



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 300 154**

⑯ Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)

**C07K 14/495** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/42** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **99969114 .0**

⑯ Fecha de presentación : **17.09.1999**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1114156**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **11.07.2001**

④ Título: **Factor de crecimiento de transformación  $\beta$ -9 en mamíferos (Ztgfss9).**

⑩ Prioridad: **17.09.1998 US 154817**

⑬ Titular/es: **ZymoGenetics, Inc.**  
**1201 Eastlake Avenue East**  
**Seattle, Washington 98102, US**

④ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.06.2008**

⑦ Inventor/es: **Presnell, Scott, R.;**  
**Taft, David, W. y**  
**Foley, Kevin, P.**

④ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.06.2008**

⑭ Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 300 154 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Factor de crecimiento de transformación  $\beta$ -9 en mamíferos (Ztgfss9).

## 5 Antecedentes de la invención

El control adecuado de los procesos opuestos de proliferación celular en comparación con diferenciación terminal y muerte celular programada apoptótica es un aspecto importante del desarrollo normal y la homeostasis, Raff, M.C., *Cell*, 86:173-175 (1996), y se ha determinado que se encuentra alterado en numerosas enfermedades humanas. Véase, por ejemplo, Sawyers, C.L. *et al.*, *Cell*, 64:337-350 (1991); Meyaard, L. *et al.*, *Science*, 257:217-219 (1992); Guo, Q. *et al.*, *Nature Med.*, 4:957-962 (1998); Barinaga, M. *Science*, 273:735-737 (1996); Solary, E. *et al.*, *Eur. Respir. J.*, 9:1293-1305 (1996); Hamet, P. *et al.*, *J. Hypertension*, 14:S65-S70, (1996); Roy, N. *et al.* *Cell*, 80:167-178 (1995); y Ambrosini, G., *Nature Med.*, 8:917-921 (1997). Se han logrado muchos avances en la comprensión de la regulación de este equilibrio. Por ejemplo, se han dilucidado las cascadas de señalización a través de las cuales los estímulos extracelulares, tales como los factores de crecimiento, las hormonas peptídicas y las interacciones celulares, controlan el compromiso de las células precursoras respecto de linajes específicos y su expansión proliferativa posterior, Morrison, S.J. *et al.*, *Cell*, 88:287-298 (1997). Asimismo, se ha determinado que la salida del ciclo celular y la diferenciación terminal se encuentran acopladas en la mayoría de los tipos celulares. Véase, por ejemplo, Coppola, J.A. *et al.* *Nature*, 320:760-763 (1986); Freytag, S.O., *Mol. Cell. Biol.* 8:1614-1624 (1988); Lee, E.Y. *et al.*, *Genes Dev.*, 8:2008-2021 (1994); Morgenbesser, S.D., *et al.*, *Nature*, 371:72-74 (1994); Casaccia-Bonelli, P. *et al.*, *Genes Dev.*, 11:2335-2346 (1996); Zackenhaus, E. *et al.*, *Genes Dev.*, 10:3051-3064 (1996); y Zhang, P. *et al.*, *Nature*, 387:151-158 (1997). La apoptosis (muerte celular programada) también desempeña una función importante en muchos procesos homeostáticos y de desarrollo, Raff, M.C., *Nature*, 356:397-400 (1992), y, por lo general, se encuentra regulada en forma coordinada con la diferenciación terminal, Jacobsen, K.A. *et al.*, *Blood*, 84:2784-2794 (1994); Yan, Y. *et al.*, *Genes Dev.*, 11:973-983 (1997). Por lo tanto, parece ser que el tipo celular de los linajes, tejidos, órganos o incluso organismos multicelulares enteros individuales es el resultado de un equilibrio bien ajustado entre el aumento de la producción de células debido a la proliferación y la reducción de la cantidad de células como consecuencia de la diferenciación terminal y la apoptosis. Este equilibrio se regula, probablemente, en forma coordinada a través de la convergencia de vías reguladoras múltiples. La identificación de miembros nuevos de dichas redes puede aportar importantes perspectivas sobre los procesos celulares normales y la etiología y el tratamiento de estados humanos patológicos.

La interleucina 17 (IL-17) es una citocina que, según se ha determinado, es un regulador importante del sistema inmunitario, Spriggs, M.K., *J. Clinical Immunology*, 17:366-369 (1997), Broxmeyer, H.E., *J. Experimental Medicine*, 183:2411-2415 (1996), Yao, Z., *et al.*, *J. Immunology*, 155:5483-5486 (1995), Yao, Z., *et al.*, *Immunity*, 3:811-821 (1995). La IL-17 humana es casi exclusivamente producida por las células T CD4+ de memoria activadas (sin embargo, en ratones, las células T CD4-/CD8- también expresan la IL-17), Aarvak, T., *et al.*, *J. Immunology*, 162:1246-1251 (1999), Kennedy, J., *et al.*, *J. Interferon Cytokine Research*, 16:611-617 (1996). En contraposición, el receptor de la IL-17 (IL-17R) parece ser expresado de manera ubicua, Yao, Z., *et al.*, *Immunity*, 3:811-821 (1995). La IL-17 induce la secreción de IL-6, IL-8, péptido quimiotáctico de monocitos 1 y el factor estimulante de colonias de granulocitos (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) a partir de una serie de diferentes tipos de células estromales, pero no tiene ningún efecto en la producción de citocinas por parte de las células linfoides, Teunissen, M.B.M., *J. Investigative Dermatology*, 111:645-649 (1998), Jovanovic, D.V., *et al.*, *J. Immunology*, 160:3513-3521 (1998), Chabaud, M., *et al.*, *J. Immunology*, 161:409-414 (1998), Cai, X.-Y., *et al.*, *Immunology Letters*, 62:51-58 (1998), Fossiez, F., *et al.*, *J. Experimental Medicine*, 183:2593-2603 (1996). La IL-17 también potencia la expresión de las moléculas de adhesión intercelular 1 (intercellular adhesion molecule -1, ICAM-1) en los fibroblastos y puede estimular la granulopoyesis, Schwarzenberger P., *et al.*, *J. Immunology*, 161:6383-9 (1998). Consideradas en conjunto, estas observaciones han sugerido que la IL-17 funciona como citocina proinflamatoria. La IL-17 también promueve la diferenciación de las células dendríticas, la osteoclastogénesis, puede inducir la producción de óxido nítrico en cartílago humano con artrosis, y se encuentra presente en los líquidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoidea, Antonysamy, M.A., *et al.*, *J. Immunology*, 162:577-584 (1999), Kotake, S., *et al.*, *J. Clinical Investigation*, 103:1345-1352, (1999), Attur, M.G., *et al.*, *Arthritis & Rheumatism*, 40:1050-1053 (1997). Se determinó que el bloqueo de la IL-17 con una proteína IL-17R soluble suprime el rechazo de aloinjertos cardíacos, lo cual se correlacionaba con un aumento del ARNm de la IL-17 en las biopsias de riñón en humanos con rechazo de aloinjertos renales, Antonysamy, M.A., *et al.*, *J. Immunology*, 162:577-584 (1999). El aumento de la expresión del ARNm de la IL-17 también se observa en humanos con esclerosis múltiple, Matusevicius, D. *et al.*, *Multiple Sclerosis*, 5:101-104 (1999). Asimismo, la IL-17 puede promover la tumorigenidad de tumores humanos de cuello uterino en ratones desnudos, Tartour, E. *et al.*, *Cancer Res.*, 59:3698-36704 (1999). Por lo tanto, la IL-17 parece desempeñar una función esencial en la regulación del sistema inmunitario y los procesos inflamatorios.

60 Por ende, existe una necesidad continua de descubrir nuevas proteínas relacionadas con la proliferación, la diferenciación y las vías apoptóticas. Las actividades *in vivo* de los inductores e inhibidores de estas vías ejemplifican el enorme potencial clínico y la necesidad de nuevas proteínas de proliferación, diferenciación y apoptóticas, sus agonistas y antagonistas. También se necesita descubrir nuevos agentes que presentan actividad antiviral.

65 La WO 00/42188 describe antígenos de mamíferos relacionados con el antígeno 8 asociado a linfocitos T citotóxicos (cytotoxic T lymphocyte-associated, CTLA), reactivos relacionados con dichos antígenos, que incluyen proteínas purificadas, anticuerpos específicos y ácidos nucleicos que codifican dichos antígenos, métodos para utilizar dichos reactivos y equipos de diagnóstico.

# ES 2 300 154 T3

La WO 99/61617 describe las Interleucinas 21 y 22 y los polinucleótidos aislados que codifican estos polipéptidos.

La presente invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9, SEC. ID. N.º 12, SEC. ID. N.º 17 y SEC. ID. N.º 18, o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC. ID. N.º 15 y la SEC. ID. N.º 21.

La presente invención también proporciona un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9, SEC. ID. N.º 12, SEC. ID. N.º 17 y SEC. ID. N.º 18, o que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC. ID. N.º 15 y la SEC. ID. N.º 21.

La presente invención además proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5.

Por ende, la presente invención proporciona un polipéptido antiviral llamado "factor de crecimiento de transformación beta 9", en adelante denominado Ztgf  $\beta$ -9. Este polipéptido posee actividad antiviral, según se divulga en el Ejemplo 10, a continuación. También puede utilizarse para regular la proliferación, diferenciación y apoptosis de neuronas, células gliales, linfocitos, células hematopoyéticas y células estromales.

La secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 contiene un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de alrededor de 202 aminoácidos con la Met inicial como se muestra en la SEC. ID. N.º 1 y la SEC. ID. N.º 2. Una secuencia señal predicha está compuesta por residuos de aminoácidos 1, una metionina y se extiende hasta el residuo de aminoácido 15, una alanina, incluido. De esta forma, una secuencia madura que excluya la secuencia señal se extiende desde el residuo de aminoácido 16, una alanina, hasta el residuo de aminoácido 202, una prolina, incluido, de la SEC. ID. N.º 2. Esta secuencia madura también está representada por la SEC. ID. N.º 3. En una realización alternativa, la secuencia señal se extiende hasta el residuo de aminoácido 16, una alanina, incluido. Esto produce una secuencia madura que se extiende desde el aminoácido 17, una glicina, hasta el residuo de aminoácido 202, una prolina, incluido, de la SEC. ID. N.º 2. Esta secuencia madura también se encuentra representada por la SEC. ID. N.º 4. En otra realización alternativa, la secuencia señal se extiende hasta el residuo de aminoácido 17, una glicina, incluido. Esto tiene como consecuencia una secuencia madura que se extiende desde el residuo de aminoácido 18, una alanina, hasta el residuo de aminoácido 202, una prolina, incluido, de la SEC. ID. N.º 2. Esta secuencia madura se encuentra, además, representada por la SEC. ID. N.º 5. Otra variante del Ztgf $\beta$ -9 se divulga en las SEC. ID. N.º 16 y 17. La secuencia madura se extiende desde el residuo de aminoácido 23, una alanina, hasta el residuo de aminoácido 209, una prolina, incluido. La secuencia madura también se define en la SEC. ID. N.º 18.

El Ztgf $\beta$ -9 murino se define en las SEC. ID. N.º 8 y 9. La secuencia señal se extiende desde la metionina en la posición 1 hasta la alanina en la posición 22. De esta forma, la secuencia madura se extiende desde la alanina en la posición 23 de la SEC. ID. N.º 9 hasta la arginina en la posición 205. La secuencia madura se encuentra, además, representada por la SEC. ID. N.º 12.

Una realización adicional de la presente invención se relaciona con un péptido o polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de una porción portadora de epítopos de un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 con una secuencia de aminoácidos descrita anteriormente. Los péptidos o polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de una porción portadora de epítopos de un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 de la presente invención incluyen porciones de dichos polipéptidos con, al menos, nueve, preferentemente, al menos, 15 y más preferentemente, al menos, 30 a 50 aminoácidos, aunque también se incluyen en la presente invención los polipéptidos portadores de epítopos de cualquier longitud hasta, inclusive, la totalidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la presente invención que se describió anteriormente. Los ejemplos de dichos polipéptidos portadores de epítopos incluyen las SEC. ID. N.º 15 y 21. También se reivindica cualquiera de estos polipéptidos que están fusionados con otro polipéptido o molécula transportadora. También se reivindica un ácido nucleico aislado que codifica una porción portadora de epítopos de un polipéptido Ztgf $\beta$ -9.

La presente invención también comprende un polipéptido o un péptido aislados de los péptidos descritos anteriormente. Los polipéptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos modificada por adición, eliminación y/o reemplazo de uno o más residuos de aminoácidos y que mantiene la actividad biológica de dicho péptido o polipéptido.

Dentro de un aspecto adicional de la invención se contempla un polipéptido quimérico que consiste, esencialmente, en una primera porción y una segunda porción unidas por una unión peptídica. La primera porción del polipéptido quimérico consiste, esencialmente, en (a) un polipéptido Ztgf $\beta$ -9, como se describió anteriormente; (b) variantes alélicas de los polipéptidos descritos anteriormente. La segunda porción del polipéptido quimérico consiste, esencialmente, en otro polipéptido como, por ejemplo, una etiqueta de afinidad. En una aplicación, la etiqueta de afinidad es un polipéptido F<sub>c</sub> de inmunoglobulina. La invención también contempla vectores de expresión que codifican los polipéptidos quiméricos y las células huésped transfectadas para producir los polipéptidos quiméricos.

Otro aspecto de la presente invención contempla moléculas de ácido nucleico aisladas que comprenden un polinucleótido seleccionado a partir del grupo que consiste en: (a) una secuencia de nucleótidos que codifica los polipéptidos

Ztgf $\beta$ -9 descritos anteriormente; y (b) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de las secuencias de nucleótidos del punto (a).

Las moléculas de ácido nucleico aisladas pueden comprender un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos homóloga en, al menos, un 90% y, más preferentemente, en un 95%, 97%, 98% ó 99%, a cualquiera de las secuencias mencionadas en los puntos anteriores (a) o (b), o un polinucleótido que hibrida, en condiciones de hibridación rigurosas, a un polinucleótido con una secuencia de nucleótidos mencionada en los puntos anteriores (a) o (b).

Los polipéptidos aislados pueden tener una secuencia de aminoácidos idéntica en, al menos, un 90% y, más preferentemente, en un 95%, 97%, 98% o 99%, a cualquiera de los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9 y los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos.

En otro aspecto de la invención, se contempla un vector de expresión que comprende (a) un promotor de la transcripción; (b) un segmento de ADN que codifica un polipéptido descrito anteriormente, y (c) un terminador de la transcripción, donde el promotor, el segmento de ADN y el terminador están operablemente ligados.

En un tercer aspecto de la invención, se contempla una célula eucariota cultivada en la que se ha introducido un vector de expresión tal como se ha divulgado anteriormente, donde dicha célula expresa un polipéptido de una proteína codificada por el segmento de ADN.

En otra aplicación de la presente invención se encuentra un anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en, al menos, un 90% a la secuencia de aminoácidos seleccionada de una de las SEC. ID. N.º 2-5. También se reivindica un método para producir dichos anticuerpos, que comprende la inoculación de un mamífero con un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en, al menos, un 90% a la secuencia de aminoácidos seleccionada de una de las SEC. ID. N.º 2-5 de manera que el mamífero produzca anticuerpos contra el polipéptido; y el aislamiento de dichos anticuerpos.

Estos aspectos de la invención, así como otros aspectos, se tornarán evidentes al consultar la descripción detallada que sigue a continuación.

En la siguiente descripción, se utilizan con frecuencia una serie de términos. Se proporcionan las siguientes definiciones para facilitar la comprensión de la invención.

Tal como se usa en la presente, los términos “ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refieren a polinucleótidos, tales como ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN), oligonucleótidos, fragmentos generados por la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) y fragmentos generados por cualquier ligadura, escisión, acción de endonucleasas y acción de exonucleasas. Las moléculas de ácido nucleico pueden estar compuestas por monómeros que son nucleótidos naturales (tales como el ADN y el ARN) o análogos de nucleótidos naturales (p. ej. formas  $\alpha$ : enantioméricas de nucleótidos naturales) o una combinación de ambos. Los nucleótidos modificados pueden tener alteraciones en las fracciones de azúcares y/o en las fracciones de las bases pirimidínica o purínica. Las modificaciones de los azúcares incluyen, por ejemplo, el reemplazo de uno o más grupos hidroxilo por halógenos, grupos alquilo, aminas y grupos azido, o bien los azúcares pueden estar funcionalizados como éteres o ésteres. Además, la totalidad de la fracción de azúcar puede reemplazarse por estructuras estérica y electrónicamente similares, por ejemplo, aza-azúcares y análogos carbocíclicos de azúcares. Ejemplos de modificaciones en la fracción de una base incluyen purinas y pirimidinas alquiladas, purinas o pirimidinas aciladas u otros sustitutos heterocíclicos bien conocidos. Los monómeros de ácido nucleico pueden ligarse mediante uniones fosfodiéster o análogos de dichos enlaces. Los análogos de los enlaces fosfodiéster incluyen fósforotioato, fósforoditioato, fósforoselenoato, fósforodiselenoato, fósforoanilotioato, fósforoanilidato, fósforoamidato y similares. El término “molécula de ácido nucleico” también incluye los llamados “ácidos nucleicos peptídicos”, que comprenden bases de ácidos nucleicos naturales o modificados unidas a un esqueleto poliamídico. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

El término “complemento de una molécula de ácido nucleico” se refiere a una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria y orientación inversa en comparación con una secuencia de nucleótidos de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de la 5' CCCGTGCAT 3'.

El término “contig” denota una molécula de ácido nucleico que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntica o complementaria a otra molécula de ácido nucleico. Se dice que las secuencias contiguas se “superponen” con un tramo determinado de una molécula de ácido nucleico en su totalidad o a lo largo de un tramo parcial de la molécula de ácido nucleico.

El término “secuencia de nucleótidos degenerada” denota una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados en comparación con una molécula de ácido nucleico de referencia que codifica un polipéptido. Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos, pero codifican el mismo residuo de aminoácidos (es decir, tanto el triplete GAU como el GAC codifican Asp).

El término “gen estructural” se refiere a una molécula de ácido nucleico transcrita a ARN mensajero (ARNm), que luego se traduce en una secuencia de aminoácidos característica de un polipéptido específico.

## ES 2 300 154 T3

Una “molécula de ácido nucleico aislada” es una molécula de ácido nucleico que no está integrada en el ADN genómico de un organismo. Por ejemplo, una molécula de ADN que codifica un factor de crecimiento que ha sido separada del ADN genómico de una célula es una molécula de ADN aislada. Otro ejemplo de una molécula de ácido nucleico aislada es una molécula de ácido nucleico sintetizada químicamente que no está integrada en el genoma de un organismo. Una molécula de ácido nucleico que ha sido aislada de una especie en particular es más pequeña que la molécula de ADN completa de un cromosoma de dicha especie.

Un “constructo de una molécula de ácido nucleico” es una molécula de ácido nucleico, mono o bicanteraria, que ha sido modificada mediante intervención humana para que contenga segmentos de ácido nucleico combinados y 10 yuxtapuestos en un arreglo que no existe en la naturaleza.

“ADN lineal” denota moléculas de ADN no circular que tienen extremos 5’ y 3’ libres. El ADN lineal se puede preparar a partir de moléculas de ADN circular cerradas, tales como plásmidos, por digestión enzimática o alteración física.

15 “ADN complementario (ADNc)” es una molécula de ADN monocatenaria formada a partir de una plantilla de ARNm por la enzima transcriptasa inversa. Típicamente, se utiliza un cebador complementario a las porciones de ARNm para el inicio de la transcripción inversa. Los especialistas en la materia también usan el término “ADNc” para referirse a una molécula de ADN bicanteraria que consiste en esa molécula de ADN monocatenaria y su cadena de 20 ADN complementaria. El término “ADNc” también se refiere a un clon de una molécula de ADNc sintetizado a partir de una plantilla de ARN.

25 Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que dirige la transcripción de un gen estructural. Habitualmente, un promotor está ubicado en la región 5’ no codificante de un gen, en posición proximal al sitio de inicio de la transcripción de un gen estructural. Los elementos de la secuencia dentro de los promotores que funcionan en el inicio de la transcripción a menudo se caracterizan por secuencias de nucleótidos consenso. Estos elementos de los promotores incluyen sitios de unión a la ARN polimerasa, secuencias TATA, secuencias CAAT, elementos específicos de diferenciación (differentiation-specific element, DSE; McGhee *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 7:551 (1993)), elementos de respuesta al AMP cíclico (cyclic AMP response elements, CRE), elementos de respuesta al suero (serum response elements, SRE; Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1:47 (1990)), elementos de respuesta a glucocorticoides (glucocorticoid response elements, GRE) y sitios de unión para otros factores de transcripción como CRE/ATF (O'Reilly *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:19938 (1992)), AP2 (Ye *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:25728 (1994)), SP1, proteína de unión a 30 elementos de respuesta al AMPc (cAMP response element binding protein, CREB; Loeken, *Gene Expr.* 3:253 (1993)) y octámeros (véase, en general, Watson *et al.*, ed., *Molecular Biology of the Gene*, 4.<sup>a</sup> ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), y Lemaigre y Rousseau, *Biochem. J.* 303:1 (1994)). Si un promotor es un promotor inducible, la tasa de transcripción aumenta en respuesta a un agente inductor. En contraposición, la tasa de transcripción no es regulada por un agente inductor si el promotor es un promotor constitutivo. También se conocen los promotores reprimibles.

40 Un “promotor central” contiene secuencias de nucleótidos esenciales para la función del promotor incluida la caja TATA y el inicio de la transcripción. Según esta definición, el promotor central puede o no tener actividad detectable en ausencia de secuencias específicas que pueden potenciar la actividad o conferir actividad específica para determinados tejidos.

45 Un “elemento regulador” es una secuencia de nucleótidos que modula la actividad de un promotor central. Por ejemplo, un elemento regulador puede contener una secuencia de nucleótidos que se une a factores celulares que permiten la transcripción en determinadas células, tejidos u organelas, de manera exclusiva o preferencial. Estos tipos de elementos reguladores normalmente se asocian con genes expresados en una forma “específica para una célula”, “específica para un tejido” o “específica para una organela”. Por ejemplo, el elemento regulador del Ztgf $\beta$ -9 induce 50 preferentemente la expresión génica en el cerebro, la médula espinal, el corazón, el músculo esquelético, el estómago, el páncreas, la glándula suprarrenal, la glándula salival, el hígado, el intestino delgado, la médula ósea, el timo, el bazo, los ganglios linfáticos, el corazón, la tiroide, la tráquea, los testículos, los ovarios y la placenta.

55 Un “potenciador” es un tipo de elemento regulador que puede aumentar la eficiencia de la transcripción, independientemente de la distancia o la orientación del potenciador en relación con el sitio de inicio de la transcripción.

“ADN heterólogo” se refiere a una molécula de ADN o a una población de moléculas de ADN que no existe naturalmente dentro de una célula huésped dada. Las moléculas de ADN heterólogo para una célula huésped en particular pueden contener ADN derivado de la especie de la célula huésped (es decir, ADN endógeno) en tanto y 60 en cuanto el ADN de la célula huésped esté combinado con ADN que no pertenece a la célula huésped (es decir, ADN exógeno). Por ejemplo, una molécula de ADN que contiene un segmento de ADN que no pertenece a la célula huésped y que codifica un polipéptido ligado operablemente a un segmento de ADN de la célula huésped que comprende un promotor de la transcripción se considera una molécula de ADN heterólogo. En contraposición, una molécula de ADN heterólogo puede comprender un gen endógeno ligado operablemente a un promotor exógeno. 65 Como otro ejemplo, una molécula de ADN que comprende un gen derivado de una célula genéticamente intacta se considera ADN heterólogo si dicha molécula de ADN es introducida en una célula mutante que carece del gen de tipo salvaje.

## ES 2 300 154 T3

Un “polipéptido” es un polímero de residuos de aminoácidos unidos por uniones peptídicas, sea producido en forma natural o sintética. Los polipéptidos de menos de alrededor de 10 residuos de aminoácidos se conocen, comúnmente como “péptidos”.

5 Una “proteína” es una macromolécula que comprende una o más cadenas de polipéptidos. Una proteína también puede comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser agregados a una proteína por la célula en la cual se produce dicha proteína y varían según el tipo de célula. Las proteínas se definen en la presente en función de la estructura de sus esqueletos de aminoácidos; en general, los sustituyentes tales como los grupos carbohidrato no se especifican, aunque pueden estar 10 presentes.

Un péptido o polipéptido codificado por una molécula de ADN que no pertenece a la célula huésped es un péptido o polipéptido “heterólogo”.

15 Un “elemento genético integrado” es un segmento de ADN que ha sido incorporado en un cromosoma de una célula huésped después de que dicho elemento es introducido en la célula mediante manipulación humana. En la presente invención, los elementos genéticos integrados son más comúnmente derivados de plásmidos linealizados que se introducen en las células mediante electroporación u otras técnicas. Los elementos genéticos integrados se transmiten de la célula huésped original a su progenie.

20 Un “vector de clonación” es una molécula de ácido nucleico, como por ejemplo, un plásmido, cósmido o bacteriófago, que tiene la capacidad de replicarse de manera autónoma dentro de una célula huésped. Los vectores de clonación habitualmente contienen un sitio de reconocimiento de endonucleasas de restricción, o una pequeña cantidad de ellos, que permiten la inserción de una molécula de ácido nucleico de una manera determinable sin la pérdida de una función biológica esencial del vector, así como secuencias de nucleótidos que codifican un gen marcador adecuado para 25 usar en la identificación y selección de las células transformadas con el vector de clonación. Los genes marcadores habitualmente incluyen genes que proporcionan resistencia a la tetraciclina o a la ampicilina.

30 Un “vector de expresión” es una molécula de ácido nucleico que codifica un gen que se expresa en una célula huésped. Habitualmente, un vector de expresión comprende un promotor de la transcripción, un gen y un terminador de la transcripción. La expresión génica generalmente se coloca bajo el control de un promotor y se dice que el gen está “ligado operablemente” al promotor. De manera similar, un elemento regulador y un promotor central están ligados operablemente si el elemento regulador modula la actividad del promotor central.

35 Un “huésped recombinante” es una célula que contiene una molécula de ácido nucleico heterólogo, como por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. En el presente contexto, un ejemplo de un huésped recombinante es una célula que produce el Ztgf $\beta$ -9 a partir de un vector de expresión. En contraposición, el Ztgf $\beta$ -9 puede ser producido por una célula que es una “fuente natural” del Ztgf $\beta$ -9 y que carece de un vector de expresión.

40 Los “transformantes integradores” son células huésped recombinantes en las cuales el ADN heterólogo se ha integrado en el ADN genómico de las células.

45 Una “proteína de fusión” es una proteína híbrida expresada por una molécula de ácido nucleico que comprende secuencias de nucleótidos de, al menos, dos genes. Por ejemplo, una proteína de fusión puede comprender, al menos, parte de un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 fusionado con un polipéptido que se une a una matriz de afinidad. Dicha proteína de fusión proporciona un medio para aislar grandes cantidades de Ztgf $\beta$ -9 mediante cromatografía de afinidad.

50 El término “receptor” denota una proteína asociada a una célula que se une a una molécula bioactiva denominada “ligando”. Esta interacción media el efecto del ligando en la célula. Los receptores pueden estar unidos a la membrana, ser citosólicos o nucleares; monoméricos (p. ej. receptor de la hormona estimuladora de la tiroides, receptor adrenérgico beta) o multiméricos (p. ej. receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF), receptor de la hormona de crecimiento, receptor de la IL-3, receptor del GM-CSF, receptor del factor estimulante de colonias de granulocitos (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), receptor de la eritropoyetina y receptor de la IL-6). Los receptores unidos a la membrana se caracterizan por una estructura de múltiples dominios 55 que comprende un dominio extracelular de unión a ligandos y un dominio efector intracelular que habitualmente participa en la transducción de las señales. En ciertos receptores unidos a la membrana, el dominio extracelular de unión a ligandos y el dominio efector intracelular están ubicados en polipéptidos separados que comprenden el receptor funcional completo.

60 En general, la unión del ligando al receptor tiene por consecuencia un cambio en la conformación del receptor que provoca una interacción entre el dominio efector y las demás moléculas de la célula lo cual, a su vez, lleva a una alteración en el metabolismo de la célula. Los eventos metabólicos que a menudo se vinculan con las interacciones receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, aumentos en la producción de AMP cíclico, movilización del calcio celular, movilización de los lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de lípidos 65 de inositol e hidrólisis de fosfolípidos.

El término “secuencia señal de secreción” denota una secuencia de ADN que codifica un péptido (un “péptido de secreción”) que, como componente de un polipéptido mayor, dirige al polipéptido mayor a través de una vía de

## ES 2 300 154 T3

secreción de una célula en la que es sintetizado. Comúnmente, el polipéptido mayor es segmentado para eliminar el péptido de secreción durante el tránsito por la vía de secreción.

Un “polipéptido aislado” es un polipéptido que está esencialmente libre de componentes celulares contaminantes, tales como carbohidratos, lípidos u otras impurezas proteináceas asociadas con el polipéptido en su estado natural.

5 Habitualmente, la preparación de polipéptido aislado contiene el polipéptido en forma altamente purificada, es decir, al menos, alrededor del 80% puro; al menos, alrededor del 90% puro; al menos, alrededor del 95% puro; más del 95% puro o más del 99% puro. Una manera de mostrar que una preparación proteica en particular contiene un polipéptido aislado es mediante la aparición de una sola banda después de la electroforesis en gel de 10 poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate, SDS) de la preparación proteica y mediante la tinción del gel con Azul Brillante de Coomassie. Sin embargo, el término “aislado” no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o, como alternativa, en formas glucosiladas o derivatizadas.

15 Los términos “amino terminal o N terminal” y “carboxilo terminal o C terminal” se utilizan en la presente para denotar posiciones dentro de los polipéptidos. Donde el contexto lo permite, dichos términos se usan con referencia a una secuencia o porción en particular de un polipéptido para denotar proximidad o posición relativa. Por ejemplo, una determinada secuencia en posición carboxilo terminal con respecto a una secuencia de referencia dentro de un polipéptido está ubicada en posición proximal al carboxilo terminal de la secuencia de referencia, pero no necesariamente 20 se encuentra en el carboxilo terminal del polipéptido completo.

El término “expresión” se refiere a la biosíntesis de un producto génico. Por ejemplo, en el caso de un gen estructural, la expresión indica la transcripción del gen estructural en ARNm y la traducción del ARNm a uno o más polipéptidos.

25 El término “variante de empalme” se usa en la presente para denotar formas alternativas de ARN transcrita de un gen. La variación por empalme surge naturalmente a través del uso de sitios de empalme alternativos dentro de una molécula de ARN transcrita o, menos comúnmente, entre moléculas de ARN transcritas por separado, y puede tener como consecuencia varios ARNm transcritos del mismo gen. Las variantes de empalme pueden codificar polipéptidos 30 con una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante de empalme también se usa en la presente para denotar un polipéptido codificado por una variante de empalme de un ARNm transcrita de un gen.

Tal como se usa en la presente, el término “inmunomodulador” incluye citocinas, factores de crecimiento de células progenitoras, linfotoxinas, moléculas coestimuladoras, factores hematopoyéticos y análogos sintéticos de estas 35 moléculas.

El término “par de complemento/anticomplemento” denota fracciones no idénticas que forman un par estable asociado en forma no covalente en las condiciones adecuadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) 40 son miembros prototípicos de un par de complemento/anticomplemento. Otros ejemplos de pares de complemento/anticomplemento incluyen pares de receptor/ligando, antígeno/anticuerpo (o hapteno o epítopo), pares de polinucleótidos codificantes/no codificantes y similares. Donde la posterior disociación del par de complemento/anticomplemento resulta deseable, el par de complemento/anticomplemento preferentemente tiene una afinidad de unión de menos de  $10^9 \text{ M}^{-1}$ .

45 Un “anticuerpo antiidiotípico” es un anticuerpo que se une al dominio de la región variable de una inmunoglobulina. En el presente contexto, un anticuerpo antiidiotípico se une a la región variable de un anticuerpo contra el Ztgf $\beta$ -9 y, por ende, un anticuerpo antiidiotípico imita a un epítopo del Ztgf $\beta$ -9.

50 Un “fragmento de anticuerpo” es una porción de un anticuerpo, como por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une al mismo antígeno reconocido por el anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo monoclonal del Ztgf $\beta$ -9 se une a un epítopo del Ztgf $\beta$ -9.

55 El término “fragmento de anticuerpo” también incluye un polipéptido sintético o producido por genomanipulación que se une a un antígeno específico, como los polipéptidos que consisten en la región variable de la cadena ligera, los fragmentos “Fv” que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, moléculas de polipéptidos recombinantes de una sola cadena en las cuales las regiones variables ligeras y pesadas están conectadas por un ligador peptídico (“proteínas scFv”) y las unidades mínimas de reconocimiento que consisten en los residuos de aminoácidos que imitan a la región hipervariable.

60 Un “anticuerpo quimérico” es una proteína recombinante que contiene los dominios variables y regiones determinantes de complementariedad derivados de un anticuerpo de roedor, mientras que el resto de la molécula del anticuerpo es derivada de un anticuerpo humano.

65 Los “anticuerpos humanizados” son proteínas recombinantes en las cuales las regiones determinantes de complementariedad murinas de un anticuerpo monoclonal han sido transferidas de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina murina a un dominio variable humano.

## ES 2 300 154 T3

Tal como se usa en la presente, un “agente terapéutico” es una molécula o un átomo, que está conjugado a una fracción de anticuerpo para producir un conjugado útil para la terapia. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen fármacos, toxinas, inmunomoduladores, quelantes, compuestos de boro, agentes o colorantes fotoactivos y radioisótopos.

5 Un “marcador detectable” es una molécula o átomo que puede estar conjugado a una fracción de anticuerpo para producir una molécula útil para el diagnóstico. Los ejemplos de marcadores detectables incluyen quelantes, agentes fotoactivos, radioisótopos, agentes fluorescentes, iones paramagnéticos u otras fracciones de marcadores.

10 El término “etiqueta de afinidad” se utiliza en la presente para denotar un segmento de un polipéptido que se puede unir a un segundo polipéptido para permitir la purificación o detección del segundo polipéptido o brindar sitios para la unión del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, cualquier péptido o proteína para los cuales haya disponibles un anticuerpo u otro agente de unión específico, se puede utilizar como etiqueta de afinidad. Las etiquetas de afinidad incluyen un tracto de polihistidina, la 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)), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952 (1985)), sustancia P, péptido FLAG (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204 (1988)), de unión a la estreptavidina u otro epítopo antigénico o dominio de unión. Véase, en general, Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2:95 (1991). Los ADN que codifican etiquetas de afinidad se pueden adquirir a través de proveedores comerciales (p. ej. Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

20 Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo entero, en contraposición a un fragmento de anticuerpo, que no está conjugado con un agente terapéutico. Los anticuerpos desnudos incluyen los anticuerpos policlonales y monoclonales, así como determinados anticuerpos recombinantes, tales como los anticuerpos quiméricos y humanizados.

25 Tal como se usa en la presente, el término “componente de anticuerpo” incluye tanto a un anticuerpo entero como a un fragmento de anticuerpo.

30 Un “inmunoconjunto” es un conjugado de un componente de anticuerpo con un agente terapéutico o un marcador detectable.

35 Tal como se usa en la presente, el término “proteína de fusión de anticuerpo” se refiere a una molécula recombinante que comprende un componente de anticuerpo y un agente terapéutico. Los ejemplos de agentes terapéuticos adecuados para dichas proteínas de fusión incluyen los inmunomoduladores (“proteína de fusión de anticuerpo-inmunomodulador”) y las toxinas (“proteína de fusión anticuerpo-toxina”).

40 Un “antígeno asociado al tumor” es una proteína que, por lo general, no es expresada, o es expresada en niveles más bajos, por una célula contraparte normal. Los ejemplos de antígenos asociados al tumor incluyen la alfa-fetoproteína, el antígeno carcinoembrionario y el Her-2/neu. Los especialistas en la materia conocen muchos otros ejemplos de antígenos asociados al tumor. Véase, por ejemplo, Urban *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.* 10:617 (1992).

45 Tal como se usa en la presente, un “agente infeccioso” denota tanto los microbios como los parásitos. Un “microbio” incluye virus, bacterias, rickettsias, micoplasma, protozoos, hongos y microorganismos similares. Un “parásito” denota invertebrados infecciosos, generalmente, microscópicos o muy pequeños, o huevos o sus formas jóvenes, que son susceptibles a la depuración mediada por mecanismos inmunitarios o a la destrucción lítica o fagocítica, por ejemplo, los parásitos del plasmodios, espiroquetas y similares.

Un “antígeno de un agente infeccioso” es un antígeno asociado con un agente infeccioso.

50 Un “polipéptido diana” o un “péptido diana” es una secuencia de aminoácidos que comprende, al menos, un epítopo y que está expresada en una célula diana, por ejemplo, una célula tumoral, o una célula que porta un antígeno de un agente infeccioso. Las células T reconocen los epítopos peptídicos presentados por una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad a un polipéptido diana o a un péptido diana y, habitualmente, lisan la célula diana o reclutan otros inmunicitos para que se dirijan al sitio de la célula diana, y la matan de este modo.

55 Un “péptido antigénico” es un péptido que se une a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (major histocompatibility complex, MHC) para formar un complejo MHC-péptido que es reconocido por una célula T y, de este modo, induce una respuesta de linfocitos citotóxicos cuando se lo presenta a la célula T. Por ende, los péptidos antigenicos son capaces de unirse a una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad adecuada e inducir una respuesta de células T citotóxicas, por ejemplo, lisis celular o liberación de citocinas específicas contra la célula diana que se une al antígeno o lo expresa. El péptido antigénico puede unirse en el contexto de una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o clase II, en una célula presentadora de antígeno o en una célula diana.

60 En los eucariotas, la ARN polimerasa II cataliza la transcripción de un gen estructural para producir ARNm. Una molécula de ácido nucleico puede ser diseñada para contener una plantilla de ARN polimerasa II en la cual el transcripto de ARN tiene una secuencia que es complementaria a la de un ARNm específico. El transcripto de ARN se denomina “ARN no codificante” y una molécula de ácido nucleico que codifica el ARN no codificante se denomina “gen no codificante”. Las moléculas de ARN no codificante son capaces de unirse a las moléculas de ARNm, lo cual da como resultado una inhibición de la traducción del ARNm o de la degradación del ARNm.

## ES 2 300 154 T3

Un “oligonucleótido no codificante específico para el Ztgf $\beta$ -9” o un “oligonucleótido no codificante del Ztgf $\beta$ -9” es un oligonucleótido que tiene una secuencia (a) capaz de formar una estructura triple estable con una porción del gen del Ztgf $\beta$ -9 o (b) capaz de formar una estructura doble estable con una porción de un transcripto de ARNm del gen del Ztgf $\beta$ -9.

5 Una “ribozima” es una molécula de ácido nucleico que contiene un centro catalítico. El término incluye a las enzimas del ARN, a los ARN autoempalmantes, los ARN autosegmentantes y las moléculas de ácido nucleico que realizan estas funciones catalíticas. Una molécula de ácido nucleico que codifica una ribozima se denomina “gen de ribozima”.

10 Una “secuencia guía externa” es una molécula de ácido nucleico que dirige a la ribozima endógena, RNasa P, a una especie de ARNm intracelular en particular, con lo cual se produce la segmentación del ARNm por la RNasa P. Una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia guía externa se denomina “gen secuencia guía externa”.

15 El término “variante del gen del Ztgf $\beta$ -9 humano” se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de la SEC. ID. N.º 2. Dichas variantes incluyen los polimorfismos naturales de los genes del Ztgf $\beta$ -9, así como los genes sintéticos que contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la SEC. ID. N.º 2. Las formas variantes adicionales de los genes del Ztgf $\beta$ -9 son las moléculas de ácido nucleico que contienen inserciones o eliminaciones de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente. Una variante del gen del Ztgf $\beta$ -9 puede identificarse determinando si el gen se hibrida con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, o su complemento, en condiciones rigurosas.

25 De manera similar, el término “variante del gen del Ztgf $\beta$ -9 murino” se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es una modificación de la SEC. ID. N.º 9. Una variante del gen del Ztgf $\beta$ -9 murino puede identificarse determinando si el gen se hibrida con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 8, o su complemento, en condiciones rigurosas.

30 Como alternativa, la variante de los genes del Ztgf $\beta$ -9 puede identificarse por comparación de las secuencias. Dos secuencias de aminoácidos tienen “100% de identidad en las secuencias de aminoácidos” si los residuos de aminoácidos de las dos secuencias de aminoácidos son iguales cuando se las alinea para obtener la máxima correspondencia. En forma similar, dos secuencias de nucleótidos tienen “100% de identidad de las secuencias de nucleótidos” si los residuos de nucleótidos de las dos secuencias de nucleótidos son iguales cuando se las alinea para obtener la máxima correspondencia. Las comparaciones de secuencias pueden realizarse utilizando programas de ordenador estándares como los incluidos en el juego de programas de bioinformática para ordenador LASERGENE, producido por DNASTAR (Madison, Wisconsin). Otros métodos para comparar dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos determinando el alineamiento óptimo son bien conocidos por los especialistas en la materia (véase, por ejemplo, Peruski y Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997), Wu *et al.* (ed.), “Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins”, en *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), y Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing*, 2.<sup>a</sup> Edición (Academic Press, Inc. 1998)). A continuación se describen métodos particulares para determinar la identidad de las secuencias.

45 Independientemente del método en particular utilizado para identificar una variante del gen del Ztgf $\beta$ -9 o una variante del polipéptido Ztgf $\beta$ -9, una variante de un gen o polipéptido codificado por una variante de un gen se encuentran caracterizados funcionalmente por sus actividades antivirales o antiproliferativas, o por la capacidad de unirse específicamente a un anticuerpo contra el Ztgf $\beta$ -9.

50 El término “variante alélica” se utiliza en la presente para denotar cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de la mutación y puede tener como consecuencia el polimorfismo fenotípico dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con una secuencia de aminoácidos alterada. El término variante alélica también se usa en la presente para denotar una proteína codificada por una variante alélica de un gen.

55 El término “ortólogo” denota un polipéptido o una proteína obtenidos de una especie que es la contraparte funcional de un polipéptido o una proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencias entre los ortólogos son el resultado de la especiación.

60 Los “parálogos” son proteínas diferentes pero estructuralmente relacionadas producidas por un organismo. Se cree que los parálogos surgen por duplicación génica. Por ejemplo, la  $\alpha$ -globina, la  $\beta$ -globina y la mioglobina son parálogos entre sí.

65 Debido a la imprecisión de los métodos analíticos estándar, se entiende que los pesos moleculares y las longitudes de los polímeros son valores aproximados. Cuando uno de dichos valores se expresa como “alrededor de” X o “aproximadamente” X, se entenderá que el valor X expresado tiene una exactitud de  $\pm 10\%$ .

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un gen del *Ztgfβ-9* humano o de ratón pueden obtenerse cribando una genoteca genómica o ADNc humano o de ratón con sondas de polinucleótidos basadas en las SEC. ID. N.º 1 o SEC. ID. N.º 8. Estas técnicas son estándar y están bien establecidas. A manera de ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un gen del *Ztgfβ-9* humano puede aislarse de una genoteca de ADNc humana. En este caso, el primer paso consistiría en preparar la genoteca de ADNc aislando ARN de tejido del cerebro, la médula espinal, el corazón, el músculo esquelético, el estómago, el páncreas, la glándula suprarrenal, la glándula salival, el intestino delgado, la médula ósea, el timo, el bazo, los ganglios linfáticos, el corazón, la tiroides, la tráquea, los testículos, los ovarios o la placenta, con métodos bien conocidos por los especialistas en la materia. En general, las técnicas de aislamiento del ARN deben brindar un método para romper las células, un medio para inhibir la degradación del ARN dirigida por la RNasa y un método para separar el ARN de los contaminantes de ADN, proteínas y polisacáridos. Por ejemplo, el ARN total puede aislarse congelando el tejido en nitrógeno líquido, moliendo el tejido congelado con un mortero para Usar las células, extrayendo el tejido molido con una solución de fenol/cloroformo para eliminar las proteínas y separando el ARN de las impurezas restantes mediante precipitación selectiva con cloruro de litio (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (ed.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3.ª edición, páginas 4-1 a 4-6 (John Wiley & Sons 1995) [“Ausubel (1995)”; Wu *et al.*, *Methods in Gene Biotechnology*, páginas 33-41 (CRC Press, Inc. 1997) [“Wu (1997)”]).

Como alternativa, el ARN total puede aislarse del tejido del cerebro o la médula espinal como también del corazón, el músculo esquelético, el estómago, el páncreas, la glándula suprarrenal, la glándula salival, el hígado, el intestino delgado, la médula ósea, el timo, el bazo, los ganglios linfáticos, la tiroides, la tráquea, los testículos, los ovarios o la placenta, extrayendo el tejido molido con isotiocianato de guanidinio, extrayéndolo con solventes orgánicos y separando el ARN de los contaminantes mediante centrifugación diferencial (véase, por ejemplo, Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18:52 (1979); Ausubel (1995) en las páginas 4-1 a 4-6; Wu (1997) en las páginas 33-41). A fin de construir una genoteca de ADNc, el ARN poli(A)<sup>+</sup> debe ser aislado de una preparación de ARN total. El ARN poli(A)<sup>+</sup> puede aislarse del ARN total mediante la técnica estándar de cromatografía con oligo(dT)-celulosa (véase, por ejemplo, Aviv y Leder, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:1408 (1972); Ausubel (1995) en las páginas 4-11 a 4-12). Las moléculas de ADNc bicatenario se sintetizan a partir del ARN poli(A)<sup>+</sup> mediante técnicas bien conocidas por los especialistas en la materia. (véase, por ejemplo, Wu (1997) en las páginas 41-46). Además, se pueden utilizar equipos disponibles comercialmente para sintetizar moléculas de ADNc bicatenario. Por ejemplo, dichos equipos se pueden adquirir a través de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Promega Corporation (Madison, WI) y STRATAGENE (La Jolla, CA).

Diversos vectores de clonación resultan adecuados para la construcción de una genoteca de ADNc. Por ejemplo, una genoteca de ADNc puede prepararse en un vector derivado de un bacteriófago, por ejemplo, el  $\lambda$ . Véase, por ejemplo, Huyhn *et al.*, “Constructing and Screening cDNA Libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11”, en *DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I*, Glover (ed.), pág. 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) en las páginas 47-52. Como alternativa, las moléculas de ADNc bicatenario se pueden insertar en un vector plasmídico, como un vector pBLUESCRIPT (STRATAGENE; La Jolla, CA), un LAMDAGEM-4 (Promega Corp.) u otros vectores disponibles comercialmente. También pueden obtenerse vectores de clonación adecuados de la Colección Estadounidense de Cultivos de Tipos (American Type Culture Collection), (Manassas, VA). Para amplificar las moléculas de ADNc clonado, la genoteca de ADNc se inserta en un huésped procariota empleando las técnicas estándar. Por ejemplo, la genoteca de ADNc puede introducirse en células de *E. coli* DH5 competentes que pueden obtenerse, por ejemplo, de Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD).

Se puede preparar una genoteca genómica humana por medios bien conocidos por los especialistas en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327). El ADN genómico puede aislarse lisando el tejido con el detergente Sarkosyl, digiriendo el lisado con la proteinasa K, eliminando los restos insolubles del lisado por centrifugación, precipitando el ácido nucleico del lisado con isopropanol y purificando el ADN resuspendido en un gradiente de densidad de cloruro de cesio. Los fragmentos de ADN que son adecuados para la producción de una genoteca genómica pueden obtenerse mediante la fragmentación aleatoria de ADN genómico o mediante la digestión parcial de ADN genómico con endonucleasas de restricción. Los fragmentos de ADN genómico pueden insertarse en un vector, por ejemplo, un vector bacteriófago o cósmido, de acuerdo con las técnicas convencionales, tales como el uso de digestión con enzimas de restricción para brindar terminales adecuados, el uso de tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable de moléculas de ADN y la ligadura con ligasas adecuadas. Las técnicas de dicha manipulación son bien conocidas por los especialistas en la materia (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 5-1 a 5-6; Wu (1997) en las páginas 307-327).

Las moléculas de ácido nucleico que codifican un gen del *Ztgfβ-9* humano también pueden obtenerse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores oligonucleótidos que tengan secuencias de nucleótidos basadas en las secuencias de nucleótidos del gen del *Ztgfβ-9* humano, tal como se describe en la presente. Los métodos generales para cribar las genotecas con PCR son proporcionados, por ejemplo, por Yu *et al.*, “Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries”, en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (ed.), páginas 211-215 (Humana Press, Inc. 1993). Además, las técnicas para usar la PCR para aislar genes relacionados han sido descritas, por ejemplo, por Preston, “Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members”, en *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (ed.), páginas 317-337 (Humana Press, Inc. 1993). Como alternativa, las genotecas genómicas humanas pueden obtenerse de fuentes comerciales,

por ejemplo, Research Genetics (Huntsville, AL) y la Colección Estadounidense de Cultivos de Tipos (Manassas, VA). Una genoteca de clones de ADNc o genómicos puede cribarse con una o más sondas de polinucleótidos basadas en la SEC. ID. N.º 1, utilizando métodos estándar (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-1 a 6-11).

5

Los anticuerpos contra el Ztgf $\beta$ -9, producidos según se describe a continuación, también pueden usarse para aislar secuencias de ADN que codifiquen genes del Ztgf $\beta$ -9 humanos de genotecas de ADNc. Por ejemplo, pueden utilizarse los anticuerpos para cribar genotecas de expresión del  $\lambda$ gt11 o pueden utilizarse los anticuerpos para realizar un inmunocribado posterior a la selección y traducción de los híbridos (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 6-12 a 6-16; Margolis *et al.*, "Screening  $\lambda$  expression libraries with antibody and protein probes", en *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2.ª Edición*, Glover *et al.* (ed.), páginas 1-14 (Oxford University Press 1995)).

Como alternativa, un gen del Ztgf $\beta$ -9 puede obtenerse sintetizando moléculas de ácido nucleico con oligonucleótidos largos mutuamente cebantes y las secuencias de nucleótidos descritas en la presente (véase, por ejemplo, Ausubel (1995) en las páginas 8-8 a 8-9). Las técnicas establecidas que usan la reacción en cadena de la polimerasa brindan la posibilidad de sintetizar moléculas de ADN de una longitud de, al menos, dos kilobases (Adang *et al.*, *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993), Bambot *et al.*, *PCR Methods and Applications* 2:266 (1993), Dillon *et al.*, "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes", en *Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (ed.), páginas 263-268, (Human Press, Inc. 1993) y Holowachuk *et al.*, *PCR Methods Appl.* 4:299 (1995)). La secuencia de un ADNc del Ztgf $\beta$ -9 o un fragmento genómico del Ztgf $\beta$ -9 puede determinarse mediante métodos estándar. Además, la identificación de los fragmentos genómicos que contienen un elemento promotor o regulador del Ztgf $\beta$ -9 puede lograrse mediante técnicas bien establecidas, tales como el análisis de las eliminaciones (véase, en general, Ausubel (1995)).

La clonación de las secuencias que flanquean a 5' también facilita la producción de las proteínas Ztgf $\beta$ -9 por "activación genética" según los métodos divulgados en Patente de EE. UU. N.º 5.641.670. En resumen, la expresión de un gen del Ztgf $\beta$ -9 endógeno en una célula se altera introduciendo en el locus del Ztgf $\beta$ -9 un constructo de ADN que comprende, al menos, una secuencia de acceso, una secuencia reguladora, un exón y un sitio donante de empalme no apareado. La secuencia de acceso es una secuencia 5' no codificante del Ztgf $\beta$ -9 que permite la recombinación homóloga del constructo con el locus del Ztgf $\beta$ -9 endógeno, por la cual las secuencias dentro del constructo se ligan operablemente a la secuencia codificante del Ztgf $\beta$ -9 endógena. De esta manera, un promotor del Ztgf $\beta$ -9 endógeno puede reemplazarse o suplementarse con otras secuencias reguladoras para proporcionar una expresión potenciada, específica para un tejido o regulada de alguna otra manera.

Asimismo, los polinucleótidos de la presente invención pueden sintetizarse utilizando un sintetizador de ADN. En la actualidad, el mejor método es el de la fósforamidita. Si se requiere ADN bicatenario sintetizado químicamente para una aplicación como la síntesis de un gen o de un fragmento génico, cada cadena complementaria se fabrica por separado. La producción de genes cortos (de 60 a 80 pb) es técnicamente sencilla y se puede lograr sintetizando las cadenas complementarias y luego apareándolas. Sin embargo, para la producción de genes más largos (>300 pb), se requieren estrategias especiales porque la eficiencia de acoplamiento de cada ciclo durante la síntesis química de ADN rara vez alcanza el 100%. Para superar este problema, los genes sintéticos (bicatenarios) se arman en forma modular a partir de fragmentos monocatenarios que tienen una longitud de entre 20 y 100 nucleótidos. Además de la secuencia que codifica la proteína, los genes sintéticos pueden diseñarse con secuencias terminales que facilitan la inserción en sitios de endonucleasas de restricción de un vector de clonación y también deben agregarse otras secuencias que contengan señales para el inicio y la terminación adecuados de la transcripción y la traducción. Véase Glick, Bernard R. y Jack J. Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA*, (ASM Press, Washington, D.C. 1994), Itakura, K. *et al.* *Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. Annu. Rev. Biochem.* 53:323-356 (1984) y Climie, S. *et al.* *Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:633-637 (1990).

Los polinucleótidos aislados pueden hibridarse con regiones de tamaño similar del ADN de la SEC. ID. N.º 1 o una secuencia complementaria a dicho ADN, en condiciones rigurosas. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para ser alrededor de 5°C inferiores al punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una concentración iónica y un pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (a una concentración iónica y un pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia de acceso se híbrida con una sonda que coincide perfectamente. Las condiciones rigurosas habituales son aquellas en las que la concentración de sal es de alrededor de 0,02 M o inferior a un pH 7 y la temperatura es de, al menos, alrededor de 60°C. Como se señaló anteriormente, los polinucleótidos aislados de la presente invención incluyen ADN y ARN. Los métodos para aislar ADN y ARN son bien conocidos por los especialistas en la materia. El ARN total puede prepararse mediante extracción con clorhidrato de guanidina y realizando, luego, el aislamiento mediante centrifugación en un gradiente de CsCl [Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18:52-94 (1979)]. Se prepara ARN poli(A)<sup>+</sup> a partir del ARN total usando el método de Aviv y Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1408-1412 (1972). Se prepara ADN complementario (ADNc) a partir del ARN poli(A)<sup>+</sup> usando los métodos conocidos. Luego, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9 se identifican y aíslan mediante, por ejemplo, hibridación o PCR.

## ES 2 300 154 T3

Los especialistas en la materia reconocerán que las secuencias divulgadas en las SEC. ID. N.º 1 y 2 representan un único alelo de la especie humana. Existe una cantidad de variantes naturales N terminales maduras que tienen la secuencia líder segmentada en posiciones diferentes. Las variantes alélicas de estas secuencias pueden clonarse sondando genotecas de ADNc o genómicas de diferentes individuos según los procedimientos estándar. Los polinucleótidos y las proteínas contraparte de otras especies se denominan (“ortólogos en otras especies”). De particular interés resultan los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9 de otras especies de mamíferos, incluidos los murinos, porcinos, ovinos, bovinos, caninos, felinos, equinos y otros primates. Los ortólogos en otras especies de la proteína Ztgf $\beta$ -9 humana se pueden clonar usando información y composiciones provistas por la presente invención en combinación con las técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, un ADNc puede clonarse usando ARNm obtenido de un tejido o tipo celular que exprese el gen. Pueden identificarse fuentes adecuadas de ARNm por sondaje de Northern blots con sondas diseñadas a partir de las secuencias divulgadas en la presente. Luego se prepara una genoteca a partir de ARNm de un tejido o una línea celular positivos. Luego, puede aislar un ADNc que codifica la proteína con una serie de métodos, por ejemplo, el sondaje con un ADNc humano completo o parcial, o con uno o más conjuntos de sondas degeneradas sobre la base de las secuencias divulgadas. Un ADNc también puede clonarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Mullis, Patente de EE. UU. N.º 4.683.202), con cebadores diseñados a partir de las secuencias divulgadas en la presente. Dentro de un método adicional, la genoteca de ADNc puede utilizarse para transformar o transfectar células huésped, y la expresión del ADNc de interés puede detectarse con un anticuerpo contra la proteína. Pueden aplicarse técnicas similares para el aislamiento de clones genómicos. Como se usa y reivindica, la expresión “un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido, estando dicho polinucleótido definido en la SEC. ID. N.º 2” incluye todas las variantes alélicas y los ortólogos en otras especies del polipéptido de las SEC. ID. N.º 2, 3, 4 y 5.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el Ztgf $\beta$ -9 humano pueden hibridarse con moléculas de ácido nucleico que tienen la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, o una secuencia complementaria a ella, en “condiciones rigurosas”. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean alrededor de 5°C más bajas que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una concentración iónica y un pH definidos. La  $T_m$  es la temperatura (a una concentración iónica y un pH definidos) a la cual el 50% de la secuencia de acceso se hibrida con una sonda que coincide perfectamente.

A manera de ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica una variante del polipéptido Ztgf $\beta$ -9 puede hibridarse con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) a 42°C, de un dÍa para el otro, en una solución que comprende formamida al 50%, 5x SSC (1x SSC: cloruro de sodio 0,15 M y citrato de sodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt (100x solución de Denhardt: Ficoll 400 al 2% (p/v), polivinilpirrolidona al 2% (p/v) y albúmina de suero bovino al 2% (p/v)), sulfato de dextrano al 10% y 20  $\mu$ g/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado. Un especialista en la materia puede idear variaciones de estas condiciones de hibridación. Por ejemplo, la mezcla de hibridación puede incubarse a una temperatura mayor, por ejemplo, alrededor de 65°C, en una solución que no contiene formamida. Además, existen soluciones de hibridación mezcladas previamente (p. ej. EXPRESSHYB Hybridization Solution de CLONTECH Laboratories, Inc.) y la hibridación puede llevarse a cabo según las instrucciones del fabricante. Después de la hibridación, las moléculas de ácido nucleico pueden lavarse para eliminar las moléculas de ácido nucleico no hibridadas en condiciones rigurosas o en condiciones muy rigurosas. Las condiciones de lavado rigurosas habituales incluyen lavado en una solución de 0,5x-2x SSC con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% a 55-65°C. A manera de ejemplo, las moléculas de ácido nucleico que codifican una variante del polipéptido Ztgf $\beta$ -9 se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x-2x SSC con SDS al 0,1% a 55-65°C e incluye 0,5x SSC con SDS al 0,1% a 55°C, ó 2x SSC con SDS al 0,1% a 65°C. Un especialista en la materia puede fácilmente idear condiciones equivalentes, por ejemplo, sustituyendo SSC por SSPE en la solución de lavado.

Las condiciones de lavado muy rigurosas habituales incluyen el lavado en una solución de 0,1x-0,2x SSC con dodecil sulfato de sodio (SDS) al 0,1% a 50-65°C. En otras palabras, las moléculas de ácido nucleico que codifican una variante del polipéptido Ztgf $\beta$ -9 se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) en condiciones de lavado muy rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1 x-0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50-65°C e incluye 0,1 x SSC con SDS al 0,1% a 50°C ó 0,2x SSC con SDS al 0,1% a 65°C.

Los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9 aislados pueden tener una identidad de secuencias sustancialmente similar a los polipéptidos de las SEC. ID. N.º 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17, 18 o sus ortólogos. El término “identidad de secuencias sustancialmente similar” se usa en la presente para denotar polipéptidos que tienen una identidad de secuencias de, al menos, un 90%; al menos, un 95%; o más del 95% y 99% con las secuencias mostradas en las SEC. ID. N.º 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17, 18 o sus ortólogos.

Las moléculas de ácido nucleico de las variantes del Ztgf $\beta$ -9 pueden identificarse aplicando dos criterios: una determinación de la similitud entre el polipéptido codificado con la secuencia de aminoácidos de las SEC. ID. N.º 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17 ó 18, y una valoración de hibridación, según se ha descrito más arriba. Dichas variantes del Ztgf $\beta$ -9 incluyen las moléculas de ácido nucleico: (1) que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1, SEC. ID. N.º 9 o SEC. ID. N.º 16 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x-2x SSC con SDS al 0,1% a 55-

## ES 2 300 154 T3

65°C; y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de, al menos, un 90%; al menos, un 95%; o más del 95% con la secuencia de aminoácidos de las SEC. ID. N.º 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17 ó 18. Como alternativa, las variantes del Ztgf $\beta$ -9 pueden caracterizarse como moléculas de ácido nucleico (1) que se hibridan con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 1 (o su complemento) en

5 condiciones de lavado muy rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1 x-0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50-65°C; y (2) que codifican un polipéptido que tiene una identidad de secuencias de, al menos, un 90%; al menos, un 95%; o más del 95% o 99% con la secuencia de aminoácidos de las SEC. ID. N.º 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17 ó 18.

10 Las moléculas de ácido nucleico de las variantes del Ztgf $\beta$ -9 humano pueden identificarse mediante, al menos, uno de los siguientes: determinación de identidad de las secuencias y análisis de hibridación, con referencia a la SEC. ID. N.º 2. Las moléculas de ácido nucleico de las variantes del Ztgf $\beta$ -9 murino pueden identificarse mediante, al menos, una determinación de identidad de las secuencias y análisis de hibridación, con referencia a las SEC. ID. N.º 8 y 9. Por ejemplo, al utilizar el enfoque que se utilizó anteriormente, las moléculas de ácido nucleico de las variantes del 15 Ztgf $\beta$ -9 murino pueden identificarse a través de la aplicación de, al menos, uno de tres criterios: (1) hibridación con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 8 (o su complemento) en condiciones de lavado rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,5x-2x SSC con SDS al 0,1% a 55-65°C; (2) hibridación con una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos de la SEC. ID. N.º 8 (o su complemento) en condiciones de lavado muy rigurosas, en las cuales la rigurosidad del lavado es equivalente a 0,1x-0,2x SSC con SDS al 0,1% a 50-65°C; y (3) un porcentaje de identidad de aminoácidos con una identidad de 20 secuencias de, al menos, un 90%; al menos, un 95%; o más del 95% con la secuencia de aminoácidos de la SEC. N.º 12.

25 El porcentaje de identidad de secuencias se determina por métodos convencionales. Véase, por ejemplo, Altschul *et al.*, *Bull. Math. Bio.* 48:603 (1986), y Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992). En resumen, dos secuencias de aminoácidos se alinean para optimizar los puntajes de alineamiento utilizando una penalización por apertura de gap de 10, una penalización por extensión de gap de 1 y la matriz de puntuación “BLOSUM 62” de 30 Henikoff y Henikoff (*ibid.*) como se muestra en la Tabla 1 (los aminoácidos se indican con códigos estándar de una sola letra). Luego, se calcula el porcentaje de identidad como: ([cantidad total de coincidencias idénticas]/[longitud de la secuencia más larga más cantidad de gaps introducidos en la secuencia más larga para alinear las dos secuencias]) (100).

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

# ES 2 300 154 T3

**Tabla 1**

	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																	
10	N	-2	0	6																
	D	-2	-2	1	6															
15	C	0	-3	-3	-3	9														
	Q	-1	1	0	0	-3	5													
20	E	-1	0	0	2	-4	2	5												
	G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6											
25	H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8										
	I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4									
30	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							
35	M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5						
	F	-2	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	0	-3	0	6					
40	P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7				
	S	1	-1	1	0	-1	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
45	T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-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	
50	Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7
	V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1

5

10

15

20

25

30

40

45

50

55

60

65

## ES 2 300 154 T3

Los especialistas en la materia apreciarán que existen muchos algoritmos establecidos para alinear dos secuencias de aminoácidos. El algoritmo de búsqueda de similitud “FASTA” de Pearson y Lipman es un método de alineamiento de proteínas adecuado para examinar el nivel de identidad compartido por una secuencia de aminoácidos divulgada en la presente y la secuencia de aminoácidos de una variante putativa del Ztgf $\beta$ -9. El algoritmo FASTA ha sido descrito por Pearson y Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), y por Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990). En resumen, el FASTA primero caracteriza la similitud entre secuencias identificando las regiones compartidas por la secuencia de consulta (p. ej. SEC. ID. N.º 2) y una secuencia de prueba que tienen la mayor densidad de identidades (si la variable ktup es 1) o pares de identidades (si ktup=2), sin tener en cuenta sustituciones, inserciones o eliminaciones conservadoras de aminoácidos. Luego, se vuelven a puntuar las diez regiones con la mayor densidad de identidades comparando la similitud de todos los aminoácidos apareados mediante una matriz de sustitución de aminoácidos, y se “recortan” los extremos de las regiones para incluir únicamente aquellos residuos que contribuyan a la mayor puntuación. Si hay varias regiones con puntuaciones mayores que el valor de “corte” (calculado mediante una fórmula predeterminada en función de la longitud de la secuencia y el valor de ktup), las regiones iniciales recortadas se examinan para determinar si pueden unirse para formar un alineamiento aproximado con gaps. Finalmente, las regiones con la mayor puntuación de las dos secuencias de aminoácidos se alinean mediante una modificación del algoritmo de Needleman-Wunsch-Sellers (Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787 (1974)), que permite las inserciones y eliminaciones de aminoácidos. Los parámetros ejemplificativos del análisis por el método FASTA son: ktup=1, penalización por apertura de gap=10, penalización por extensión de gap=1 y matriz de sustitución=BLOSUM62. Estos parámetros pueden introducirse en un programa FASTA modificando el archivo de la matriz de puntuación (“SMATRIX”), como se explica en el Anexo 2 de Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990).

El FASTA también puede utilizarse para determinar la identidad de secuencias de moléculas de ácido nucleico utilizando una relación, tal como se ha divulgado anteriormente. Para las comparaciones de secuencias de nucleótidos, el valor de ktup puede variar entre uno y seis; preferentemente entre tres y seis; de mayor preferencia tres, con los demás parámetros fijados según se ha descrito anteriormente.

Las moléculas de ácido nucleico pueden codificar un polipéptido que tiene un cambio conservador de aminoácidos, en comparación con la secuencia de aminoácidos de las SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9, SEC. ID. N.º 12, SEC. ID. N.º 17 o SEC. ID. N.º 18. Es decir, se pueden obtener variantes que contienen una o más sustituciones de aminoácidos de las SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4 SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9 o SEC. ID. N.º 12, en la cual un aminoácido alquilo sustituye a un aminoácido alquilo de una secuencia de aminoácidos del Ztgf $\beta$ -9; un aminoácido aromático sustituye a un aminoácido aromático de una secuencia de aminoácidos del Ztgf $\beta$ -9; un aminoácido que contiene azufre sustituye a un aminoácido que contiene azufre de una secuencia de aminoácidos del Ztgf $\beta$ -9; un aminoácido que contiene hidroxi sustituye a un aminoácido que contiene hidroxi de una secuencia de aminoácidos del Ztgf $\beta$ -9; un aminoácido acídico sustituye a un aminoácido acídico de una secuencia de aminoácidos del Ztgf $\beta$ -9; un aminoácido básico sustituye a un aminoácido básico de una secuencia de aminoácidos del Ztgf $\beta$ -9 o un aminoácido monocarboxílico dibásico sustituye a un aminoácido monocarboxílico dibásico de una secuencia de aminoácidos del Ztgf $\beta$ -9.

Entre los aminoácidos comunes, por ejemplo, una “sustitución conservadora de aminoácidos” se ejemplifica con una sustitución entre aminoácidos dentro de cada uno de los siguientes grupos: (1) glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; (2) fenilalanina, tirosina y triptófano; (3) serina y treonina; (4) aspartato y glutamato; (5) glutamina y aspárragina; y (6) lisina, arginina e histidina. Por ejemplo, una variante de los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9 que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de las SEC. ID. N.º: 2, 3, 4, 5 ó 12 puede obtenerse sustituyendo Ser por un residuo de treonina, sustituyendo Ile por valina, sustituyendo Glu por un residuo de aspartato o sustituyendo Ile por un residuo de valina. Pueden obtenerse variantes adicionales produciendo polipéptidos que tengan dos o más de estas sustituciones de aminoácidos.

Pueden idearse variantes del Ztgf $\beta$ -9 humano o murino alineando las secuencias de aminoácidos de las SEC. ID. N.º 3 y SEC. ID. N.º 12, y teniendo en cuenta cualquier diferencia en los residuos de aminoácidos correspondientes.

La tabla BLOSUM62 es una matriz de sustitución de aminoácidos derivada de alrededor de 2.000 alineamientos múltiples locales de segmentos de secuencias de proteínas, que representan regiones altamente conservadas de más de 500 grupos de proteínas relacionadas (Henikoff y Henikoff, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992)). En consecuencia, las frecuencias de sustitución de BLOSUM62 pueden utilizarse para definir sustituciones conservadoras de aminoácidos que se pueden introducir en las secuencias de aminoácidos de la presente invención. Aunque es posible diseñar sustituciones de aminoácidos basadas únicamente en las propiedades químicas (como se analizó anteriormente), la expresión “sustitución conservadora de aminoácidos” se refiere, preferentemente, a una sustitución representada por un valor de BLOSUM62 mayor que -1. Por ejemplo, una sustitución de aminoácidos es conservadora si la sustitución se caracteriza por un valor de BLOSUM62 de 0, 1, 2 o 3. Según este sistema, las sustituciones conservadoras de aminoácidos preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de, al menos, 1 (p. ej. 1, 2 o 3), mientras que las sustituciones conservadoras de aminoácidos más preferidas se caracterizan por un valor de BLOSUM62 de, al menos, 2 (p. ej. 2 ó 3).

Las variantes del Ztgf $\beta$ -9 humano o murino pueden tener una identidad de secuencias de, al menos, un 90%; al menos, un 95% o 99%; o más, respecto de las secuencias de aminoácidos humanas correspondientes (es decir, SEC. ID. N.º 2, 3, 4, 5 ó 17) o murinas (es decir, SEC. ID. N.º 9 ó 12) donde la variación en la secuencia de aminoácidos se debe a una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos.

## ES 2 300 154 T3

Los cambios conservadores de aminoácidos en un gen del Ztgf $\beta$ -9 pueden introducirse sustituyendo los nucleótidos enumerados en cualquiera de las SEC. ID. N.º 1 ó 9 por nucleótidos. Tales variantes “conservadoras de aminoácidos” pueden obtenerse, por ejemplo, por mutagénesis oligonucleótido dirigida, mutagénesis por cribaje de ligadores, mutagénesis utilizando la reacción en cadena de la polimerasa y similares (véase, Ausubel (1995) en las páginas 8-10 a 8-22 y McPherson (ed.), *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (IRL Press 1991)). La capacidad de dichas variantes de promover actividad antiviral o antiproliferativa puede determinarse utilizando un método estándar, por ejemplo, la valoración descrita en la presente. Como alternativa, una variante de un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 puede identificarse por la capacidad de unirse específicamente a anticuerpos contra el Ztgf $\beta$ -9.

Las proteínas también pueden abarcar residuos de aminoácidos no naturales. Los aminoácidos no naturales, incluyen entre otros, *trans*-3-metilprolina; *cis*-4-hidroxiprolina, *trans*-4-hidroxiprolina, *N*-metilglicina, a/o-treonina, metiltreonina, hidroxietilcisteína, hidroxietilhomocisteína, nitroglutamina, homoglutamina, ácido piperídico, tiazolidina, ácido carboxílico, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina; 3,3-dimetilprolina, *tert*-leucina, norvalina, 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina y 4-fluorofenilalanina. En la especialidad, se conocen varios métodos para incorporar residuos de aminoácidos no naturales a las proteínas. Por ejemplo, puede utilizarse un sistema *in vitro* donde se supriman las mutaciones terminadoras utilizando ARNt supresores químicamente aminoacilados. Los métodos para sintetizar aminoácidos y aminoacilar ARNt son conocidos en la especialidad. La transcripción y la traducción de plásmidos que contienen mutaciones terminadoras habitualmente se realizan en un sistema sin células que comprende un extracto de *E. coli* S30 y enzimas y otros reactivos disponibles comercialmente. Las proteínas se purifican por cromatografía. Véase, por ejemplo, Robertson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722 (1991), Ellman *et al.*, *Methods Enzymol.* 202:301 (1991), Chung *et al.*, *Science* 259:806 (1993) y Chung *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10145 (1993).

En un segundo método, la traducción se realiza en ovocitos de *Xenopus* por microinyección de ARNm mutado y ARNt supresores químicamente aminoacilados (Turcatti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:19991 (1996)). Dentro de un tercer método, se cultivan células de *E. coli* en ausencia de un aminoácido natural, que debe ser reemplazado (p. ej. fenilalanina), y en presencia del (de los) aminoácido(s) no natural(es) deseado(s) (p. ej. 2-azafenilalanina, 3-azafenilalanina, 4-azafenilalanina o 4-fluorofenilalanina). El aminoácido no natural se incorpora a la proteína en lugar de su contraparte natural. Véase, Koide *et al.*, *Biochem.* 33:7470 (1994). Los residuos de aminoácidos naturales pueden convertirse en especies no naturales mediante modificación química *in vitro*. La modificación química puede combinarse con mutagénesis sitio dirigida para ampliar aún más la gama de sustituciones (Wynn y Richards, *Protein Sci.* 2:395 (1993)).

Los residuos de aminoácidos del Ztgf $\beta$ -9 pueden sustituirse por una cantidad limitada de aminoácidos no conservadores, aminoácidos no codificados por el código genético, aminoácidos no naturales y aminoácidos contranaturales.

Los aminoácidos esenciales de los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la especialidad, por ejemplo, mutagénesis sitio dirigida o mutagénesis por cribaje de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244:1081 (1989), Bass *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:4498 (1991), Coombs y Corey, “Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering”, en *Proteins: Analysis and Design*, Angeletti (ed.), páginas 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). En esta última técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada residuo de la molécula y se prueban las moléculas mutantes resultantes a fin de determinar su actividad biológica como se divulga a continuación, para identificar residuos de aminoácidos que resultan fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:4699 (1996).

45

### TABLA 2

#### *Sustituciones conservadoras de aminoácidos*

50

Básica: arginina  
lisina  
histidina

55

Acídica: ácido glutámico  
ácido aspártico

60

Polar: glutamina  
asparragina

65

Hidrófoba: leucina  
isoleucina  
valina

# ES 2 300 154 T3

TABLA 2 (continuación)

	Aromática:	fenilalanina triptófano tirosina
5	Pequeña:	glicina alanina serina treonina metionina
10		

15 Los aminoácidos esenciales de los polipéptidos de la presente invención pueden identificarse de acuerdo con procedimientos conocidos en la especialidad, por ejemplo, mutagénesis sitio dirigida o mutagénesis por cribaje de alanina [Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989); Bass *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4498-4502 (1991)]. En esta última técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada residuo de la molécula y se prueban las 20 moléculas mutantes resultantes a fin de determinar su actividad biológica (p. ej. unión a ligandos y transducción de señales) para identificar residuos de aminoácidos que resultan fundamentales para la actividad de la molécula. También pueden determinarse sitios de interacción de ligandos y proteínas mediante el análisis de la estructura de cristales 25 determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalográfica o marcación por fotoafinidad. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, *Science* 255:306-312 (1992); Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309:59-64 (1992). Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden inferirse a partir de análisis 30 de homologías con proteínas relacionadas.

35 Se pueden realizar múltiples sustituciones de aminoácidos y probarlas utilizando métodos conocidos de mutagénesis y cribaje, como los divulgados 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 divultan métodos para aleatorizar simultáneamente 40 dos o más posiciones en un polipéptido, seleccionar el polipéptido funcional, y luego secuenciar los polipéptidos mutagenizados para determinar el espectro de sustituciones admisibles en cada posición. Otros métodos que se pueden utilizar incluyen la exhibición de fagos, p. ej. Lowman *et al.*, *Biochem.* 30:10832-10837 (1991); Ladner *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.223.409; Huse, Publicación de la WIPO WO 92/06204) y la mutagénesis región dirigida, Derbyshire *et al.*, *Gene* 46:145 (1986); Ner *et al.*, *DNA* 7:127 (1988).

45 Los métodos de mutagénesis tal como se han divulgado anteriormente pueden combinarse con métodos de cribaje de alta productividad para detectar la actividad de proteínas mutagenizadas clonadas en células huésped. Las valoraciones preferidas en este sentido incluyen las valoraciones de la proliferación de células y las valoraciones de unión a 50 ligandos basadas en biosensores, que se describen a continuación. Las moléculas de ADN mutagenizado que codifican proteínas activas o porciones de estas (p. ej. fragmentos de unión a ligandos) se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente con equipos modernos. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

55 Mediante el uso de los métodos analizados anteriormente, una persona con conocimientos generales de la materia puede preparar una serie de polipéptidos que sean sustancialmente idénticos a las SEC. ID. N.º 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17 ó 18 o variantes alélicas de estos y conserven las propiedades de la proteína genéticamente intacta. Como se expresa y reivindica en la presente, la expresión "un polipéptido según se define en las SEC. ID. N.º 2, 3, 4, 5, 9, 12, 17 ó 18" incluye todas las variantes alélicas y los ortólogos en especies del polipéptido.

60 Otra realización de la presente invención contempla un péptido o polipéptido que comprenden una porción portadora de epítopos de un polipéptido de la invención. El epítopo de esta porción de polipéptido es un epítopo inmunógeno o antigénico de un polipéptido de la invención. Una región de una proteína a la que se puede unir un anticuerpo se define como "epítopo antigénico". Véase, por ejemplo, Geysen, H.M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:3998-4002 (1984).

65 Con respecto a la selección de péptidos o polipéptidos que portan un epítopo antigénico (es decir, que contienen una región de una molécula de proteína a la cual se puede unir un anticuerpo), se sabe bien en la especialidad que los péptidos sintéticos relativamente cortos que imitan parte de una secuencia de proteínas son, de rutina, capaces de producir un antisero que reacciona con la proteína parcialmente imitada. Véase Sutcliffe, J.G. *et al.* *Science* 219:660-666 (1983). Los péptidos capaces de producir suero reactivo con proteínas se encuentran representados, con frecuencia, en la secuencia primaria de una proteína, pueden caracterizarse a través de una serie de principios químicos simples, y no se encuentran confinados a regiones inmunodominantes de proteínas intactas (es decir, epítopos inmunógenos) ni a los amino o carboxilo terminales. En general, los péptidos que son en extremo hidrófobos y aquellos de seis residuos o menos son ineficaces en la inducción de anticuerpos que se unen a la proteína imitada; habitualmente, los péptidos solubles más largos, en especial los que contienen residuos de prolina, son eficaces.

## ES 2 300 154 T3

Por lo tanto, los péptidos y polipéptidos antigenicos portadores de epítulos de la invención son útiles para cultivar anticuerpos, incluidos los anticuerpos monoclonales, que se unan específicamente a un polipéptido de la invención. Los péptidos y polipéptidos antigenicos portadores de epítulos de la presente invención contienen una secuencia de, al menos, nueve, preferentemente entre 15 y alrededor de 30 aminoácidos contenidos dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una porción mayor de una secuencia de aminoácidos de la invención, que contenga entre 30 y 50 aminoácidos, o que tenga cualquier longitud hasta, inclusive, la totalidad de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención también son útiles para inducir anticuerpos que reaccionen con la proteína. Preferentemente, la secuencia de aminoácidos del péptido portador de epítulos se selecciona para proporcionar una solubilidad sustancial en solventes acuosos (es decir, la secuencia incluye residuos relativamente hidrófilos, y, preferentemente, se evitan los residuos hidrófobos); y se prefieren, en particular, las secuencias que contienen residuos de prolina. Todos los polipéptidos que se muestran en la lista de secuencias contienen epítulos antigenicos para utilizar según la presente invención.

Los polinucleótidos, generalmente una secuencia de ADNc, de la presente invención codifican los polipéptidos descritos anteriormente. Una secuencia de ADNc que codifica un polipéptido de la presente invención está formada por una serie de codones; cada residuo de aminoácido del polipéptido es codificado por un codón y cada codón está compuesto por tres nucleótidos. Los residuos de aminoácidos son codificados por sus respectivos codones de la siguiente manera.

La alanina (Ala) está codificada por GCA, GCC, GCG o GCT;

La cisteína (Cys) está codificada por TGC o TGT;

El ácido aspártico (Asp) está codificado por GAC o GAT;

El ácido glutámico (Glu) está codificado por GAA o GAG;

La fenilalanina (Phe) está codificada por TTC o TTT;

La glicina (Gly) está codificada por GGA, GGC, GGG o GGT;

La histidina (His) está codificada por CAC o CAT;

La isoleucina (Ile) está codificada por ATA, ATC o ATT;

La lisina (Lys) está codificada por AAA o AAG;

La leucina (Leu) está codificada por TTA, TTG, CTA, CTC, CTG o CTT;

La metionina (Met) está codificada por ATG;

La asparragina (Asn) está codificada por AAC o AAT;

La prolina (Pro) está codificada por CCA, CCC, CCG o CCT;

La glutamina (Gln) está codificada por CAA o CAG;

La arginina (Arg) está codificada por AGA, AGG, CGA, CGC, CGG o CGT;

La serina (Ser) está codificada por AGC, AGT, TCA, TCC, TCG o TCT;

La treonina (Thr) está codificada por ACA, ACC, ACG o ACT;

La valina (Val) está codificada por GTA, GTC, GTG o GTT;

El triptófano (Trp) está codificado por TGG; y

La tirosina (Tyr) está codificada por TAC o TAT.

Debe reconocerse que, de acuerdo con la presente invención, cuando se reivindica un ADNc como se describió anteriormente, se entiende que se reivindica tanto la cadena codificante, como la cadena no codificante, y el ADN como bicatenario con las cadenas codificante y no codificante apareadas a través de sus respectivos puentes de hidrógeno. También se reivindica el ARN mensajero (ARNm) que codifica los polipéptidos de la presente invención, ARNm que es codificado por el ADNc descrito anteriormente. Un ARN mensajero (ARNm) codificará un polipéptido usando los mismos codones que los definidos anteriormente, con la excepción de que cada nucleótido timina (T) es reemplazado por un nucleótido uracilo (U).

Los polipéptidos de una proteína de la presente invención, incluidos las proteínas de longitud completa, los fragmentos de proteínas (p. ej. fragmentos de unión a receptores) y los polipéptidos de fusión, pueden producirse en células huésped genomanipuladas de acuerdo con las técnicas convencionales. Las células huésped adecuadas son aquellos tipos celulares que pueden transformarse o transfectarse con ADN exógeno y hacerse crecer en medio de cultivo, e 5 incluyen células bacterianas, células fúngicas y células eucariotas superiores cultivadas. Se prefieren las células eucariotas, en particular, las células de organismos multicelulares cultivadas. Las técnicas para manipular moléculas de ADN clonadas e introducir ADN exógeno en diversas células huésped han sido divulgadas por Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2.ª ed.)(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

10 En general, una secuencia de ADN que codifica un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 se liga operablemente a otros elementos genéticos necesarios para su expresión, entre los que generalmente se incluyen un promotor y un terminador de la transcripción, dentro de un vector de expresión. Por lo general, el vector también contendrá uno o más marcadores 15 seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los especialistas en la materia reconocerán que dentro de determinados sistemas pueden proporcionarse marcadores seleccionables en vectores separados, y la replicación del ADN exógeno puede proporcionarse mediante la integración dentro del genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una cuestión de diseño de rutina dentro de los conocimientos generales de la materia. Muchos de estos elementos se describen en la bibliografía y están disponibles a través de proveedores comerciales.

20 Para dirigir un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 hacia la vía de secreción de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal de secreción (también conocida como secuencia líder, secuencia prepro o presecuencia) en el vector de expresión. La secuencia señal de secreción puede ser la de la proteína, o puede ser derivada de otra secuencia líder de proteína segregada [p. ej. el activador tisular del plasminógeno (t-PA)] o sintetizada de *novo*. La secuencia señal de secreción está unida a la secuencia de ADN del Ztgf $\beta$ -9 en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal de secreción 25 comúnmente están en posición 5' con respecto a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, aunque determinadas secuencias señal pueden estar posicionadas en otro lugar de la secuencia de ADN de interés (véase, p. ej. Welch *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.037.743; Holland *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.143.830).

30 Las células cultivadas de mamíferos son huéspedes preferidos dentro de la presente invención. Los métodos para introducir ADN exógeno en células huésped de mamíferos incluyen la transfección mediada por fosfato de calcio, 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), la electroporación, Neumann *et al.*, *EMBO J.* 1:841-845 (1982), la transfección mediada por DEAE-dextrano, Ausubel *et al.*, ed., *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987) y la transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson *et al.*, *Focus* 15:73 (1993); Ciccarone *et al.*, *Focus* 15:80 (1993). La producción de polipéptidos recombinantes en células cultivadas de mamíferos ha sido divulgada, 35 por ejemplo, por Levinson *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.713.339; Hagen *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.784.950; Palmiter *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.579.821; y Ringold, Patente de EE. UU. N.º 4.656.134. Las células cultivadas de mamíferos adecuadas incluyen las líneas celulares COS-1 (ATCC N.º CRL 1650), COS-7 (ATCC N.º CRL 1651), BHK (ATCC N.º CRL 1632), BHK 570 (ATCC N.º CRL 10314), 293 [ATCC N.º CRL 1573; Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.* 36:59-72 (1977)] y las líneas celulares de ovario de hámster chino (p. ej. CHO-K1; ATCC N.º CCL 61). Existen otras líneas celulares adecuadas conocidas en la especialidad y que pueden obtenerse a través de depósitos públicos 40 como la Colección Estadounidense de Cultivos de Tipos, Rockville, Maryland. En general, se prefieren los promotores de la transcripción fuertes, como los promotores obtenidos del SV-40 o del citomegalovirus. Véase, p. ej. la Patente de EE. UU. N.º 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los genes de la metalotioneína (Patentes de EE. UU. N.º 4.579.821 y 4.601.978) y el principal promotor tardío del adenovirus.

45 También pueden utilizarse como huéspedes otras células eucariotas superiores, incluidas células de origen vegetal, células de insectos y células aviares. El uso de la *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar los genes en las células de origen vegetal ha sido analizado por Sinkar *et al.*, *J. Biosci. (Bangalore)* 11:47 (1987). La transformación de células de insectos y la producción de polipéptidos extraños en dichas células han sido divulgadas por Guarino *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.162.222 y Publicación de la WIPO WO 94/06463. Pueden infectarse células de insectos con baculovirus recombinante, comúnmente derivado del virus de la poliedrosis nuclear de la *Autographa californica* (*Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus, AcNPV). El ADN que codifica el polipéptido Ztgf $\beta$ -9 se inserta en el genoma baculoviral en lugar de la secuencia codificante del gen de la poliedrina del AcNPV a través de uno de dos métodos. El primero es el método tradicional de recombinación del ADN homólogo entre el AcNPV genéticamente intacto y un vector de transferencia que contenga el ADNc del Ztgf $\beta$ -9 flanqueado por las secuencias del AcNPV. Las 50 células de insectos adecuadas, p. ej. células SF9, son infectadas con el AcNPV genéticamente intacto y transfectadas con un vector de transferencia que comprende un polinucleótido del Ztgf $\beta$ -9 ligado operablemente a un promotor, terminador y secuencias flanqueantes del gen de la poliedrina del AcNPV. Véase King, L.A. y Possee, R.D., *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, (Chapman & Hall, Londres); O'Reilly, D.R. *et al.*, *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual* (Oxford University Press, Nueva York, Nueva York, 1994); y Richardson, C. D., ed., *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology*, (Humana Press, Totowa, NJ 1995). La recombinación natural dentro de una célula de insecto tendrá como consecuencia un baculovirus recombinante 55 que contiene el Ztgf $\beta$ -9 dirigido por el promotor de la poliedrina. Se elaboran lotes de virus recombinante mediante métodos utilizados comúnmente en la especialidad.

60 El segundo método para hacer baculovirus recombinante utiliza un sistema basado en transposones descrito por Luckow, V.A., *et al.*, *J. Virol.* 67:4566 (1993). Este sistema se vende en el equipo Bac-to-Bac (Life Technologies,

Rockville, MD). Este sistema utiliza un vector de transferencia, pFastBac1<sup>TM</sup> (Life Technologies), que contiene un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 a un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un gran plásmido denominado “bácmido”. El vector de transferencia pFastBac1<sup>TM</sup> utiliza el promotor de la poliedrina AcNPV para dirigir la expresión del gen de interés, en este transposición Tn7 para trasladar el ADN que codifica el caso, el Ztgf $\beta$ -9. Sin embargo, pFastBac1<sup>TM</sup> 5 puede modificarse en un grado considerable. El promotor de la poliedrina puede eliminarse y sustituirse con el promotor de la proteína básica del baculovirus (conocido también como promotor *Pcor*, p6.9 o MP), que se expresa más temprano en la infección por baculovirus y se ha demostrado que es ventajoso para expresar proteínas segregadas. Véase Hill-Perkins, M.S. y Possee, R.D., *J Gen Virol* 71:971 (1990); Bonning, B.C. *et al.*, *J Gen Virol* 75:1551 (1994); y Chazenbalk, G.D., y Rapoport, B., *J Biol Chem* 270:1543 (1995). En tales constructos de vectores de transferencia, 10 puede utilizarse una versión corta o larga del promotor de la proteína básica. Además, pueden construirse vectores de transferencia que reemplacen las secuencias señal de secreción originarias del Ztgf $\beta$ -9 con secuencias señal de secreción derivadas de proteínas de insectos. Por ejemplo, puede utilizarse una secuencia señal de secreción de la Glucosiltransferasa Ecdisteroide (Ecdysteroid Glucosyltransferase, EGT), la melitina de abeja melífera (Invitrogen, Carlsbad, CA) o el baculovirus gp67 (PharMingen, San Diego, CA) en constructos para reemplazar la secuencia señal 15 de secreción original del Ztgf $\beta$ -9. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión dentro del marco con ADN que codifica una etiqueta de un epítopo en el C- o N-terminal del polipéptido Ztgf $\beta$ -9 expresado, por ejemplo, una etiqueta de un epítopo Glu-Glu, Grussenmeyer, T. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci.* 82:7952 (1985). Utilizando una técnica conocida en la especialidad, un vector de transferencia que contiene Ztgf $\beta$ -9 se transforma en *E. coli*, y se 20 criba para detectar bácmidos que contienen un gen lacZ interrumpido que indica baculovirus recombinante. El ADN del bácmido que contiene el genoma del baculovirus recombinante se aísla utilizando las técnicas habituales, y se utiliza para transfectar las células de *Spodoptera frugiperda*, p. ej. las células Sf9. Luego, se produce el virus recombinante que expresa el Ztgf $\beta$ -9. Se elaboran lotes de virus recombinante mediante métodos utilizados comúnmente en la especialidad.

25 El virus recombinante se utiliza para infectar las células huésped, habitualmente una línea celular derivada del gusano cogollero de otoño, *Spodoptera frugiperda*. Véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, D.C. (1994). Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveO<sup>TM</sup> (Invitrogen) derivada de *Trichoplusia ni* (Patente de Estados Unidos N.º 5.300.435). Se utiliza un medio sin suero disponible comercialmente para cultivar y mantener las células. Los medios adecuados 30 son Sf900 II<sup>TM</sup> (Life Technologies) o ESF 921<sup>TM</sup> (Expression Systems) para las células Sf9; y ExcellO405<sup>TM</sup> (JRH Biosciences, Lenexa, KS) o Express FiveO<sup>TM</sup> (Life Technologies) para las células *T. ni*. Las células se cultivan desde una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5x10<sup>5</sup> células hasta una densidad de 1-2x10<sup>6</sup> células, en cuyo momento se agrega un lote de virus recombinante a una multiplicidad de infección (multiplicity of infection, MOI) 35 de 0,1 a 10, más habitualmente cerca de 3. Las células infectadas con virus recombinante habitualmente producen el polipéptido Ztgf $\beta$ -9 recombinante a las 12-72 horas después de la infección y lo segregan en el medio con una eficiencia variable. El cultivo habitualmente se cosecha 48 horas después de la infección. Se usa la centrifugación 40 para separar las células del medio (sobrenadante). El sobrenadante que contiene el polipéptido Ztgf $\beta$ -9 se filtra a través de filtros microporos de, habitualmente, 0,45  $\mu$ m de tamaño de poro. Los procedimientos utilizados se describen de manera general en los manuales de laboratorio existentes (King, L. A. and Possee, R.D., *ibid.*; O'Reilly, D.R. *et al.*, *ibid.*; Richardson, C. D., *ibid.*). La posterior purificación del polipéptido Ztgf $\beta$ -9 a partir del sobrenadante puede obtenerse usando los métodos descritos en la presente.

Generalmente, se utiliza la selección por fármaco a fin de seleccionar células cultivadas de mamíferos en las que se 45 ha introducido ADN extraño. Dichas células suelen denominarse “transfectantes”. Las células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y pueden pasar el gen de interés a su progenie se denominan “transfectantes estables”. Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica la resistencia al antibiótico neomicina. La selección se realiza en presencia de un fármaco del tipo de la neomicina, por ejemplo, el G-418 o un fármaco similar. Los sistemas de selección también pueden usarse para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, proceso conocido 50 como “amplificación”. La amplificación se realiza cultivando transfectantes en presencia de un nivel bajo del agente selectivo y luego aumentando la cantidad de agente selectivo para seleccionar las células que producen altos niveles de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable amplificable preferido es la dihidrofolato reductasa, que confiere resistencia al metotrexato. También pueden utilizarse otros genes de resistencia a fármacos (p. ej. resistencia a la higromicina, resistencia a múltiples fármacos y puromicina acetiltransferasa).

55 También pueden utilizarse como huéspedes otras células eucariotas superiores, incluidas células de insectos, células de origen vegetal y células aviares. La transformación de células de insectos y la producción de polipéptidos extraños en dichas células han sido divulgadas por Guarino *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.162.222; Bang *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.775.624; y Publicación de la WIPO WO 94/06463. El uso de la *Agrobacterium rhizogenes* como vector para expresar los genes en las células de origen vegetal ha sido analizado por Sinkar *et al.*, *J. Biosci. (Bangalore)* 11:47-58 (1987).

Las células fúngicas, incluidas las células de levaduras, y en particular las células del género *Saccharomyces*, también 60 pueden utilizarse dentro de la presente invención, por ejemplo, para producir fragmentos de proteínas o fusiones de polipéptidos. Los métodos para transformar células de levaduras con ADN exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de ellas han sido divulgados, por ejemplo, por Kawasaki, Patente de EE. UU. N.º 4.599.311; Kawasaki *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.931.373; Brake, Patente de EE. UU. N.º 4.870.008; Welch *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.037.743; y Murray *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.845.075. Las células transformadas se seleccionan por fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente la resistencia a los fármacos o la capacidad de

crecer en ausencia de un nutriente en particular (p. ej. leucina). Un sistema de vectores preferido para usar en levaduras es el sistema de vectores *POT1* divulgado por Kawasaki *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.931.373, que permite seleccionar las células transformadas por crecimiento en un medio que contiene glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para usar en levaduras incluyen los de los genes de enzimas glucolíticas (véase, p. ej. Kawasaki, Patente de EE. UU. N.º 4.599.311; Kingsman *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.615.974; y Bitter, Patente de EE. UU. N.º 4.977.092) y genes de la alcohol deshidrogenasa. Véase también las Patentes de EE. UU. N.º 4.990.446; 5.063.154; 5.139.936 y 4.661.454. En la especialidad, se conocen los sistemas de transformación para otras levaduras, incluidas *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*. Véase, por ejemplo, Gleeson *et al.*,

- 5 10 15 *J. Gen. Microbiol.* 132:3459-3465 (1986) y Cregg, Patente de EE. UU. N.º 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* según los métodos de McKnight *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.935.349. Los métodos para transformar *Acremonium chrysogenum* han sido divulgados por Sumino *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.162.228. Los métodos para transformar *Neurospora* han sido divulgados por Lambowitz, Patente de EE. UU. N.º 4.486.533.

15 Las células huésped procariotas, incluidas las cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros, también son células huésped útiles dentro de la presente invención. Las técnicas para transformar estos huéspedes y expresar las secuencias de ADN extraño clonadas en dichos huéspedes son bien conocidas en la especialidad (véase, p. ej. Sambrook *et al.*, *ibid.*). Cuando se expresa un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 en bacterias, por ejemplo, *E. coli*, el polipéptido puede ser retenido en el citoplasma, habitualmente en forma de gránulos insolubles, o puede ser dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células se lisan, se recuperan los gránulos y se los desnaturaliza con, por ejemplo, isotiocianato de guanidina o urea. El polipéptido desnaturalizado luego puede replegarse y dimerizarse diluyendo el desnaturalizante, por ejemplo, por diálisis contra una solución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguida de diálisis contra una solución salina amortiguada. En el último caso, el polipéptido puede recuperarse del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional alterando las células (por ejemplo, por sonicación o choque osmótico) para liberar el contenido del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviando así la necesidad de desnaturalizar y replegar.

20 25 30 35 Las células huésped transformadas o transfectadas se cultivan de acuerdo con los procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes necesarios para el crecimiento de las células huésped elegidas. Se conocen en la especialidad diversos medios adecuados, incluidos los medios definidos y medios complejos, que generalmente incluyen una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios también pueden contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según sea necesario. El medio de crecimiento generalmente selecciona células que contienen el ADN agregado en forma exógena por, a modo de ejemplo, selección por fármaco o por deficiencia en un nutriente esencial, que es complementado por el marcador seleccionable transportado en el vector de expresión o cotransfектado en la célula huésped.

40 Dentro de un aspecto de la presente invención, una célula cultivada produce una proteína nueva, y la célula o la proteína se usa para cribar un receptor o receptores para la proteína, incluido el receptor natural, como también las proteínas interactuantes tales como unidades de dimerización, agonistas y antagonistas del ligando natural.

#### *Aislamiento de proteínas*

45 Los polipéptidos recombinantes expresados (o polipéptidos químicos) pueden purificarse mediante fraccionamiento y/o métodos y medios convencionales de purificación. Pueden utilizarse la precipitación con sulfato de amonio y la extracción con ácido o iones caotrópicos para fraccionar las muestras. Los ejemplos de pasos de purificación pueden incluir hidroxiapatita, exclusión por tamaño, cromatografía líquida de rápido rendimiento (fast performance liquid chromatography, FPLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento con inversión de fases. Los medios de intercambio aniónico adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices especiales y similares. Se prefieren los derivados polietilenimina (polyethyleneimine, PEI), dietilaminoetanol (diethylaminoethanol, DEAE), aminoetanol cuaternario (quaternary aminoethanol, QAE) y cuaternarios (quaternary, Q), siendo preferido, en particular, la sefarosa de flujo rápido con DEAE (Pharmacia, Piscataway, NJ). Los ejemplos de medios cromatográficos incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, por ejemplo, Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) y similares; 50 55 60 65 o resinas poliacríticas, por ejemplo, Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas a base de sílice, resinas celulosicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa entrecruzada, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida entrecruzada y similares, que son insolubles en las condiciones en las que se los utilizará. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o fracciones de carbohidratos. Los ejemplos de las químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida y derivados carboxilo y amino para las químicas de acoplamiento con carbodiimidas. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos, su uso está ampliamente difundido en la especialidad y se pueden adquirir a través de proveedores comerciales. Los métodos para la unión de polipéptidos del receptor al medio de soporte son bien conocidos en la especialidad. La selección de un método en particular es una cuestión de diseño de rutina y está 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 aislararse por explotación de sus propiedades. Por ejemplo, la cromatografía por adsorción a iones metálicos inmovilizados (immobilized metal ion adsorption, IMAC) puede utilizarse para purificar las proteínas ricas en histidina. En resumen, primero se carga un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelado [E. Sulkowski, *Trends in Biochem. 3:1-7 (1985)*]. Las proteínas ricas en histidina son adsorbidas en esta matriz con diferentes afinidades, según el ión metálico utilizado, y serán eluidas por elución competitiva, reduciendo el pH o utilizando agentes quelantes fuertes. Otros métodos de purificación incluyen la purificación de proteínas glucosiladas por cromatografía de afinidad a la lectina y cromatografía de intercambio iónico [*Methods in Enzymol., Vol. 182:529-39, "Guide to Protein Purification"*, M. Deutscher, (ed.), (Acad. Press, San Diego, 1990)]. Como alternativa, puede construirse una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad (p. ej. polihistidina, 5 proteína de unión a maltosa, un dominio de la inmunoglobulina) para facilitar la purificación. Además, para facilitar la purificación del polipéptido segregado, una extensión amino o carboxilo terminal, por ejemplo, una etiqueta de polihistidina, sustancia P, péptido FLAG® [Hopp *et al.*, *Bio/Technology 6:1204-1210 (1988)*, que pueden obtenerse en Eastman Kodak Co., New Haven, CT], una etiqueta de afinidad Glu-Glu [Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4 (1985)*], u otro polipéptido o proteína para la cual exista un anticuerpo u otro agente de unión 10 específica, puede fusionarse con el Ztgfβ para ayudar en la purificación.

15

También pueden generarse ratones genomanipulados para que expresen el gen del Ztgfβ-9, denominados "ratones transgénicos", y ratones que exhiben una ausencia completa de la función del gen del Ztgfβ-9, denominados "ratones knockout" (Snouwaert *et al.*, *Science, 257:1083 (1992)*; Lowell, *et al.*, *Nature, 366:740-742 (1993)*; Capecchi, M.R., *Science, 244:1288-1292, (1989)*; Palmiter, R.D. *et al.*, *Annu. Rev. Genet., 20:465-499, (1986)*). Por ejemplo, los ratones transgénicos que sobreexpresan el Ztgfβ-9 ya sea de manera ubicua o bajo un promotor específico para un tejido o restringido a un tejido, pueden utilizarse para determinar si la sobreexpresión causa un fenotipo. Por ejemplo, la sobreexpresión de un polipéptido Ztgfβ-9 genéticamente intacto, un fragmento del polipéptido o un mutante de dicho polipéptido puede alterar los procesos celulares normales que provoca un fenotipo que identifica un tejido en el que 20 la expresión del Ztgfβ-9 es funcionalmente relevante y puede indicar un objetivo terapéutico para la proteína, el gen o los agonistas o antagonistas del Ztgfβ-9. Además, dicha sobreexpresión puede tener como consecuencia un fenotipo que muestra similitud con las enfermedades humanas. De manera similar, los ratones knockout del Ztgfβ-9 pueden utilizarse para determinar dónde es absolutamente necesario el Ztgfβ-9 *in vivo*. El fenotipo de los ratones knockout predice los efectos *in vivo* de un antagonista del Ztgfβ-9. El ADNc del Ztgfβ-9 humano puede usarse para aislar 25 ARNm, ADNc y ADN genómico del Ztgfβ-9 murino, que se utilizan posteriormente para generar ratones knockout o transgénicos. Estos ratones pueden emplearse para estudiar el gen del Ztgfβ-9 y la proteína codificada por este en un sistema *in vivo*, y pueden utilizarse como modelos *in vivo* para las enfermedades humanas correspondientes. Además, la expresión de polinucleótidos no codificantes del Ztgfβ-9 o ribozimas dirigidas contra el Ztgfβ-9 o anticuerpos contra 30 el Ztgfβ-9 de una sola cadena en ratones transgénicos pueden utilizarse para dilucidar más la biología del Ztgfβ-9.

35

#### Usos

Los análisis Northern blot de la expresión del Ztgfβ-9 revelan que el Ztgfβ-9 se expresa altamente en el cerebro y la médula espinal. Por lo tanto, el Ztgfβ-9 puede cumplir una función en el mantenimiento de la médula espinal que 40 involucre células gliales o neuronas. Esto indica que el Ztgfβ-9 puede usarse para tratar una serie de enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica (amyotrophic lateral sclerosis, ALS), la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y neuropatías periféricas, o enfermedades desmielinizantes incluida la esclerosis múltiple. La especificidad tisular de la expresión del Ztgfβ-9 sugiere que el Ztgfβ-9 puede ser un factor de crecimiento y/o mantenimiento en la médula espinal y el cerebro que puede usarse para 45 tratar lesiones de la médula espinal, el cerebro o el sistema nervioso periférico. El Ztgfβ-9 también puede administrarse para tratar una infección viral.

La presente invención también proporciona reactivos con significativo valor terapéutico. El polipéptido Ztgfβ-9 (natural o recombinante), sus fragmentos, anticuerpos y anticuerpos antiidiotípicos, junto con compuestos que se identificó que tienen afinidad de unión al polipéptido Ztgfβ-9, deberían ser útiles en el tratamiento de condiciones asociadas con el desarrollo o la fisiología anormales, incluida la proliferación anormal, p. ej. condiciones cancerosas o degenerativas. Por ejemplo, una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión anormal o la señalización anormal por un polipéptido Ztgfβ-9 debería ser un objetivo probable para un agonista o antagonista del polipéptido Ztgfβ-9. En particular, el Ztgfβ-9 puede usarse para tratar la inflamación. La inflamación es el resultado de una respuesta inmunitaria a 55 una infección o una respuesta autoinmunitaria a un antígeno propio.

Los anticuerpos contra el polipéptido Ztgfβ-9 pueden ser purificados y luego administrados a un paciente. Estos reactivos pueden combinarse para uso terapéutico con ingredientes inertes o activos adicionales, p. ej. en diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables junto con excipientes y estabilizadores fisiológicamente inocuos. Estas combinaciones pueden ser filtradas con filtros estériles y colocadas en formas de dosis como a través de la liofilización en viales de dosis o el almacenamiento en preparaciones acuosas estabilizadas. Esta invención también contempla el uso de anticuerpos, fragmentos de unión de estos o anticuerpos de una sola cadena de los anticuerpos, incluidas las formas que no se unen al complemento.

65 Las cantidades de reactivos necesarias para una terapia eficaz dependerán de muchos factores diferentes, incluidos el medio de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente y otros medicamentos administrados. Por ende, las posologías de los tratamientos deben ser ajustadas para optimizar la seguridad y la eficacia. Habitualmente, las posologías utilizadas *in vitro* pueden proporcionar una guía útil con respecto a las cantidades útiles para la ad-

ministración *in vivo* de estos reactivos. Las pruebas de dosis eficaces en animales para el tratamiento de trastornos particulares proporcionarán más indicaciones predictivas acerca de la dosis en humanos. Los métodos de administración incluyen la vía oral, intravenosa, peritoneal, intramuscular o transdérmica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluirán agua, solución salina o soluciones amortiguadoras, entre otros. Se preverá que los rangos de dosis

5 comúnnemente oscilarán entre 1  $\mu$ g y 1.000  $\mu$ g por kilogramo de peso corporal por día. Sin embargo, las dosis pueden ser superiores o inferiores según pueda determinar un médico con conocimientos generales de la materia. Para un análisis completo de las formulaciones farmacológicas y los rangos de dosis, véase *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17.<sup>a</sup> ed., (Mack Publishing Co., Easton, Penn., 1990) y *Goodman y Gilman: The Pharmacological Bases of Therapeutics*, 9.<sup>a</sup> ed. (Pergamon Press 1996).

10 *Tratamiento terapéutico basado en ácidos nucleicos*

Si un mamífero tiene un gen del Ztgf $\beta$ -9 mutado o carece de él, el gen del Ztgf $\beta$ -9 puede introducirse en las células del mamífero. En una realización, un gen que codifica un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 se introduce *in vivo* en un vector viral.

15 Dichos vectores incluyen un virus con ADN atenuado o defectuoso, como, entre otros, el virus herpes simple (herpes simplex virus, HSV), el virus del papiloma, el virus de Epstein Barr (Epstein Barr virus, EBV), el adenovirus, el virus adenoasociado (adeno-associated virus, AAV), el SV40 y similares. Se prefieren los virus defectuosos, que carecen de genes virales en forma total o casi total. Un virus defectuoso no es infeccioso después de la introducción en una célula. El uso de vectores virales defectuosos permite la administración a células de un área localizada en particular, 20 sin la preocupación de que el vector pueda infectar otras células. Los ejemplos de vectores particulares incluyen, entre otros, un vector del virus herpes 1 (HSV1) defectuoso [Kaplitt *et al.*, *Molec. Cell. Neurosci.*, 2:320-330 (1991)], un vector del adenovirus atenuado, como el vector descrito por Stratford-Perricaudet *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 90:626-630 (1992), y un vector del virus adenoasociado defectuoso [Samulski *et al.*, *J. Virol.*, 61:3096-3101 (1987); Samulski *et al.* *J. Virol.*, 63:3822-3828 (1989)].

25 En otra realización, el gen puede introducirse en un vector retroviral, p. ej. según se describe en Anderson *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.399.346; Mann *et al.*, *Cell*, 33:153 (1983); Temin *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.650.764; Temin *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.980.289; Markowitz *et al.*, *J. Virol.*, 62:1120 (1988); Temin *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.124.263; Publicación de patente internacional N.º WO 95/07358, publicada el 16 de marzo de 1995 por Dougherty *et al.*; y *Blood*, 82:845 (1993).

30 Como alternativa, el vector puede introducirse mediante lipofección *in vivo* utilizando liposomas. Pueden utilizarse lípidos catiónicos sintéticos para preparar los liposomas para la transfección *in vivo* de un gen que codifica un marcador [Feigner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:7413-7417 (1987); véase Mackey *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8027-8031 (1988)]. El uso de la lipofección para introducir genes exógenos en órganos específicos *in vivo* tiene determinadas ventajas prácticas. La dirección molecular de liposomas a células específicas representa una de las áreas de beneficio. Resulta claro que la dirección de la transfección a tipos celulares específicos sería particularmente ventajosa en un tejido con heterogeneidad celular, por ejemplo, el páncreas, el hígado, el riñón y el cerebro. Los lípidos pueden acoplarse químicamente a otras moléculas a los fines de conferir la dirección. Los péptidos dirigidos, p. ej. las hormonas o los neurotransmisores, las proteínas, por ejemplo, los anticuerpos, o las moléculas no peptídicas podrían acoplarse químicamente a los liposomas.

35 Es posible extraer las células del cuerpo e introducir el vector como plásmido de ADN desnudo o a través de un vector viral y, luego, implantar nuevamente las células transformadas en el cuerpo. El vector de ADN desnudo para terapia génica puede introducirse en las células huésped deseadas mediante métodos conocidos en la especialidad, p. ej. transfección, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE dextrano, precipitación con fosfato de calcio, el uso de una pistola génica o el uso de un transportador de vectores de ADN [véase, p. ej. Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 267:963-967 (1992); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624 (1988)]. Pueden usarse técnicas tales como la entrega génica mediada por vectores virales del Ztgf $\beta$ -9 para tratar enfermedades humanas, por ejemplo, cáncer, enfermedades inmunitarias y autoinmunitarias, y enfermedades del sistema nervioso central y periférico.

40 Los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9 también pueden usarse para preparar anticuerpos que se unan específicamente a los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9. Estos anticuerpos pueden luego usarse para la fabricación de anticuerpos antiidiotípicos. Tal como se usa en la presente, el término "anticuerpos" incluye anticuerpos policlónicos, anticuerpos monoclonales, fragmentos de unión a antígenos de estos, como los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fab, y similares, incluidos los anticuerpos genomanipulados. Se dice que los anticuerpos se unen específicamente si se unen a un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 con una K<sub>a</sub> equivalente a 10<sup>7</sup>/M o superior y no se unen sustancialmente a un polipéptido que se encontraba en dominio público con anterioridad a la presente. Una persona con conocimientos generales de la materia puede determinar con facilidad la afinidad de un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, utilizando el análisis de Scatchard.

45 Los métodos para preparar anticuerpos monoclonales y policlónicos son bien conocidos en la especialidad (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Segunda edición) (Cold Spring Harbor, NY, 1989); y Hurrell, J. G. R., ed., *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications* (CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982). Se pueden generar anticuerpos policlónicos mediante la inoculación de una serie de animales de sangre caliente, como caballos, vacas, cabras, ovejas, perros, pollos, conejos, ratones, hámsters, cobayas y ratas, con un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 o un fragmento de este. La inmunogenicidad de un polipéptido Ztgf $\beta$ -9 puede aumentarse mediante el uso de un adyuvante, por ejemplo, el alum (hidróxido de aluminio) o el adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para la inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales

como fusiones del Ztgf $\beta$ -9 o de una porción de este con un polipéptido de inmunoglobulina o con una proteína de unión a maltosa. El inmunógeno del polipéptido puede ser una molécula de longitud completa o una porción de esta. Si la porción del polipéptido es de “tipo hapteno”, dicha porción puede unirse o ligarse ventajosamente a un vehículo macromolecular (como la hemocianina de lapa californiana (keyhole limpet hemocyanin, KLH), la albúmina de suero bovino (bovine serum albumin, BSA) o el toxoide tetánico) para inmunización. Puede utilizarse una serie de valoraciones conocidas para los especialistas en la materia para detectar anticuerpos que se unan específicamente a los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9. Se describen detalladamente ejemplos de valoraciones en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane (ed.), (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). Los ejemplos representativos de dichas valoraciones incluyen: inmunoelectroforesis concurrente, radioimmunovaloraciones, radioinmunoprecipitados, valoraciones con sustancias immunoabsorbentes unidas a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assays, ELISA), valoraciones de transferencia puntual, valoraciones de inhibición o competencia, y valoraciones tipo sándwich.

Tal como se usa en la presente, el término “anticuerpos” incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos policlonales purificados por afinidad, anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígenos, por ejemplo, los fragmentos proteolíticos F(ab') $_2$  y Fab. También están incluidos los anticuerpos intactos o los fragmentos producidos por geno-manipulación, como los anticuerpos quiméricos, los fragmentos Fv, anticuerpos de una sola cadena y similares, así como péptidos y polipéptidos sintéticos de unión a antígenos. Pueden humanizarse anticuerpos no humanos injertando regiones determinantes de complementariedad (complementarity-determining region, CDR) no humanas en regiones marco y constantes humanas, o incorporando la totalidad de los dominios variables no humanos (opcionalmente “rodéandolos” con una superficie similar a la humana mediante el reemplazo de los residuos expuestos, donde el resultado es un anticuerpo “revestido”). En algunos casos, los anticuerpos humanizados pueden retener residuos no humanos dentro de los dominios marco de la región variable humana, a fin de aumentar las características de unión adecuadas. A través de la humanización de los anticuerpos, puede aumentarse la vida media biológica, y se reduce la posibilidad de que se produzcan reacciones inmunitarias adversas en la administración a seres humanos. Los anticuerpos humanos pueden generarse en ratones genomanipulados para que contengan loci de la inmunoglobulina humana, Vaughan, *et al. Nat. Biotech.*, 16:535-539 (1998).

Las técnicas alternativas para generar o seleccionar anticuerpos útiles en la presente incluyen la exposición de linfocitos *in vitro* a la proteína o el péptido Ztgf $\beta$ -9, y la selección de bibliotecas de exhibición de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, mediante el uso de una proteína o un péptido Ztgf $\beta$ -9 inmovilizado o marcado). Los genes que codifican polipéptidos que tienen posibles dominios de unión del polipéptido Ztgf $\beta$ -9 pueden obtenerse cribando al azar bibliotecas peptídicas exhibidas en fagos (exhibición de fagos) o en bacterias, por ejemplo, *E. coli*. Las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos pueden obtenerse de una serie de maneras, por ejemplo, a través de mutagénesis aleatoria y de síntesis aleatoria de polinucleótidos. Estas bibliotecas de exhibición de péptidos aleatorios pueden usarse para cribar péptidos que interactúen con una diana conocida que puede ser una proteína o un polipéptido, por ejemplo, un ligando o un receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. Las técnicas para crear y cribar dichas bibliotecas de exhibición aleatoria de péptidos son conocidas en la especialidad (Ladner *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.223.409; Ladner *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 4.946.778; Ladner *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.403.484 y Ladner *et al.*, Patente de EE. UU. N.º 5.571.698) y las bibliotecas de exhibición aleatoria de péptidos y los equipos para cribar dichas bibliotecas se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo, de Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Las bibliotecas de exhibición aleatoria de péptidos pueden cribarse con las secuencias del Ztgf $\beta$ -9 divulgadas en la presente para identificar las proteínas que se unen al Ztgf $\beta$ -9. Estas “proteínas de unión” que interactúan con los polipéptidos Ztgf $\beta$ -9 pueden utilizarse para etiquetar las células; para aislar polipéptidos homólogos mediante purificación por afinidad; pueden conjugarse directa o indirectamente con fármacos, toxinas, radionúclidos y similares. Estas proteínas de unión también pueden utilizarse en métodos analíticos, por ejemplo, para cribar genotecas de expresión y neutralizar la actividad. Las proteínas de unión también pueden utilizarse para valoraciones de diagnóstico a fin de determinar los niveles circulantes de polipéptidos; para detectar o cuantificar polipéptidos solubles como marcadores de la patología o enfermedad subyacente. Estas proteínas de unión también pueden actuar como “antagonistas” del Ztgf $\beta$ -9 para bloquear la unión del Ztgf $\beta$ -9 y la transducción de señales *in vitro* e *in vivo*.

Los anticuerpos también se pueden generar mediante terapia génica. Al animal se le administra el ADN o ARN que codifica el Ztgf $\beta$ -9 o un fragmento inmunógeno de este para que las células de los animales se transfecen con el ácido nucleico y expresen la proteína, que, a su vez, produce una respuesta inmunogénica. Los anticuerpos producidos luego por el animal se aislan en forma de anticuerpos monoclonales o policlonales. Los anticuerpos contra el Ztgf $\beta$ -9 pueden utilizarse para etiquetar células que expresan la proteína, para la purificación por afinidad, dentro de las valoraciones de diagnóstico a fin de determinar los niveles circulantes de polipéptidos de proteínas solubles, y como antagonistas para bloquear la unión a ligandos y la transducción de señales *in vitro* e *in vivo*.

El mapeo de híbridos de radiación es una técnica genética con células somáticas desarrollada para construir mapas contiguos de alta resolución de los cromosomas de mamíferos [Cox *et al.*, *Science* 250:245-250 (1990)]. El conocimiento parcial o total de la secuencia de un gen permite diseñar los cebadores para PCR adecuados para el uso con paneles de mapeo de híbridos de radiación cromosómicos. Pueden obtenerse paneles de mapeo de híbridos de radiación que abarcan todo el genoma humano y que se encuentran comercialmente disponibles, por ejemplo, el Panel de híbridos de radiación Stanford G3 y el Panel de híbridos de radiación GeneBridge 4 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). Estos paneles permiten localizaciones cromosómicas rápidas, basadas en la PCR, y la ordenación de los genes, los sitios etiquetados por su secuencia (sequence-tagged sites, STS), y otros marcadores polimórficos

## ES 2 300 154 T3

y no polimórficos dentro de una región de interés. Esto incluye el establecimiento de distancias físicas directamente proporcionales entre los genes de interés recientemente descubiertos y los marcadores mapeados previamente. El conocimiento preciso de la posición de un gen puede ser útil de varias maneras, entre las que se incluyen: 1) determinar si una secuencia es parte de una contig existente y obtener secuencias genéticas circundantes adicionales en diversas 5 formas, como clones genómicos de YAC-, BAC- o fagos o clones de ADNc, 2) proporcionar un posible gen candidato para una enfermedad hereditaria que muestre una conexión con la misma región cromosómica, y 3) usar como referencia cruzada organismos modelo, como el ratón, que puedan ayudar a determinar qué función puede tener un gen en particular.

10 La presente invención también proporciona reactivos que serán de utilidad en aplicaciones de diagnóstico. Por ejemplo, el gen del Ztgf $\beta$ -9 ha sido mapeado en el cromosoma 13q11.2-q11. Podría utilizarse una sonda de ácido nucleico del Ztgf $\beta$ -9 para detectar la presencia de anomalías en el cromosoma 13. Por ejemplo, una sonda que comprende ADN o ARN del Ztgf $\beta$ -9 o una subsecuencia de estos, puede utilizarse para determinar si el gen del Ztgf $\beta$ -9 está presente en el cromosoma humano 13q11.2-q11 o si se ha producido una mutación. Las aberraciones 15 cromosómicas detectables en el locus del gen del Ztgf $\beta$ -9 incluyen, entre otros, aneuploidía, cambios en la cantidad de copias del gen, inserciones, eliminaciones, cambios en los sitios de restricción y reorganizaciones. Dichas aberraciones pueden detectarse usando los polinucleótidos de la presente invención empleando técnicas de genética molecular, tales como análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLP), el análisis de las repeticiones cortas en tandem (short tandem repeat, STR) con técnicas de PCR, y otras 20 técnicas de análisis de enlace genético conocidas en la especialidad. El Ztgf $\beta$ -9 humano se localiza por mapeo en la región 13q11.2-q11. El Ztgf $\beta$ -9 de ratón se localiza por mapeo a los marcadores de marco del cromosoma 14 de ratón d14mit64 y dmit82 ubicados en los 22,0 y 19,5 centimorgans, respectivamente. La región de 19,5 cm parece ser sintética con el locus humano que contiene los genes de uniones gap *gja3* y *gjb2*. Véase Mignon, C. et al., *Cytogenet. Cell Genet.* 72:185-186 (1996).

25 30 Se exemplifica aún más la invención a través de los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplo 1

#### Clonación del Ztgf $\beta$ -9

El Ztgf $\beta$ -9 humano fue aislado a partir de una genoteca plasmídica de ADNc de la glándula pituitaria ordenada mediante cribaje con PCR usando las SEC. ID. N.º 6 y 7. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: 35 un ciclo a 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 62°C durante 20 segundos, 72°C durante 30 segundos, un ciclo a 72°C durante 5 minutos, seguidos de un mantenimiento a 4°C. Las reacciones fueron sometidas a electroforesis en gel para identificar los agrupamientos positivos y, de esta forma, la genoteca fue devolvió a un agrupamiento de clones positivos. Estos se electroporaron en células de *E. coli* DH10B y se sembraron en placas para la hibridación de colonias. Las colonias se transfirieron a filtros Hybond N (Amersham), y 40 se utilizaron sondas para detectar colonias positivas. Los clones positivos se secuenciaron para el Ztgf $\beta$ -9 de longitud completa.

El análisis de secuencias y la traducción conceptual del ADNc del Ztgf $\beta$ -9 humano (SEC. ID. N.º 1 y 16) predice un producto proteico que tiene 202 residuos de aminoácidos de longitud. Esta proteína es homóloga a dos miembros 45 de la familia de la IL-17, Zcyto7, Aplicación internacional N.º PCT/US98/08212, y la IL-17. El Ztgf $\beta$ -9 comparte una identidad de aminoácidos del 27,8% con el Zcyto7 y una identidad del 20,6% con la IL-17 según se determinó mediante el método Clustal usando el software Lasergene MegAlign. Véase Higgins y Sharp, *CABIOS* 5:151 (1989). En particular, el Ztgf $\beta$ -9 comparte cuatro cisteínas conservadas (residuos de aminoácidos 114, 119, 167, 169 en la 50 SEC. ID. N.º 2) con el Zcyto7 y la IL-17. Se predice que estas cisteínas participan en la formación de un pliegue de proteínas de tipo nudo de cisteínas que se relaciona con el que se encuentra en las proteínas TGF- $\beta$ .

### Ejemplo 2

#### Ánalisis Northern del Ztgf $\beta$ -9

El análisis de la distribución tisular se realizó mediante la técnica de análisis Northern blot usando 2 blots para cerebro humano adulto y 1 blot para cerebro humano fetal, análisis de transferencia puntual Master y blot de tejidos múltiples humanos de Clontech (Palo Alto, Ca). Se obtuvo una sonda mediante PCR utilizando las SEC. ID. N.º 6 y 7, en un agrupamiento de ADNc. Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: un ciclo a 94°C durante 3 minutos, 35 ciclos a 94°C durante 10 segundos, 66°C durante 20 segundos, 72°C durante 30 segundos, un ciclo a 72°C durante 5 minutos, seguidos de un mantenimiento a 4°C. La mezcla de reacción se sometió a electroforesis en un gel de agarosa preparativo y se purificó con gel un fragmento de 162 pb utilizando reactivos de purificación con gel disponibles comercialmente y protocolo (Equipo de extracción de gel QIAEX II; Qiagen, Inc., Santa Clarita, Ca). El 60 ADN purificado se marcó radiactivamente con  $^{32}$ P utilizando un equipo comercialmente disponible (sistema de marcación de ADN Rediprime; Amersham Corp., Arlington Heights, IL). La sonda se purificó con una columna de empuje NUCTRAP (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA). Se utilizó la solución EXPRESSHYB (Clonetech, Palo Alto, CA) para la prehibridación e hibridación. La solución de hibridación estaba compuesta de 8 ml de EXPRESSHYB,

## ES 2 300 154 T3

80  $\mu$ l de ADN de esperma de salmón fragmentado (10 mg/ml, 5 Prime-3 Prime, Boulder, CO), 48  $\mu$ l del ADN Cot-1 humano (1 mg/ml, GibcoBRL) y 18  $\mu$ l de sonda marcada radiactivamente. La hibridación se realizó de un día para el otro a 50°C y luego se lavaron los blot en 2X SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente, luego, 2X SSC, SDS al 0,1% a 60°C, seguido de lavado de 0,1X SSC, SDS al 0,1% a 60°C. Los blot se expusieron de un día para el otro y se desarrollaron. Se observó una señal de transcripto importante en los northern blot de tejidos múltiples (multiple tissue Northern, MTN) en el cerebro y la médula espinal.

Las señales del análisis de transferencia puntual Master fueron fuertes en todos los tejidos cerebrales (de adultos y fetos), la médula espinal, el corazón, el músculo esquelético, el estómago, el páncreas, la glándula suprarrenal, la glándula salival, el hígado, el intestino delgado, la médula ósea, el timo, el bazo, los ganglios linfáticos, el corazón, la tiroides, la tráquea, los testículos, los ovarios y la placenta.

### Ejemplo 3

#### 15 *Clonación del Ztg $\beta$ -9 murino*

La secuencia de longitud completa se obtuvo a partir de un clon aislado de una genoteca de ADNc/plasmídica de testículo de ratón ordenada. La genoteca se cribó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos de las SEC. N.º 20 10 y SEC. ID. N.º 11. La genoteca se deconvolucionó hasta reducirse en un agrupamiento positivo de 250 clones. Se transformaron células de *E. coli* DH10B (Gibco BRL) con este agrupamiento mediante electroporación. El cultivo transformado se tituló y se ordenó en 96 pocillos a ~20 células/pocillo. Las células se cultivaron en LBamp de un día para el otro a 37°C. Una alícuota de las células se sedimentó, y se utilizó PCR para identificar un agrupamiento positivo. Las células restantes de un agrupamiento positivo se sembraron en placas, y las colonias se cribaron 25 mediante PCR para identificar un clon positivo. El clon se secuenció y contenía la secuencia de longitud completa putativa del Ztg $\beta$ -9 murino. La secuencia del Ztgfbeta-9 murino se encuentra definida por las SEC. ID. N.º 8 y 9.

### 30 Ejemplo 4

#### *Análisis Northern del Ztg $\beta$ -9 de ratón*

También se realizó análisis Northern en blot MTN de ratón y análisis de transferencia puntual Master (Clontech) 35 y en un blot de embrión de ratón. Se digirió un clon de ADNc del Ztg $\beta$ -9 murino de longitud completa (véase sección de clonación) con enzimas de restricción con ApaI y EcoRI siguiendo los protocolos estándar. La reacción fue sometida a electroforesis en gel, y el fragmento ~686 pb se purificó con gel utilizando el equipo de purificación con gel Qiaex II (Qiagen, Valencia, CA). El ADNc se marcó con P32 con el equipo de marcación Rediprime II (Amersham) y se purificó en columna utilizando reactivos y protocolos anteriormente descritos. La hibridación, el lavado y la 40 detección se realizaron en las condiciones descritas en el Ejemplo 2. Se observó una banda en el corazón, el cerebro, los pulmones, el hígado, el músculo esquelético, los riñones y los testículos. El análisis de transferencia puntual Master presentó señales fuertes en la tiroides y señales más débiles en la mayoría de los otros tejidos. La hibridación al blot de embrión de ratón indicó que el Ztg $\beta$ -9 se expresó en todos los estadios examinados (días embrionarios 7, 11, 15 y 17).

45 A través de la RT-PCR cuantitativa, se determinó que el Ztg $\beta$ -9 murino fue altamente expresado en la línea celular hipotalámica HCL y, a niveles inferiores, en las líneas celulares hipotalámicas GT1-1 y GT1-7 y la línea celular teratocarcinoma P19 no diferenciada. Cuando se utilizó RT-PCR cuantitativa, el Ztg $\beta$ -9 murino se detectó en neuronas de la corteza olfativa y cerebelosa del hipocampo; las células de Purkinje y otras poblaciones neuronales se 50 marcaron en alto grado en los cortes de cerebro. El endotelio del plexo coroideo también fue positivo en alto grado. En la médula espinal, la marcación se limitó a la materia gris y pareció encontrarse de manera uniforme en las neuronas del asta posterior y anterior que representan las neuronas motoras y sensitivas. También se observó una fuerte expresión en los ganglios de la raíz dorsal.

### 55 Ejemplo 5

#### *Producción de anticuerpos*

60 Se sintetizaron los polipéptidos de las SEC. ID. N.º 13, 14 y 15 y se inyectaron en conejos, y los antisueros policlonales fueron posteriormente purificados por afinidad mediante cromatografía de columna utilizando el inmunógeno cognado. Además, las proteínas de fusión entre el Ztg $\beta$  de ratón y humano de longitud completa fusionadas con el C terminal de la proteína de unión a maltosa se expresaron en *E. coli* y se purificaron por cromatografía de afinidad sobre una resina de amilosa. Las proteínas purificadas se inyectaron en conejos y los antisueros policlonales 65 fueron posteriormente purificados por afinidad mediante cromatografía de columna utilizando el inmunógeno cognado.

## Ejemplo 6

*Inmunocitoquímica*

5 Los anticuerpos policlonales purificados por afinidad contra el Ztgf $\beta$ -9 humano producidos según el procedimiento del Ejemplo 5 fueron validados en células COS normales y células COS transfectadas con un constructo de la expresión celular en mamíferos del Ztgf $\beta$ -9. La inmunocitoquímica realizada con anticuerpos contra el Ztgf $\beta$ -9 demostró la expresión del Ztgf $\beta$ -9 en el cerebro y la médula espinal de mono. La tinción inmunocitoquímica fue intracitoplásica y se observó en muchas neuronas de gran tamaño y células de Purkinje. Las células epiteliales dispersas en el duodeno  
10 humano también mostraron tinción positiva.

## Ejemplo 7

15 *Producción de proteínas de células de mamíferos*

La proteína Ztgf $\beta$ -9 humana, con y sin una etiqueta de afinidad Glu-Glu C terminal [Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952-4 (1985)], se expresó en células BHK con un vector de expresión en el cual la expresión del Ztgf $\beta$ -9 es dirigida por el promotor temprano inmediato del CMV, un intrón consenso de la región variable del locus de la cadena pesada de la inmunoglobulina de ratón, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias codificantes, un codón de terminación y un terminador de la hormona de crecimiento humana. El plásmido también tiene un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcadores seleccionables de mamíferos que comprende un promotor, un potenciador y un origen de replicación del SV40, un gen DHFR y el terminador del SV40; y las secuencias Kozac en el extremo 5' del marco de lectura abierto.

25 Después de la selección para transfectantes celulares estables, el medio aislado a partir de los agrupamientos se analizó mediante el método Western blot en condiciones de reducción y de no reducción utilizando un anticuerpo contra el Ztgf $\beta$ -9 o un anticuerpo de etiqueta de epítopo anti-EE. Se determinó que el Ztgf $\beta$ -9 humano migra en condiciones de reducción a 29 kDa. Dado que el peso molecular predicho de la forma procesada por completo de la proteína es de 20,31 kDa; esto sugiere que la proteína es glucosilada en uno o dos posibles sitios de glucosilación. En condiciones de no reducción, la proteína Ztgf $\beta$ -9 migró como especie a 49 kDa. Estos resultados indican que el Ztgf $\beta$ -9 humano es capaz de formar un homodímero con enlaces disulfuro cruzados. Sin embargo, la coexpresión del Ztgf $\beta$ -9 humano con etiqueta EE en C terminal y el Zcyt07 humano sin etiquetar, seguida de la purificación por afinidad utilizando un anticuerpo de etiqueta anti-EE, produjo la copurificación de ambas proteínas, lo cual sugiere que, además de los homodímeros del Ztgf $\beta$ -9, el Ztgf $\beta$ -9 y el Zcyt07 también pueden dimerizarse. La interacción del Ztgf $\beta$ -9 y del Zcyt07 no pareció haber sido provocada por las uniones disulfuro intercatenarias entre las proteínas. El Ztgf $\beta$ -9 humano con etiqueta EE en C terminal expresado en las células BHK también fue purificado por afinidad anti-EE y se determinó su secuencia N terminal. Se determinó que el sitio de segmentación de señal se producía antes del aminoácido A23.

40

## Ejemplo 8

*Ratones transgénicos*

45

El marco de lectura abierto que codifica el Ztgf $\beta$ -9 murino de longitud completa se amplificó mediante PCR para introducir un codón de inicio optimizado, y se introdujo en un vector transgénico en el cual la expresión del Ztgf $\beta$ -9 se reguló mediante el promotor de la metalotioneína I. El inserto transgénico se separó del esqueleto plasmídico mediante digestión *Not*I y purificación con gel de agarosa, y los óvulos fertilizados a partir de los apareamientos de ratones B6C3F1Tac se microinyectaron e implantaron en hembras seudoprefinadas. Los fundadores se identificaron mediante PCR en el ADN de cola genómico (equipo DNAeasy 96; Qiagen). Se iniciaron líneas transgénicas mediante el cruzamiento de fundadores con ratones C57BL/6Tac. Los protocolos con animales utilizados en este estudio fueron aprobados por el Comité institucional para el cuidado y la utilización de animales de ZymoGenetics (Zymo-Genetics Institutional Animal Care and Use Committee). De las 49 progenies nacidas, se determinó que solo el 8% era transgénico (en comparación con un promedio del 20% observado para una serie de otros ADNc dirigidos por el mismo promotor), lo que sugiere que la alta expresión del Ztgf $\beta$ -9 murino puede ser mortal para los embriones. De manera coherente con esto, de los cuatro fundadores identificados, todos expresaron solo niveles bajos de ARNm del Ztgf $\beta$ -9 en el hígado. Un quinto fundador murió al nacer y, curiosamente, este animal expresó niveles muy altos de ARNm del Ztgf $\beta$ -9 en el hígado (8.500 copias/célula). El análisis histopatológico de este animal identificó apoptosis severa del timo y desvacuolización completa del tejido adiposo pardo. Los machos que presentaron expresión fueron cruzados con hembras genéticamente intactas. Para un fundador fue posible la transmisión de la línea germinal; sin embargo, toda la progenie transgénica de este fundador murió al nacer o tenía un tamaño muy pequeño y murió poco después del destete. El análisis de estos animales identificó una serie de fenotipos, incluida la apoptosis tímica severa, la desvacuolización del tejido adiposo pardo, la hepatitis y cantidades bajas de linfocitos de sangre periférica. Estos resultados indican que el Ztgf $\beta$ -9, sus agonistas y antagonistas, y los anticuerpos contra el Ztgf $\beta$ -9 serán de utilidad para la regulación de los inmunocitos, la adipogénesis y las células hepáticas.

## Ejemplo 9

*Posición cromosómica*

5 Se localizó el Ztgf $\beta$ -9 humano por mapeo en el cromosoma 13q11.2 en dos paneles de híbridos de radiación. El gen del Ztgfb9 de ratón se liga con los marcadores de marco del cromosoma 14 murino d14mit64 y dmit82 ubicados en los 22,0 y 19,5 centimorgans, respectivamente.

## 10 Ejemplo 10

*Inhibición del crecimiento de adenovirus con el Ztgf $\beta$ -9*

15 Se donaron las regiones codificantes del Ztgf $\beta$ -9 humano y murino en el vector transportador de adenovirus y se recombinaron para generar el genoma adenoviral recombinante. La transfección de los genomas adenovirales del Ztgf $\beta$ -9 en células 293A produjo placas virales muy pequeñas (1 ó 2 placas por transfección, lo cual es bajo). Estas placas no crecieron de tamaño. En general, las placas crecen mucho de tamaño en un período de 1-2 días, a medida que el virus se replica. Se cosecharon las placas pequeñas, se intentó expandir el virus infectando las células 293A. Las monocapas infectadas nuevamente exhibieron cantidades muy bajas de placas, y las placas tenían un tamaño pequeño.

20 Estas placas no crecieron de tamaño con el tiempo. Después de 2-3 intentos de amplificar el virus, finalmente se obtuvo una población de virus de rápido crecimiento. El virus obtenido de esta amplificación aún contiene las secuencias del Ztgf $\beta$ -9. Sin embargo, la infección de células con estos virus no tuvo como consecuencia la producción de proteínas. El comportamiento inicial de los virus que contenían el Ztgf $\beta$ -9 tanto humano como de ratón es distinto al observado con otro ADNc. Es evidente que se inhibió la replicación del virus.

25

**Referencias citadas en la descripción**

30 *Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada únicamente para la conveniencia lector. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido bastante cuidado al redactar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP renuncia a toda responsabilidad en este sentido.*

**Patentes citadas en la descripción**

- 35 • WO 0042188 A [0004]
- WO 9981617 A [0005]
- US 5841670 A [0091]
- 40 • US 4683202 A. Mullis [0094]
- US 5223409 A. Ladner [0115] [0150]
- 45 • WO 92061204 A [0115]
- US 5037743 A. Welch [0125] [0132]
- US 5143830 A. Holland [0125]
- 50 • US 4713339 A. Levison [0126]
- US 4784950 A. Hagen [0126]
- 55 • US 4579821 A. Palmiter [0126] [0126]
- US 4656134 A, Ringold [0126]
- US 4956288 A [0126]
- 60 • US 4801978 A [0126]
- US 518222.2 A. Guarino [0127] [0131]
- 65 • WO 9406483 A [0127] [0131]
- US 5300435 A [0129]
- US 4845075 A. Murray [0132]
- US 4615974 A. Kingaman [0132]
- US 4977092 A. Bitter [0132]
- US 4900448 A [0132]
- US 5063154 A [0132]
- US 5139936 A [0132]
- US 4661454 A [0132]
- US 4882279 A. Cregg [0132]
- US 4935340 A. McKnight [0132]
- US 5182228 A [0132]
- US 4486533 A, Lambowitz [0132]
- US 5399346 A. Anderson [0144]
- US 4690764 A, Temin [0144]
- US 49802 A, Temin [0144]
- US 5124263 A. Temin [0144]
- WO 9507358 A. Dougherty [0144]
- US 4046778 A. Ladner [0150]

# ES 2 300 154 T3

- US 4775624 A, Bang [0131]
- US 4599311 A. Kawasaki [0132] [0132]
- 5 • US 4931373 A. Kawasaki [0132] [0132]
- US 4870008 A, Brake [0132]
- US 5403484 A. Ladner [0150]
- US 5571698 A. Ladner [0150]
- US 9808212 W [0158]
- WO 09154817 A [0169]

## Bibliografía distinta de patentes citada en la descripción

- 10 • **RAFF**, M.C. *Cell* 1986, vol 86, 173-175 [0001]
- **SAWYERS**, C.L. *et al. Cell*, 1991, vol. 64, 337-350 [0001]
- 15 • **MEYAARD**, L. *et al. Science*. 1992, vol 257, 217-219 [0001]
- **GUO**, Q. *et al. Nature Med.*, 1998. vol 4, 957-962 [0001]
- 20 • **BARINAGA**, M. *Science*, 1996, vol. 273. 735-737 [0001]
- **SOLARY**, E. *et al. Eur. Respir. J.* 1996. vol. 9, 1293-1305 [0001]
- **HAMET**, P. *et al. J. Hypertension*. 1996. vol. 14, S65-S70 [0001]
- 25 • **ROY**, N. *et al. Cell*, 1995. vol. 80. 167-178 [0001]
- **AMBROSINI**, G. *Nature Med.*, 1997. vol. 8, 917-921 [0001]
- 30 • **MORRISON**, S.J. *et al Cell*, 1997, vol. 88, 287-298 [0001]
- **COPPOLA**, J. A *et al. Nature*, 1986, vol. 320, 760-763 [0001]
- **FREYTAG**, S. O. *Mol. Cell. Biol*, 1988. vol. 8, 1614-1624 [0001]
- 35 • **LEE**, E. Y. *et al. Genes Dev.*, 1994, vol. 8, 2008-2021 [0001]
- **TEUNISSEN**, M. B. M. *J. Investigative Dermatology*, 1998, vol. 111, 645-649 [0002]
- 40 • **JOVANOVIC**, D. V. *et al J. Immunology*, 1998, vol 160, 3513-3521 [0002]
- **CHABAUD**, M. *et al. J. Immunology*, 1998, vol. 161, 409-414 [0002]
- **CAI**, X.-Y. *et al Immunology Letters*. 1998. vol. 62, 51-58 [0002]
- 45 • **FOSSIEZ**, F. *et al. J. Experimental Medicine*, 1998, vol. 183, 2593-2603 [0002]
- **SCHWARZENBERGER** P. *et al. J. Immunology*. 1998, vol.. 161, 6383-9 [0002]
- **ANTONYSAMY**, M. A. *et al. J. Immunology*, 1989. vol. 103, 1345-1352 [0002]
- 50 • **KOTAKE**, S. *et. al J. Clinical Investigation*, 1999, vol. 103, 1345-1352 [0002]
- **ATTUR**, M. G. *et al Arthritis & Rheumatism*. 1997, vol. 40, 1050-1053 [0002]
- 55 • **MATUSEVICIUS**, D. *et al. Multiple Sclerosis*, 1999. vol. 5. 101-104 [0002]
- **TARTOUR**, E. *et al. Cancer Res.*, 1999, vol. 59. 3698-36704 [0002]
- **DSES; MCGEHEE** *et al. Mol. Endocrinol*, 1993, vol. 7, 551 [0032]
- 60 • **SRES; TREISMAN**. *Seminars in Cancer Biol.*, 1990, vol. 1. 47 [0032]
- **O'REILLY** *et al J. Biol. Chem.* 1992, vol. 267. 19938 [0032]
- 65 • **YE** *et al. J. Biol. Chem.*, 1994. vol. 269, 25728 [0032]
- **CREB; LOEKEN**. *Gene Expr.*, 1993. vol. 3. 253 [0032]

# ES 2 300 154 T3

- *Molecular Biology of the Gene*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987 [0032]
- **LEMAIGRE; ROUSSEAU**. *Biochem. J.*, 1994, vol. 303. 1 [0032]
- 5 • **NILSSON** *et al.* *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 1075 [0062]
- **NILSSON** *et al.* *Methods Enzymol.*, 1991. vol. 198, 3 [0062]
- 10 • **MORGENBESSER**, S. D. *et al.* *Nature*, 1994, vol.
- **CASACCIA-BONNEFIL**, P. *et al.* *Genes Dev.*, 1996.
- *Genes Dev.*, 1996, vol. 10. 3051-3064 [0001]
- 15 • **ZHANG**, P. *et al* *Nature*. 1997, vol. 387. 151-158 [0001]
- **RAFF**, M. C. *Nature*. 1992, vol 356. 397-400 [0001]
- 20 • **JACOBSEN**, K. A. *et al* *Blood* 1994, vol. 84, 2784-2794 [0001]
- **YAN**, Y. *et al* *Genes Dev.* 1997, vol 11, 973-983 [0001]
- 25 • **SPRIGGS**, M. K. *J. Clinical Immunology* 1997, vol. 17, 366-369 [0002]
- **BROXMEYER**, H. E. *J Experimental Medicine*, 1996. vol. 183. 2411-2415 [0002]
- 30 • **YAO**, Z. *et al* *J Immunology*, 1995, vol. 155. 5483-5486 [0002]
- **YAO**, Z. *et at* *Immunity*, 1995, vol. 3, 811-821 [0002]
- 35 • **AARVAK**, T. *et al* *J. Immunology*, 1999, vol. 162, 1246-1251 [0002]
- **KENNEDY**, J. *et al* *J. Interferon Cytokine Research*, 1996. vol. 16 611-617 [0002]
- 40 • **CHIRGWIN** *et al.* *Biochemistry*, 1979, vol. 18, 52 [0085]
- **AVIV; LEDER**. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA*, 1972. vol. 69, 1408 [0085]
- Constructing and Screening cDNA Libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11. **HUYNH** *et al.* *DNA Cloning: A Practical Approach*. *IRL Press*. 1985, vol. I, 49 [0086]
  - Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries. **YU** *et al.* *Methods in Molecular Biology*. Vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications*. *Humana Press*, Inc, 1993, 211-215 [0008]
- 45 • Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members. **PRESTON**. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications*. *Humana Press*, Inc. 1993 317-337 [0088]
  - Screening  $\lambda$  expression libraries with antibody and protein probes. **MARGOLIS** *et. al.* *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2nd Edition. *Oxford University Press*, 1995 1-14 [0089]
- 50 • **ADANG** *et al.* *Plant Molec. Biol.*, 1993, vol. 21, 1131 [0090]
- **BAMBOT** *et al.* *PCR Methods and Applications*, 1993, vol. 2, 266 [0090]
- 55 • Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes. **DILLON** *et al.* *Methods in Molecular Biology*. Vol. 15: *PCR Protocols: Current Methods and Applications*. *Humana Press*. Inc. 1993, 263-288 [0090]
- 60 • **HOLOWACHUK** *et al.* *PCR Methods Appl.* 1995. vol. 4, 299 [0090]
- **GLICK, BERNARD R.; JACK J. PASTERNAK**, *Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA*. *ASM Press*, 1994 [0092]
- 65 • **ITAKURA**, K. *et al.* Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.*, 1984, vol. 53, 323-356 [0092]
- **SMITH; JOHNSON**. *Gene*, 1988. vol. 67. 31 [0082]

# ES 2 300 154 T3

- **GRUSSENMEYER** *et. al* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1985 vol. 82 7952 [0062]
- **HOPP** *et al.* *Biotechnalogy*, 1988, vol. 6. 1204 [0062]
- 5     • **FORD** *et al.* *Protein Expression and Purification*, 1991, vol. 2. 95 [0062]
- **URBAN** *et al.* *Ann. Rev. Immunol.*, 1992, vol. 10. 617 [0067]
- 10    • **PERUSKI; PERUSKI** *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research. ASM Press, Inc*, 1997 [0078]
  - Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins. *Methods in Gene Biotechnology. CRC Press, Inc*, 1997. 123-151 [0078]
- 15    • Guide to Human Genome Computing. *Academic Press, Inc*. 1998 [0078]
- Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons. 1995 [0084]
- 20    • **WU** *et al.* *Methods in Gene Biotechnology. CRC Press. Inc*. 1997, 33-41 [0084]
- **HENIKOFF; HENIKOFF**. *Proc. Nat'l Acad Sci. USA*, 1992, vol. 89, 10915 [0107]
- 25    • Directed Mutagenesis: A Practical Approach. IRL Press. 1991 [0109]
- **ROBERTSON** *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, vol. 113. 2722 [0110]
- 30    • **ELLMAN** *et. al.* *Methods Enzymol.*, 1991, vol. 202, 301 [0110]
- **CHUNG** *et. al.* *Science*, 1993, vol. 259, 806 [0110]
- 35    • **CHUNG** *et. al.* *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1993 vol. 90, 10145 [0110]
- **TURCATTI** *et. al* *J. Biol. Chem.*, 1996, vol. 271. 19991 [0111]
- 40    • **KOIDE** *et al.* *Biochem.* 1994, vol. 33. 7470 [0111]
- **WYNN; RICHARDS**. *Protein Sci*, 1993, vol 2, 395 [0111]
- 45    • **CUNNINGHAM; WELLS** *Science*, 1989, vol. 244, 1081 [0113]
- **BASS** *et al.* *Proc Nat'l Acad Sci. USA*. 1991, vol. 88. 4498 [0113]
  - Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering. **COOMBS; COREY**. *Proteins: Analysis and Design. Academic Press. Inc*, 1998, 259-311 [0113]
- 50    • **HILTON** *et al.* *J. Biol. Chem.* 1996, vol. 271, 4699 [0113]
- **CLIMIE, S.** *et al.* Chemical synthesis of the thymidylate synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990, vol. 87, 633-637 [0092]
- 55    • **CHIRGIN** *et al.* *Biochemistry*, 1979, vol. 18. 52-94 [0093]
- **AVIV; LEDER**. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 1972, vol. 69, 1403-1432 [0093]
- 60    • **ALTSCHUL** *et al* *Bull Math. Bio.*, 1986. vol. 48. 603 [0101]
- **HENIKOFF; HENIKOFF**. *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 1992, vol. 89, 10915 [0107]
- **LIPMAN** *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 1988 vol. 85, 2444 [0102]
- 65    • **PEARSON**. *Meth. Enzymol.*, 1990, vol. 183, 63 [0102] [0102]
- **NEEDLEMAN; WUNSCH**. *J. Mol. Biol.* 1970, vol. 48, 444 [0102]
- **SELLERS**. *SIAM J. Appl. Math.*, 1974, vol. 26 787 [0102]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons. Inc. 1987 [0126]

# ES 2 300 154 T3

- **HAWLEY-NELSON** *et. al. Focus*, 1993, vol. 15, 73 [0126]
- **CICCARONE** *et. al. Focus*, 1993, vol. 15 80 [0126]
- 5 • **GRAHAM** *et. al. J. Gen. Virol.*, 1997, vol. 36, 59-72 [0126]
- **SINKAR** *et. al. J. Biosci (Bangalore)*, 1987, vol. 11. 47 [0127]
- 10 • **KING, L.A.; POSSEE, R.D.** *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*. Chapman & Hall [0127]
- **O'REILLY, D.R. et. al. Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual**. Oxford University Press, 1994 [0127]
- 15 • Baculovirus Expression Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Humana Press. 1995 [0127]
- **LUCKOW, V.A** *et al. J Virol*, 1993, vol 67, 4566 [0128]
- **HILL-PERKINS, M.S.; POSSEE, R.D.** *J. Gen Virol*, 1990, vol. 71, 971 [0128]
- 20 • **BONNING, B.C. et al. J Gen Vol.** 1994. vol. 75. 1551 [0128]
- **CHAZENBALK, G.D.; RAPOPORT, B.** *J Biol Chem*, 1995, vol. 270. 1543 [0128]
- 25 • **CUNNINGHAM; WELLS**. *Science*. 1989, vol. 244. 1081-1085 [0114]
- **BASS** *et al. Prot Natl. Acad Sci USA*, 1991. vol. 88, 4488-4502 [0114]
- **DE VOS** *et al. Science*, 1992, vol. 255, 308-312 [0114]
- 30 • **SMITH** *et al. J. Mol. Biol*, 1992. voL 224. 889904 [01143]
- **WLODAVER** *et al FEBS Lett*, 1992, vol. 309, 59-84 [0114]
- **REIDHAAR-OLSON; SAUER**. *Science*, 1988. vol. 241. 53-57 [0115]
- 35 • **BOWIE; SAUER**. *Proc. Natl. Acad Sci USA*. 1989, vol. 86, 2152-2158 [0115]
- **LOWMAN** *et al. Biochem.*, 1991, vol. 30, 10832-10837 [0115]
- 40 • **DERBYSHIRE** *et al. Gene*, 1988. vol. 46, 145 [0115]
- **NER** *et al. DNA*. 1988, vol. 7, 127 [0115]
- 45 • **GEYSEN, H.M. et al. Proc. Natl. Acad Sci USA, 1984, vol. 81, 3898-4002 [0118]**
- **SUTCLIFFE, J. G. et al. Scienrce, 1983. vol. 219, 660-666 [0119]**
- 50 • **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0123]
- **WIGLER** *et al. Cell* 1978. vol. 14, 725 [0126]
- **CORSARO; PEARSON**. *Somatic Cell Genetics*, 1981, vol. 7, 603 [0126]
- 55 • **GRAHAM; VAN DER EB**. *Virology*, 1973. vol. 52, 456 [0126]
- **NEUMANN** *et al EMBO J.*, 1982, vol. 1, 841-845 [0126]
- **STRATFORD-PERRICAUDET** *et al. J. Clin Invest*, 1992, vol. 90, 626-630 [0143]
- 60 • **SAMULSKI** *et al J. Virol*, 1987, vol. 61. 3098-3101 [0143]
- **SAMULSKI** *et al. J. Virol.*, 1989, vol. 83, 3822-3828 [0143]
- 65 • **MANN** *et al. Cell*, 1983, vol. 33. 153 [0144]
- **MARKOWITZ** *et al. J. Virol*, 1988. vol. 62. 1120 [0144]

- *Blood*, 1993, vol. 82, 845 [0144]
- **FELGNER** *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 7413-74171 [0145]
- 5 • **MACKEY** *et. al.* *Proc. Natl Acad. Sci USA*, 1988, vol. 85, 8027-8031 [0145]
- **WU** *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 287, 963-987 [0146]
- 10 • **GRUSSENMEYER**, T. *et. al.* *Proc Natl Acad Sci.*, 1985, vol. 82, 7952 [0128]
- **GLICK; PASTERNAK**. Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. *ASM Press* 1994 [0129]
- 15 • **SINKAR** *et. al.* *J. Biosci (Bangalore)*, 1987, vol. 11, 47-58 [0131]
- **GLEESON** *et al.* *J. Gen. Microbiol*, 1988, vol. 132, 3459-3485 [0132]
- 20 • Affinity Chromatography: Principles & Methods. *Pharmacia LKB Biotechnology*, 1988 [0136]
- **E. SULKOWSKI**. *Trends in Biochem.*, 1985, vol. 3, 1-7 [0137]
- Methods in Enzymol. Guide to Protein Purification. *Acad. Press*, 1990, vol. 182, 529-39 [0137]
- 25 • **HOPP** *et. al.* *Bio/Technology*, 1988, vol.6, 1204-1210 [0137]
- **GRUSSENMEYER** *et. al.* *Proc. Nat Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 7952-4 [0137] [0164]
- 30 • **SNOWWAERT** *et al.* *Science*, 1992, vol 257. 1083 [0138]
- **LOWELL** *et al.* *366. Nature*, 1993, 740-742 [0138]
- **CAPECCHI**, M.R. 244. *Science*, 1989. 1288-1202 [0138]
- 35 • **PALMITER**, R.D. *et. al.* *Annu. Rev. Genet.* 1988, vol. 20, 485-499 [0138]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. *Mack Publishing Co.* 1990 [0142]
- Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics. *Pergamon Press*, 1996 [0142]
- 40 • **KAPLITT** *et al.* *Molec. Cell Neurorsci*, 1991, vol. 2. 320-330 [0143]
- **WU** *et. al.* *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263. 14621-14624 [0146]
- 45 • **SAMBOOK** *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor*, 1989 [0148]
- Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications. *CRC Press, Inc.*, 1982 [0148]
- Antibodies: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1988 [0148]
- 50 • **VAUGHAN** *et al.* *Nat. Biotech*, 1998, vol, 16, 535-539 [0149]
- **COX** *et. al.* *Science*, 1990, vol 250, 245-250 [0152]
- 55 • **MIGNON**, G. *et al.* *Cytogenet. Cell Genet.*, 1998, vol. 72. 185-186 [0153]
- **HIGGINS; SHARP**. *CABIOS*, 1989, vol. 5, 151 [0156]

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9, SEC. ID. N.º 12, SEC. ID. N.º 17 y SEC. ID. N.º 18, o que codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC. ID. N.º 15 y la SEC. ID. N.º 21.
- 10 2. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9, SEC. ID. N.º 12, SEC. ID. N.º 17 y SEC. ID. N.º 18.
- 15 3. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 17 y SEC. ID. N.º 18, o donde dicho polinucleótido codifica un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC. ID. N.º 15 y la SEC. ID. N.º 21.
- 20 4. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 3, donde el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4 y SEC. ID. N.º 5.
5. Polinucleótido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 1 y SEC. ID. N.º 9.
- 25 6. Polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9, SEC. ID. N.º 12, SEC. ID. N.º 17 y SEC. ID. N.º 18, o dicho polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada de la SEC. ID. N.º 15 y la SEC. ID. N.º 21.
- 30 7. Polipéptido aislado de acuerdo con la Reivindicación 6, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9, SEC. ID. N.º 12, SEC. ID. N.º 15, SEC. ID. N.º 17, SEC. ID. N.º 18 y SEC. ID. N.º 21.
- 35 8. Polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 6, donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4, SEC. ID. N.º 5, SEC. ID. N.º 9 y SEC. ID. N.º 12.
9. Polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 6, donde la secuencia de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4 y SEC. ID. N.º 5.
- 40 10. Anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEC. ID. N.º 2, SEC. ID. N.º 3, SEC. ID. N.º 4 y SEC. ID. N.º 5.
11. Anticuerpo antiidiotípico que se une a un anticuerpo según la reivindicación 10.

45

50

55

60

65

# ES 2 300 154 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

5        <110> ZymoGenetics, Inc.  
      1201 Eastlake Avenue East  
      Seattle, Washington 98102  
      Estados Unidos de América

10      <120> Factor de crecimiento de transformación Beta-9 en mamíferos  
      10      <130> 98-54PC

15      <150> 09/154,817  
      15      <151> 1998-09-17

20      <160> 22  
      20      <170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

25      <210> 1  
      25      <211> 1819  
      25      <212> ADN  
      25      <213> *Homo sapiens*

30      <220>  
      30      <221> CDS  
      30      <222> (71)...(676)

35      <400> 1

40      cgggcgcggg ggcgcaggcgg gctccctccgg cgcgtgcgg a cgcgtgcgt ggcctgtccc      60  
      tcagggtctgg atg ctg gta gcc ggc ttc ctg ctg gcg ctg ccg ccg agc      109  
      Met Leu Val Ala Gly Phe Leu Leu Ala Leu Pro Pro Ser  
      1                        5                        10

45      tgg gcc gcg ggc gcc ccg agg gcg ggc agg cgc ccc gcg cgg ccg cgg      157  
      Trp Ala Ala Gly Ala Pro Arg Ala Gly Arg Arg Pro Ala Arg Pro Arg  
      15                        20                        25

50      ggc tgc gcg gac cgg ccg gag gag cta ctg gag cag ctg tac ggg cgc      205  
      Gly Cys Ala Asp Arg Pro Glu Glu Leu Leu Glu Gln Leu Tyr Gly Arg  
      30                        35                        40                        45

55      ctg gcg gcc ggc gtg ctc agt gcc ttc cac cac acg ctg cag ctg ggg      253  
      Leu Ala Ala Gly Val Leu Ser Ala Phe His His Thr Leu Gln Leu Gly

60

65

## ES 2 300 154 T3

	50	55	60		
5	ccg cgt gag cag gcg cgc aac gcg agc tgc ccg gca ggg ggc agg ccc Pro Arg Glu Gln Ala Arg Asn Ala Ser Cys Pro Ala Gly Gly Arg Pro	65	70	75	301
10	gcc gac cgc cgc ttc cgg ccc acc aac ctg cgc agc gtg tcg ccc Ala Asp Arg Arg Phe Arg Pro Pro Thr Asn Leu Arg Ser Val Ser Pro	80	85	90	349
15	tgg gcc tac aga atc tcc tac gac ccg gcg agg tac ccc agg tac ctg Trp Ala Tyr Arg Ile Ser Tyr Asp Pro Ala Arg Tyr Pro Arg Tyr Leu	95	100	105	397
20	cct gaa gcc tac tgc ctg tgc cgg ggc tgc ctg acc ggg ctg ttc ggc Pro Glu Ala Tyr Cys Leu Cys Arg Gly Cys Leu Thr Gly Leu Phe Gly	110	115	120	445
25	gag gag gac gtg cgc ttc cgc agc gcc cct gtc tac atg ccc acc gtc Glu Glu Asp Val Arg Phe Arg Ser Ala Pro Val Tyr Met Pro Thr Val	130	135	140	493
30	gtc ctg cgc cgc acc ccc gcc tgc gcc ggc ggc cgt tcc gtc tac acc Val Leu Arg Arg Thr Pro Ala Cys Ala Gly Gly Arg Ser Val Tyr Thr	145	150	155	541
35	gag gcc tac gtc acc atc ccc gtg ggc tgc acc tgc gtc ccc gag ccg Glu Ala Tyr Val Thr Ile Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Pro Glu Pro	160	165	170	589
40	gag aag gac gca gac agc atc aac tcc agc atc gac aaa cag ggc gcc Glu Lys Asp Ala Asp Ser Ile Asn Ser Ser Ile Asp Lys Gln Gly Ala	175	180	185	637
45	aag ctc ctg ctg ggc ccc aac gac gcg ccc gct ggc ccc tgaggccggt Lys Leu Leu Leu Gly Pro Asn Asp Ala Pro Ala Gly Pro	190	195	200	686
50	cctgccccgg gaggtctccc cggcccgcat cccgaggcgc ccaagctgga gccgcctgga gggctcggtc ggcgacctct gaagagagtg caccgagcaa accaagtgc ggagcaccag	746			
55	cgccgccttt ccatggagac tcgtaagcag ctcatctgaa cacggaaatc cctggcttgc tttagctac aagcaagcag cgtggctgga agctgatggg aaacgacccg gcacggccat	806			
	cctgtgtgcg gccccatgg agggtttggaa aagttcacg gaggctccct gaggagccctc tcagatccgc tgctgcgggt gcagggcgtg actcaccgcgt gggtgctgc caaagagata	866			
	gggacgcata tgcttttaaa agcaatctaa aaataataat aagtatacg actatataacc	926			
					986
					1046
					1106

60

65

# ES 2 300 154 T3

	tacttttaaa atcaactgtt ttgaatagag gcagagctat titatallat caaatgagag	1166
5	ctactctgtt acatttctta acatataaac atcggtttt acttctctg gtagaatttt	1226
	ttaaagcata attggaaacc ttggataaaat ttgttagctg gtacactctg gcctgggtct	1286
	ctgaattcag cctgtcaccg atggctgact gatgaaatgg acacgtctca tctgacccac	1346
	tcttcctcc actgaaggc ttcacgggccc tccaggtgga ccaaaggat gcacaggcgg	1406
	ctcgcatgcc ccagggccag ctaagagttc caaagatctc agatttgggtt ttagtcatga	1466
10	atacataaac agtctcaaac tcgcacaatt tttccccct tttgaagcc actggggcca	1526
	atttgtgggtt aagaggtggt gagataagaa gtggAACgtg acatcttgc cagttgtcag	1586
	aagaatccaa gcaggtattt gcttagttt aagggttta ggtcaggcc gaatatgagg	1646
	acaaagtggg ccacgttagc atctgcagag atcaatctgg aggcttctgt ttctgcattc	1706
15	tgccacgaga gcttaggtcct tgatctttc tttagattga aagtctgtct ctgaacacaa	1766
	ttatttgtaa aagttagaag ttcttttta aatcattaaa agaggcttgc tga	1819

25 <210> 2

20 <211> 202

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 2

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

65 <210> 3

<211> 187

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

# ES 2 300 154 T3

<400> 3

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

40 <210> 4  
 <211> 186  
 <212> PRT  
 45 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

50            Gly Ala Pro Arg Ala Gly Arg Arg Pro Ala Arg Pro Arg Gly Cys Ala  
 1            5            10            15  
 Asp Arg Pro Glu Glu Leu Leu Glu Gln Leu Tyr Gly Arg Leu Ala Ala  
 55            20            25            30  
 Gly Val Leu Ser Ala Phe His His Thr Leu Gln Leu Gly Pro Arg Glu  
 60            35            40            45  
 Gln Ala Arg Asn Ala Ser Cys Pro Ala Gly Gly Arg Pro Ala Asp Arg

# ES 2 300 154 T3

	50	55	60
	Arg Phe Arg Pro Pro Thr Asn Leu Arg Ser Val Ser Pro Trp Ala Tyr		
5	65	70	75
	Arg Ile Ser Tyr Asp Pro Ala Arg Tyr Pro Arg Tyr Leu Pro Glu Ala		80
	85	90	95
	Tyr Cys Leu Cys Arg Gly Cys Leu Thr Gly Leu Phe Gly Glu Glu Asp		
10	100	105	110
	Val Arg Phe Arg Ser Ala Pro Val Tyr Met Pro Thr Val Val Leu Arg		
	115	120	125
	Arg Thr Pro Ala Cys Ala Gly Gly Arg Ser Val Tyr Thr Glu Ala Tyr		
15	130	135	140
	Val Thr Ile Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Pro Glu Pro Glu Lys Asp		
	145	150	155
	Ala Asp Ser Ile Asn Ser Ser Ile Asp Lys Gln Gly Ala Lys Leu Leu		
20	165	170	175
	Leu Gly Pro Asn Asp Ala Pro Ala Gly Pro		
	180	185	

	25	<210> 5
	<211> 185	
	<212> PRT	
30		<213> <i>Homo sapiens</i>

<400> 5

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

# ES 2 300 154 T3

<210> 6		
<211> 23		
<212> ADN		
5 <213> <i>Homo sapiens</i>		
<400> 6		
10           ccgggtcgta ggagattctg tag		23
<210> 7		
<211> 22		
15 <212> ADN		
<213> <i>Homo sapiens</i>		
<400> 7		
20           gegtgctcag tgcctccac ca		22
<210> 8		
25 <211> 1221		
<212> ADN		
<213> <i>Mus musculus</i>		
30 <220>		
<221> CDS		
<222> (79)...(693)		
35 <400> 8		
40           gggtgtcgcc ctatattact tcgcagaaga gccttcagcc cccctcctaa caagtctgga	60	
aaggcatcacg gcgacgcg atg ttg ggg aca ctg gtc tgg atg ctc gcg gtc	111	
Met Leu Gly Thr Leu Val Trp Met Leu Ala Val		
1                   5                   10		
45           ggc ttc ctg ctg gca ctg gcg ccg ggc cgc gcg ggc ggc ctg agg	159	
Gly Phe Leu Leu Ala Leu Ala Pro Gly Arg Ala Ala Gly Ala Leu Arg		
15                20                25		
50           acc ggg agg cgc ccg gcg ccg ccg gac tgc gcg gac ccg ccg gag	207	
Thr Gly Arg Arg Pro Ala Arg Pro Arg Asp Cys Ala Asp Arg Pro Glu		
30                35                40		
55           gag ctc ctg gag cag ctg tac ggg ccg ctg gcg gcc ggc gtg ctc agc	255	
Glu Leu Leu Glu Glu Leu Tyr Gly Arg Leu Ala Ala Gly Val Leu Ser		
60		

## ES 2 300 154 T3

	45	50	55	
5	gcc ttc cac cac acg ctg cag ctc ggg ccg cgc gag cag gcg cgc aat Ala Phe His His Thr Leu Gln Leu Gly Pro Arg Glu Gln Ala Arg Asn			303
	60	65	70	75
10	gcc agc tgc ccg gcc ggg ggc agg gcc gac cgc cgc ttc cgg cca Ala Ser Cys Pro Ala Gly Gly Arg Ala Ala Asp Arg Arg Phe Arg Pro			351
	80	85		90
15	ccc acc aac ctg cgc agc gtg tcg ccc tgg gcg tac agg att tcc tac Pro Thr Asn Leu Arg Ser Val Ser Pro Trp Ala Tyr Arg Ile Ser Tyr			399
	95	100		105
20	gac cct gct cgc ttt ccg agg tac ctg ccc gaa gcc tac tgc ctg tgc Asp Pro Ala Arg Phe Pro Arg Tyr Leu Pro Glu Ala Tyr Cys Leu Cys			447
	110	115		120
25	cga ggc tgc ctg acc ggg ctc tac ggg gag gag gac ttc cgc ttt cgc Arg Gly Cys Leu Thr Gly Leu Tyr Gly Glu Glu Asp Phe Arg Phe Arg			495
	125	130		135
30	agc aca ccc gtc ttc tct cca gcc gtg gtg ctg cgg cgc aca gcg gcc Ser Thr Pro Val Phe Ser Pro Ala Val Val Leu Arg Arg Thr Ala Ala			543
	140	145	150	155
35	tgc gcg ggc cgc tct gtg tac gcc gaa cac tac atc acc atc ccc Cys Ala Gly Gly Arg Ser Val Tyr Ala Glu His Tyr Ile Thr Ile Pro			591
	160	165		170
40	gtg ggc tgc acc tgc gtg ccc gag ccg gac aag tcc gcg gac agt gcg Val Gly Cys Thr Cys Val Pro Glu Pro Asp Lys Ser Ala Asp Ser Ala			639
	175	180		185
45	aac tcc agc atg gac aag ctg ctg ctg ggg ccc gcc gac agg cct gcg Asn Ser Ser Met Asp Lys Leu Leu Gly Pro Ala Asp Arg Pro Ala			687
	190	195		200
50	ggg cgc tgatgccggg gactgcccgc catggcccaag cttccatgcat gcatcaggtc Gly Arg			743
	205			
55	ccctggccct gacaaaaccc accccatgat ccctggccgc tgcctaattt ttccaaaagg acagctacat aagtttaaa tatattttc aaagtagaca ctacatatct acaactattt tgaatagtgg cagaaactat tttcatatta gtaattttaga gcaagcatgt tgaaaaaaa			803
				863
				923
60				

## ES 2 300 154 T3

5            cttctttat atacaaggcac atcacacaca tcccgtttc ctctagttagg attcttgagt    983  
 gcataatgt agtgctcaga tgaacttcct tctgctgcac tgcgcctgt ccctgagtc 1043  
 ctccctgtggc ccaagcttac taaggtgata atgagtgcctc cggatctggg caccctaaagg 1103  
 ctccaggtcc ctggagaggg agggatgtgg gggggctaga accaagcgcc ccttggttct 1163  
 ttagcttatg gatggctta actttataaa gattaaagtt ttgggttta ttcttca 1221

10    <210> 9  
       <211> 205  
       <212> PRT  
 15    <213> *Mus musculus*

<400> 9

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

55    <210> 10  
       <211> 23  
       <212> ADN  
 60    <213> *Homo sapiens*

<400> 10

gatcatgggg tgggtttgt cag

23

65    <210> 11  
       <211> 22

# ES 2 300 154 T3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

5 <400> 11

gaggacttcc gcttcgcaa ca

22

10 <210> 12

<211> 183

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

15

<400> 12

20 Ala Gly Ala Leu Arg Thr Gly Arg Arg Pro Ala Arg Pro Arg Asp Cys

1 5 10 15

Ala Asp Arg Pro Glu Glu Leu Leu Glu Gln Leu Tyr Gly Arg Leu Ala

20 25 30

25 Ala Gly Val Leu Ser Ala Phe His His Thr Leu Gln Leu Gly Pro Arg

35 40 45

Glu Gln Ala Arg Asn Ala Ser Cys Pro Ala Gly Gly Arg Ala Ala Asp

50 55 60

30 Arg Arg Phe Arg Pro Pro Thr Asn Leu Arg Ser Val Ser Pro Trp Ala

65 70 75 80

Tyr Arg Ile Ser Tyr Asp Pro Ala Arg Phe Pro Arg Tyr Leu Pro Glu

85 90 95

35 Ala Tyr Cys Leu Cys Arg Gly Cys Leu Thr Gly Leu Tyr Gly Glu Glu

100 105 110

Asp Phe Arg Phe Arg Ser Thr Pro Val Phe Ser Pro Ala Val Val Leu

115 120 125

40 Arg Arg Thr Ala Ala Cys Ala Gly Gly Arg Ser Val Tyr Ala Glu His

130 135 140

Tyr Ile Thr Ile Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Pro Glu Pro Asp Lys

145 150 155 160

45 Ser Ala Asp Ser Ala Asn Ser Ser Met Asp Lys Leu Leu Leu Gly Pro

165 170 175

Ala Asp Arg Pro Ala Gly Arg

180

50

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <400> 13

65 Gln Leu Gly Pro Arg Glu Gln Ala Arg Asn Ala Ser Cys Pro Ala Gly

1 5 10 15

Gly Arg Pro Ala Asp Arg Arg Phe Arg Pro Pro Thr Asn Leu

20 25 30

ES 2 300 154 T3

<210> 14  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 14  
 10  
 Gly Glu Glu Asp Val Arg Phe Arg Ser Ala Pro Val Tyr Met Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Val Val Leu Arg Cys  
 15 20  
 20 <210> 15  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 15  
 30 Cys Val Pro Glu Pro Glu Lys Asp Ala Asp Ser Ile Asn Ser Ser Ile  
 1 5 10 15  
 Asp Lys Gln Gly Ala Lys Leu Leu Leu Gly Pro Asn Asp Ala Pro Ala  
 20 25 30  
 35 Gly Pro  
 40 <210> 16  
 <211> 2361  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 45 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (572)...(1202)  
 50 <400> 16  
 55 gaattcggca cgagggttcag ggaagtattc agtgctttgt tgttagagttg ttggatagag 60  
 gcacaggatc atttcatgtt gttgaggaga aaggagcaac agcctcctcc caccttatta  
 aaaatagaga tttaaaaaaaaa cctctaattt cctcgaagta cagaatctca agaggtagct 120  
 ctaaggagaa tccctctggg tttgagcgca ttccctttcc agggggcccta ttcttggact 180  
 60 240

## ES 2 300 154 T3

5	gctticctta atagagaaaat ctctctgagc caaaatcgcc ctcccccaat tccatccgt cggccccact ttctcgctcc ggagacttcc aagccagtcc ccactctcc ttccagccagt cgcccccgcga cccgcgcggcag ccctctccctc ctccctgcgtg ggcgcggcaca ggccctgagc ggcgcgacccc aggccttggg cggcccgccg catgcgcgcg gcttggaaagcc ccagtttgcg tggcccttcg ggttatttcg ctcaagagcc gccgcgtcgc cccatctcg cgcgaaatctg aaagcgcttt cgggggagaa g atg ttg ggg gca ctg gtc tgg	300 360 420 480 540 592
10	Met Leu Gly Ala Leu Val Trp 1 5	
15	aig ctg gta gcc ggc ttc ctg ctg gcg ctg ccg agc tgg gct gcg Met Leu Val Ala Gly Phe Leu Leu Ala Leu Pro Pro Ser Trp Ala Ala 10 15 20	640
20	ggc gcc ccg agg gcg ggc agg cgc ccc gcg cgg ccg cgg ggc tgc gcg Gly Ala Pro Arg Ala Gly Arg Arg Pro Ala Arg Pro Arg Gly Cys Ala 25 30 35	688
25	gac cgg ccg gag gag cta ctg gag cag ctg tac ggg cgc ctg gcy gcc Asp Arg Pro Glu Glu Leu Leu Glu Gln Leu Tyr Gly Arg Leu Ala Ala 40 45 50 55	736
30	ggc gtg ctc agt gcc ttc cac cac acg ctg cag ctg ggg ccg cgt gag Gly Val Leu Ser Ala Phe His His Thr Leu Gln Leu Gly Pro Arg Glu 60 65 70	784
35	cag gcg cgc aac gcg agc tgc ccg gca ggg ggc agg ccc gcc gac cgc Gln Ala Arg Asn Ala Ser Cys Pro Ala Gly Gly Arg Pro Ala Asp Arg 75 80 85	832
40	cgc ttc cgg ccg ccc acc aac ctg cgc agc gtg tcg ccc tgg gcc tac Arg Phe Arg Pro Pro Thr Asn Leu Arg Ser Val Ser Pro Trp Ala Tyr 90 95 100	880
45	aga atc tcc tac gac ccg gcg agg tac ccc agg tac ctg cct gaa gcc Arg Ile Ser Tyr Asp Pro Ala Arg Tyr Pro Arg Tyr Leu Pro Glu Ala 105 110 115	928
50	tac tgc ctg tgc cgg ggc tgc ctg acc ggg ctg ttc ggc gag gag gac Tyr Cys Leu Cys Arg Gly Cys Leu Thr Gly Leu Phe Gly Glu Glu Asp 120 125 130 135	976
55	gtg cgc ttc cgc agc gcc cct gtc tac atg ccc acc gtc gtc ctg cgc Val Arg Phe Arg Ser Ala Pro Val Tyr Met Pro Thr Val Val Leu Arg 140 145 150	1024
60		

## ES 2 300 154 T3

5	cgc acc ccc gcc tgc gcc ggc ggc cgt tcc gtc tac acc gag gcc tac Arg Thr Pro Ala Cys Ala Gly Gly Arg Ser Val Tyr Thr Glu Ala Tyr 155 160 165	1072
10	gtc acc atc ccc gtg ggc tgc acc tgc gtc ccc gag ccg gag aag gac Val Thr Ile Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Pro Glu Pro Glu Lys Asp 170 175 180	1120
15	gca gac agc atc aac tcc agc atc gac aaa cag ggc gcc aag ctc ctg Ala Asp Ser Ile Asn Ser Ser Ile Asp Lys Gln Gly Ala Lys Leu Leu 185 190 195	1168
20	ctg ggc ccc aac gac gcg ccc gct ggc ccc tga g gccgggtcctg Leu Gly Pro Asn Asp Ala Pro Ala Gly Pro *	1212
25	ccccgggagg tctccccggc ccgcattcccg aggcgcggaa gctggagccg cctggagggc tcggtcggcg acctctgaag agagtgcacc gagcaaacca agtgcggag caccagcgcc gccttccat ggagactcgt aagcagcttc atctgacacg ggaatccctg gcttgcttt agctacaagc aagcagcgtg gctggaaagct gatggaaac gacccggcac gggcatcctg tgtgeggccc gcatggaggg tttggaaaaag ttcacggagg ctccttgagg agcctctcag atcggctgct gcggtgcag ggcgtgactc accgctgggt gcttgccaaa gagataggg cgcatatgtt ttttaaagca atctaaaaat aataataagt atagcgacta tatacctact tttaaaatca actgttttga atagaggcag agctattttta tattatcaa tgagagctac tctgttacat ttcttaacat ataaaacatcg tttttactt cttctggtag aattttttaa agcataatttga aatcccttgg ataaaattttttagctggtagt acctctggctt gggctctga attcagcctg tcaccgatgg ctgactgatg aaatggacac gtcctcatctg acccacttt ccttccactg aaggctttca cgggccttcca ggtggaccaa agggatgcac aggccgctcg catgccccag ggccagctaa gagttccaaa gatctcagat ttgggttttag tcatgaataac 40 ataaaacatgc tcaaactcgc acaattttt ccccttttggaaagccactg gggccaattt gtggtaaga ggtggtgaga taagaagtttgg aacgtgacat ctttgccagt tgcagaaga atccaagcag gtatggctt agttgttaagg gctttaggat caggccgaat atgaggacaa 45 agtggggccac gtttagcatct gcagagatca atctggaggc tttctgttttgcattctg acgagagacta ggtccttgat ctttttttta gattaaaatgt ctgtctctga acacaattat ttgtaaaaatgt tagaagttct tttttaaaatc ataaaagag gcttgctgaa aaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaa	1272 1332 1392 1452 1512 1572 1632 1692 1752 1812 1872 1932 1992 2052 2112 2172 2232 2292 2352 2361
50	<210> 17	
	<211> 209	
55	<212> PRT	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	

60

65

## ES 2 300 154 T3

&lt;400&gt; 17

5                   Met Leu Gly Ala Leu Val Trp Met Leu Val Ala Gly Phe Leu Leu Ala  
 1                   1                   5                   10                   15  
  
 10                   Leu Pro Pro Ser Trp Ala Ala Gly Ala Pro Arg Ala Gly Arg Arg Pro  
 20                   20                   25                   30  
 Ala Arg Pro Arg Gly Cys Ala Asp Arg Pro Glu Glu Leu Leu Glu Gln  
 35                   35                   40                   45  
 15                   Leu Tyr Gly Arg Leu Ala Ala Gly Val Leu Ser Ala Phe His His Thr  
 50                   50                   55                   60  
 Leu Gln Leu Gly Pro Arg Glu Gln Ala Arg Asn Ala Ser Cys Pro Ala  
 65                   65                   70                   75                   80  
 20                   Gly Gly Arg Pro Ala Asp Arg Arg Phe Arg Pro Pro Thr Asn Leu Arg  
 85                   85                   90                   95  
 Ser Val Ser Pro Trp Ala Tyr Arg Ile Ser Tyr Asp Pro Ala Arg Tyr  
 100                   100                   105                   110  
 25                   Pro Arg Tyr Leu Pro Glu Ala Tyr Cys Leu Cys Arg Gly Cys Leu Thr  
 115                   115                   120                   125  
 Gly Leu Phe Gly Glu Glu Asp Val Arg Phe Arg Ser Ala Pro Val Tyr  
 130                   130                   135                   140  
 30                   Met Pro Thr Val Val Leu Arg Arg Thr Pro Ala Cys Ala Gly Gly Arg  
 145                   145                   150                   155                   160  
 Ser Val Tyr Thr Glu Ala Tyr Val Thr Ile Pro Val Gly Cys Thr Cys  
 165                   165                   170                   175  
 35                   Val Pro Glu Pro Glu Lys Asp Ala Asp Ser Ile Asn Ser Ser Ile Asp  
 180                   180                   185                   190  
 Lys Gln Gly Ala Lys Leu Leu Leu Gly Pro Asn Asp Ala Pro Ala Gly  
 40                   195                   200                   205  
 Pro  
  
 45                   <210> 18  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 50                   <213> *Homo sapiens*

55

60

65

# ES 2 300 154 T3

<400> 18

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

Ala Tyr Cys Leu Cys Arg Gly Cys Leu Thr Gly Leu Phe Gly Glu Glu  
       100           105           110  
 25        Asp Val Arg Phe Arg Ser Ala Pro Val Tyr Met Pro Thr Val Val Leu  
       115           120           125  
       Arg Arg Thr Pro Ala Cys Ala Gly Gly Arg Ser Val Tyr Thr Glu Ala  
       130           135           140  
 30        Tyr Val Thr Ile Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Pro Glu Pro Glu Lys  
       145           150           155           160  
       Asp Ala Asp Ser Ile Asn Ser Ser Ile Asp Lys Gln Gly Ala Lys Leu  
       165           170           175  
 35        Leu Leu Gly Pro Asn Asp Ala Pro Ala Gly Pro  
       180           185

40        <210> 19  
       <211> 54  
       <212> PRT  
 45        <213> *Homo sapiens*

<400> 19

50        Gln Leu Gly Pro Arg Glu Gln Ala Arg Asn Ala Ser Cys Pro Ala Gly  
       1           5           10           15  
       Gly Arg Pro Ala Asp Arg Arg Phe Arg Pro Pro Thr Asn Leu Arg Ser  
       20           25           30  
 55        Val Ser Pro Trp Ala Tyr Arg Ile Ser Tyr Asp Pro Ala Arg Tyr Pro  
       35           40           45  
       Arg Tyr Leu Pro Glu Ala  
       50

65        <210> 20  
       <211> 16  
       <212> PRT

ES 2 300 154 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

5

Arg Pro Ala Asp Arg Arg Phe Arg Pro Pro Thr Asn Leu Arg Ser Val  
1 5 10 15

10 <210> 21

<211> 57

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

20 Arg Arg Thr Pro Ala Cys Ala Gly Gly Arg Ser Val Tyr Thr Glu Ala  
1 5 10 15

25 Tyr Val Thr Ile Pro Val Gly Cys Thr Cys Val Pro Glu Pro Glu Lys  
20 25 30  
Asp Ala Asp Ser Ile Asn Ser Ser Ile Asp Lys Gln Gly Ala Lys Leu  
35 40 45  
30 Leu Leu Gly Pro Asn Asp Ala Pro Ala  
50 55

35 <210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40 <400> 22

45 Ser Tyr Asp Pro Ala Arg Tyr Pro Arg Tyr Leu Pro Glu Ala  
1 5 10

50

55

60

65