80                                                         |     |
| 50 | GAT GTT GGA ATC AAG CTG TCA GGG GTT CAG TAC CAG CAG CAC AGC CAG<br>Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln | 288 |
|    | 85                      90                      95                                                                                 |     |
| 55 | GCC CTG GGG AAG TTT CTT CAG GAC ATC CTC TGG GAA GAG GCC AAA GAG<br>Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu | 336 |
|    | 100                      105                      110                                                                              |     |
| 60 | GCC CCA GCC GAC AAG<br>Ala Pro Ala Asp Lys                                                                                         | 351 |
|    | 115                                                                                                                                |     |

## ES 2 317 664 T3

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 117 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interna

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

```

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

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln
 85          90          95
Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu
100          105          110
Ala Pro Ala Asp Lys
115

```

### (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 546 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

#### (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Secuencia Codificante

(B) LOCALIZACIÓN: 40...396

(D) OTRA INFORMACIÓN:

## ES 2 317 664 T3

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

|    |                                                                   |     |
|----|-------------------------------------------------------------------|-----|
| 5  | GGGCAGAGAC ACACACGCGC CCAGTTGTCC AGCTCCAGG ATG GTG TCC CGC AAG    | 54  |
|    | Met Val Ser Arg Lys                                               |     |
|    | 1 5                                                               |     |
| 10 | GCT GTG GTC GTC CTG CTG GTG GTG CAC GCA GCT GCC ATG CTG GCC TCC   | 102 |
|    | Ala Val Val Val Leu Leu Val Val His Ala Ala Ala Met Leu Ala Ser   |     |
|    | 10 15 20                                                          |     |
| 15 | CAC ACG GAA GCC TTT GTT CCC AGC TTT ACC TAC GGG GAA CTT CAG AGG   | 150 |
|    | His Thr Glu Ala Phe Val Pro Ser Phe Thr Tyr Gly Glu Leu Gln Arg   |     |
|    | 25 30 35                                                          |     |
| 20 | ATG CAG GAA AAG GAG CGG AAT AAA GGG CAA AAG AAA TCC CTG AGT GTC   | 198 |
|    | Met Gln Glu Lys Glu Arg Asn Lys Gly Gln Lys Lys Ser Leu Ser Val   |     |
|    | 40 45 50                                                          |     |
| 25 | CAG CAG GCG TCG GAG GAG CTC GGC CCT CTG GAC CCC TCG GAG CCC ACG   | 246 |
|    | Gln Gln Ala Ser Glu Glu Leu Gly Pro Leu Asp Pro Ser Glu Pro Thr   |     |
|    | 55 60 65                                                          |     |
| 30 | AAG GAA GAA GAA AGG GTG GTT ATC AAG CTG CTC GCG CCT GTG GAC ATT   | 294 |
|    | Lys Glu Glu Glu Arg Val Val Ile Lys Leu Leu Ala Pro Val Asp Ile   |     |
|    | 70 75 80 85                                                       |     |
| 35 | GGA ATC AGG ATG GAC TCC AGG CAG CTG GAA AAG TAC CGG GCC ACC CTG   | 342 |
|    | Gly Ile Arg Met Asp Ser Arg Gln Leu Glu Lys Tyr Arg Ala Thr Leu   |     |
|    | 90 95 100                                                         |     |
| 40 | GAA AGG CTG CTG GGC CAG GCG CCG CAG TCC ACC CAG AAC CAG AAT GCC   | 390 |
|    | Glu Arg Leu Leu Gly Gln Ala Pro Gln Ser Thr Gln Asn Gln Asn Ala   |     |
|    | 105 110 115                                                       |     |
| 45 | GCC AAG TAACAGGCCG CTGGGGGAGA AGGAGGACAC AGCTCGGACC CCCCTCCCAC GC | 448 |
|    | Ala Lys                                                           |     |
| 50 | AGGGAGGGCC TAGAAATCCG CTGGGCTTGG AAGGAAAACA CCCTCTCCCA AACAGCCCTC | 508 |
|    | AGCCCCCTC CCCCAGCAAA TAAAGCGTGG AAATAGGC                          | 546 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 119 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) HEBRA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interna

## ES 2 317 664 T3

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

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

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 40 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) HEBRA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Otra

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: ZC12494

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

TTCTTCGACT CCTTTCTCTG CTGGACTCTC TGGTGTTTCAG

40

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos  
(B) TIPO: aminoácido  
(C) HEBRA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: NINGUNA

(xi) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

65 Glu Xaa Gln Arg Xaa Gln  
1 5

## ES 2 317 664 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) HEBRA: sencilla
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Ninguna

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

15 Ala Pro Xaa Asp Xaa Gly Ile  
1 5

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65