



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 285 701**

51 Int. Cl.:

**C07H 17/00** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**A61K 31/70** (2006.01)

**A61K 35/14** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95903521 .3**

86 Fecha de presentación : **07.11.1994**

87 Número de publicación de la solicitud: **0792278**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.09.1997**

54 Título: **Factor-gamma de necrosis tumoral.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**16.11.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**16.11.2007**

73 Titular/es: **HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.**  
**9410 Key West Avenue**  
**Rockville, Maryland 20850-3338, US**

72 Inventor/es: **Yu, Guo-Liang;**  
**Ni, Jian y**  
**Rosen, Craig A.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 285 701 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-gamma de necrosis tumoral.

5 Esta invención se refiere a polinucleótidos recientemente identificados, a polipéptidos codificados por tales polinucleótidos, y al uso de tales polinucleótidos y polipéptidos, así como a la producción de tales polinucleótidos y tales polipéptidos. Más particularmente, el polipéptido de la presente invención ha sido identificado como un nuevo miembro de la familia de los factores de la necrosis tumoral y se denomina en lo sucesivo "TNF-gamma". La invención se refiere también a la inhibición de la acción de tales polipéptidos.

10 Los factores de la necrosis tumoral humana,  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) y  $\beta$  (TNF- $\beta$  ó linfotoxina), son miembros relacionados de una amplia clase de mediadores polipeptídicos, que incluye los interferones, las interleuquinas y los factores de crecimiento, que se denominan colectivamente citoquinas (Beutler, B. y Cerami, A., Annu. Rev. Immunol., 7:625-655 (1989)).

15 El factor de la necrosis tumoral (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ) fue descubierto originalmente como resultado de su actividad anti-tumoral; sin embargo, actualmente es reconocido como una citoquina pleiotrópica que desempeña papeles importantes en la regulación de la inmunidad y en la inflamación. Hasta la fecha, existen ocho miembros conocidos de la familia de las citoquinas relacionada con el TNF, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  (linfotoxina- $\alpha$ ), LT- $\beta$ , y ligandos para los receptores Fas, CD30, CD27, CD40 y 4-1BB. Estas proteínas han conservado secuencias del extremo carboxilo terminal y secuencias variables del extremo amino terminal que se usan frecuentemente como anclajes de membrana, con la excepción del TNF- $\beta$ . El TNF- $\alpha$  y el TNF- $\beta$ , ambos, actúan como homotrímeros cuando se fijan a receptores del TNF.

25 El TNF es producido por diversos tipos de células, incluyendo monocitos, fibroblastos, células T, células matadoras (NK) naturales y, predominantemente, por macrófagos activados. Se ha indicado que el TNF- $\alpha$  desempeña un papel importante en la necrosis rápida de tumores, la inmuoestimulación, las enfermedades autoinmunitarias, el rechazo de injertos, la resistencia a parásitos, la producción de una respuesta antiviral, el choque séptico, la regulación del crecimiento, los efectos del endotelio vascular y los efectos metabólicos. El TNF- $\alpha$  desencadena el que las células endoteliales secreten diversos factores, con inclusión de PAI-1, IL-1, GM-CSF e IL-6, favoreciendo la proliferación celular. Además, el TNF- $\alpha$  regula, en aumento, diversas moléculas de adhesión celular tales como Selectina E, ICAM-1 y VCAM-1. Se ha indicado también que el TNF- $\alpha$  y el ligando de Fas inducen la muerte celular programada.

35 La primera etapa de la inducción de las diversas respuestas celulares que ocurren con mediación del TNF o la LT, es su unión a receptores específicos de la superficie celular. Dos diferentes receptores del TNF de aproximadamente 55 KDa (TNF-R1) y de 75 KDa (TNF-R2) han sido identificados (Hohman, H. P. *et al.*, J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989)), y han sido aislados y caracterizados cDNAs del hombre y del ratón que corresponden a ambos tipos de receptores (Loetscher, H. *et al.*, Cell, 61:351 (1990)). Ambos TNF-Rs comparten la estructura típica de los receptores de la superficie celular incluyendo las regiones extracelular, transmembranal e intracelular.

45 El polipéptido de la presente invención ha sido identificado como un miembro nuevo de la familia del TNF basándose en semejanzas estructurales, de homología de la secuencia de aminoácidos y de funcionalidad; por ejemplo, el TNF-gamma es una proteína pro-inflamatoria.

50 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un nuevo polipéptido maduro que es el TNF-gamma. Además, se describen en esta memoria fragmentos, análogos y derivados del mismo, biológicamente activos, útiles desde el punto de vista del diagnóstico o terapéutico. El polipéptido de la presente invención es de origen humano.

55 Según otro aspecto de la presente invención, se proporcionan moléculas aisladas de ácidos nucleicos que codifican el TNF-gamma humano, incluyendo mRNAs, DNAs, cDNAs, y DNAs genómicos. Además se describen en esta memoria análogos y fragmentos y sus derivados biológicamente activos y útiles desde el punto de vista del diagnóstico o terapéutico.

60 Según todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para producir tal polipéptido mediante técnicas recombinantes, que comprende cultivar células huésped procarióticas y/o eucarióticas recombinantes, que contienen una secuencia de ácidos nucleicos del TNF-gamma humano, en condiciones que favorecen la expresión de dicha proteína y la recuperación subsiguiente de dicha proteína.

65 Según todavía otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para utilizar tal polipéptido, o polinucleótido que codifica tal polipéptido, para seleccionar agonistas y antagonistas, y con fines terapéuticos, por ejemplo, curación de heridas, inhibición de la proliferación de tumores, proporcionar resistencia a parásitos, bacterias y virus, inducir actividades inflamatorias, inducir la proliferación de células endoteliales y ciertas células hematopoyéticas, tratamiento de las restenosis y evitar ciertas enfermedades autoinmunitarias.

## ES 2 285 701 T3

Según todavía otro aspecto de la presente invención, se proporcionan también sondas de ácidos nucleicos que comprenden moléculas de ácidos nucleicos de longitud suficiente para hibridarse específicamente con secuencias del TNF-gamma humano.

5 Se describen agonistas del TNF-gamma que imitan al TNF-gamma y se unen a los receptores del TNF-gamma provocando respuestas del tipo del TNF-gamma.

Según todavía otro aspecto de la presente invención, se proporcionan antagonistas para tales polipéptidos, que pueden ser utilizados para inhibir la acción de tales polipéptidos, por ejemplo, evitar el choque séptico, la inflamación, la malaria cerebral, la activación del virus HIV, el rechazo de injertos, la resorción ósea y la caquexia.

Según todavía otro aspecto de la presente invención, se proporcionan ensayos diagnósticos para detectar enfermedades relacionadas con la sub-expresión y la sobre-expresión del polipéptido del TNF-gamma y de secuencias de ácidos nucleicos que codifican tal polipéptido.

15 Estos y otros aspectos de la presente invención deben ser evidentes para los expertos en la técnica, teniendo en cuenta las enseñanzas que aquí figuran.

Los dibujos que siguen son ilustrativos de realizaciones de la invención y no significan limitar el alcance de la invención, tal como incluyen las reivindicaciones.

La Figura 1 ilustra el cDNA y la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida, del polipéptido de la presente invención. Los 25 aminoácidos iniciales (subrayados) son la secuencia líder putativa. Se emplean las abreviaturas estándar de una letra para los aminoácidos.

25 La Figura 2 ilustra la alineación de la secuencia de aminoácidos entre el TNF-gamma y otros miembros de la familia del TNF. El TNF-gamma contiene los restos de aminoácidos conservados de la familia del TNF como indican las zonas sombreadas

30 La Figura 3A es un análisis de transferencia de RNA que muestra los tejidos humanos en que se expresa el TNF-gamma. El RNA procedente de los tejidos indicados fue sondado utilizando como sonda cDNA del TNF-gamma marcado. El mRNA del TNF-gamma existe predominantemente en el riñón ya que la Figura 3A manifiesta una banda definida. Otras calles parecen mostrar una hibridación fuerte; no obstante son, en realidad, manchas inespecíficas.

35 La Figura 3B es un análisis de transferencia de RNA que muestra que el TNF-gamma es expresado principalmente en células HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana) que es la calle 9. La calle 6 y la calle 8 son manchas inespecíficas. El RNA procedente de las líneas celulares indicadas fue sondado utilizando como sonda cDNA del TNF-gamma marcado. La calle 1 es CAMA1 (cancer de mama); la calle 2 AN3CA (cáncer uterino); la calle 3 SK.UT.1 (cáncer uterino); la calle 4, MG63 (osteoblastoma); la calle 5, HOS (osteoblastoma); la calle 6, MCF7 (cáncer de mama); la calle 7, OVCA-3 (cáncer de ovario); la calle 8, CAOV-3 (cáncer de ovario); la calle 9, HUVEC; la calle 10, AOSMIC (músculo liso); la calle 11, fibroblasto preprucial.

45 La Figura 4 es una fotografía de un gel después de someter a electroforesis TNF-gamma que había sido producido por expresión bacteriana y purificación.

La Figura 5 es una fotografía de un gel después de expresión de TNF-gamma, en un sistema de baculovirus.

50 La Figura 6A es una fotografía de células WEHI 164 que están sin tratar (parte superior izquierda) y después de exposición a TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  y TNF-gamma. Las células que tienen una morfología no redondeada, alargada, han sido lisadas. El TNF añadido fue, aproximadamente, 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Las fotografías fueron tomadas 72 horas después de la adición de TNF.

55 La Figura 6B ilustra la aptitud del TNF-gamma en comparación con el TNF- $\alpha$  y el TNF- $\beta$ , para inhibir el crecimiento de las células WEHI 164.

La Figura 7 ilustra la aptitud del TNF-gamma, el TNF- $\alpha$  y el TNF- $\beta$ , recombinantes, para inducir la muerte de las células WEHI 164.

60 La Figura 8 ilustra la aptitud del TNF- $\alpha$ , el TNF- $\beta$  y el TNF-gamma recombinantes para inducir un cambio morfológico en células L929. El cambio morfológico viene indicado por células redondeadas oscuras. Las células fueron tratadas con TNF recombinante producido en *E. coli*, en aproximadamente 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Las fotografías fueron tomadas 72 horas después de la adición de TNF. El cambio morfológico indica que las células habían sido matadas.

65 La Figura 9 es una ilustración gráfica del efecto del TNF-gamma, el TNF- $\alpha$  y el TNF- $\beta$  sobre células endoteliales venosas. La proliferación celular después de tratar las células endoteliales venosas con TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ , de que se dispone en el comercio, y TNF-gamma producido en *E. coli*, fue cuantificada usando un ensayo MTS.

## ES 2 285 701 T3

La Figura 10 es una fotografía de células HL60 con testigo, que muestra que las células HL60 están diseminadas; el TNF- $\alpha$  y el TNF-gamma inducen la adhesión celular y el contacto de célula a célula como viene ilustrado por las células que se adhieren quedando juntas, en la parte inferior de la derecha.

5 La Figura 11 ilustra que el TNF-gamma no se fija de modo importante a dos receptores del TNF soluble conocidos, el sTNF RI (p55) y el sTNF RII (p5).

10 Según un aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico aislado (polinucleótido) que codifica el polipéptido maduro que posee la secuencia de aminoácidos deducida, de la Figura 1, o el polipéptido maduro codificado por el cDNA del clon depositado como Depósito de ATCC N° 75927 el 26 de Octubre de 1994.

15 El polinucleótido que codifica el polipéptido de la presente invención puede ser obtenido a partir de riñón humano y células endoteliales de vena umbilical. El polinucleótido de esta invención fue descubierto en una biblioteca de cDNA derivada de una célula endotelial de vena umbilical humana. Está estructuralmente relacionado con la familia de los TNF. Contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 174 restos de aminoácidos de los cuales los primeros 25 restos de aminoácidos, aproximadamente, constituyen la secuencia líder putativa, por lo que la proteína madura comprende 146 aminoácidos. La proteína pone de manifiesto el máximo grado de homología en el extremo carboxilo terminal con el TNF- $\alpha$  del conejo, con 38% de identidad y 58% de semejanza sobre una extensión de 111 aminoácidos. Las secuencias conservadas en todos los miembros de la familia de los TNF están conservadas también en el TNF-gamma (véase la Figura 2). Las letras en negrilla indican restos de aminoácidos conservados. El mRNA del TNF-gamma es expresado, específicamente, en células endoteliales de venas umbilicales humanas como muestra el análisis de transferencia de RNA de la Figura 3B.

25 El polinucleótido de la presente invención puede estar en la forma de RNA o en la forma de DNA, cuyo DNA incluye cDNA, DNA genómico y DNA sintético. El DNA puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificadora o la cadena no codificadora (anti-sentido). La secuencia codificadora que codifica el polipéptido maduro puede ser idéntica a la cadena codificadora indicada en la Figura 1 o la del clon depositado, o puede ser una secuencia codificadora diferente, cuya secuencia codificadora, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido maduro que el DNA de la Figura 1 o el cDNA depositado.

30 El polinucleótido que codifica el polipéptido maduro de la Figura 1 o el polipéptido maduro codificado por el cDNA depositado, puede incluir, aun cuando no se limita a ello: solamente la secuencia codificadora para el polipéptido maduro; la secuencia codificadora para el polipéptido maduro y una secuencia codificadora adicional tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia proproteínica; la secuencia codificadora del polipéptido maduro (y opcionalmente una secuencia codificadora adicional) y una secuencia no codificadora, tal como secuencia de intrones o secuencia no codificadora de 5' y/o 3' de la secuencia codificadora para el polipéptido maduro.

35 Así pues, la expresión "polinucleótido que codifica un polipéptido" engloba un polinucleótido que incluye solamente la secuencia codificadora para el polipéptido y también un polinucleótido que incluye una secuencia adicional codificadora y/o no codificadora.

40 Además, se describen en esta memoria variantes de los polinucleótidos aquí descritos que codifican fragmentos, análogos y derivados del polipéptido que tienen la secuencia de aminoácidos deducida, de la Figura 1 ó el polipéptido codificado por el cDNA del clon depositado. La variante del polinucleótido puede ser una variante alélica natural del polinucleótido o una variante no natural del polinucleótido.

45 Por tanto, la presente invención incluye polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido maduro que se indica en la Figura 1 o el mismo polipéptido maduro codificado por el cDNA del clon depositado. Además, en esta memoria se describen variantes de tales polinucleótidos cuyas variantes codifican un fragmento, derivados o análogos del polipéptido de la Figura 1 o el polipéptido codificado por el cDNA del clon depositado. Tales variantes de nucleótidos incluyen variantes por supresión, variantes por sustitución y variantes de adición o inserción.

50 Como se ha indicado anteriormente en esta memoria, el polinucleótido puede tener una secuencia codificadora que es una variante alélica natural de la secuencia codificadora indicada en la Figura 1 o de la secuencia codificadora del clon depositado. Como es sabido en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia de un polinucleótido que puede tener una sustitución, una supresión o una adición de uno o más nucleótidos, que no alteran sustancialmente la función del polipéptido codificado.

55 La presente invención incluye también polinucleótidos en los que la secuencia codificadora del polipéptido maduro puede estar fusionada en el mismo marco de lectura con una secuencia de un polinucleótido que ayuda en la expresión y secreción de un polipéptido desde una célula huésped. Por ejemplo, una secuencia líder que actúa como secuencia secretora para regular el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia líder es una preproteína y puede tener la secuencia líder segmentada por la célula huésped dando lugar a la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos pueden codificar también una proproteína que es la proteína madura más restos adicionales de aminoácidos del extremo 5'. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína y es una forma inactiva de la proteína. Una vez segmentada la prosequencia, permanece una proteína madura activa.

## ES 2 285 701 T3

Así pues, por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención puede codificar una proteína madura, o una proteína que posee una prosequencia o una proteína que tiene ambas, una prosequencia y una presequencia (secuencia líder).

5 Los polinucleótidos de la presente invención pueden tener, asimismo, la secuencia codificadora fusionada en el marco de lectura con una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia marcadora puede ser una marca de hexahistidina suministrada por un vector pQE-9, proporcionado la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador, en el caso de un hospedante bacteriano, o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser una marca de hemaglutinina (HA) cuando se utiliza un hospedante mamífero, por ejemplo, células COS-7. La marca de HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina de la influenza (Wilson, I., *et al.*, Cell, 37:767 (1984)).

15 La presente invención se refiere, además, a polinucleótidos que se hibridan con las secuencias descritas anteriormente en esta memoria, si existe al menos 50% y preferiblemente 70%, de identidad entre las secuencias. La presente invención se refiere, en particular, a polinucleótidos que se hibridan en condiciones restrictivas con los polinucleótidos descritos anteriormente en esta memoria. Tal como aquí se emplea, la expresión “condiciones restrictivas” significa que la hibridación solamente tiene lugar si existe por lo menos 95% y de preferencia, al menos 97% de identidad entre las secuencias. Los polinucleótidos que se hibridan con los polinucleótidos anteriormente descritos en esta memoria, en una realización preferida codifican polipéptidos que retienen sustancialmente la misma función biológica o actividad que el polipéptido maduro codificado por el cDNA de la Figura 1 o el cDNA depositado.

20 El depósito o depósitos a que se alude en esta memoria son mantenidos bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con fines de Procedimiento de Patentes. Estos depósitos de proporcionan, simplemente, como conveniencia para los expertos en la técnica y no la admisión de que se requiera un depósito bajo el 35 U.S.C § 112. La secuencia de los polinucleótidos contenidos en los materiales depositados, así como la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos codificados por ella, se incorporan aquí por referencia y regulan en el caso de cualquier conflicto con alguna descripción de las secuencias de esta memoria. Puede requerirse una licencia para hacer, usar o vender los materiales depositados y ninguna licencia tal es otorgada por este medio.

25 La presente invención se refiere, además, a un polipéptido de TNF-gamma que posee la secuencia de aminoácidos deducida de la Figura 1 o que posee la secuencia de aminoácidos codificada por el cDNA depositado. También se describen aquí fragmentos, análogos y derivados de tal polipéptido.

30 Los términos “fragmento”, “derivado” y “análogo”, cuando hacen referencia al polipéptido de la Figura 1 o al codificado por el cDNA depositado, significan un polipéptido que retiene esencialmente la misma función o actividad biológica que tal polipéptido. Así, un análogo incluye una proproteína que puede ser activada por segmentación de la parte de proproteína, produciendo un polipéptido maduro activo.

35 El polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético, preferiblemente un polipéptido recombinante.

40 El fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la Figura 1 o el codificado por el cDNA depositado, puede ser (i) uno en el que uno o más de los restos de aminoácidos están sustituidos con un resto de aminoácido conservado o sin conservar (preferiblemente un resto de aminoácido conservado) y tal resto de aminoácido sustituido puede ser o puede no ser uno codificado mediante el código genético, o (ii) uno en el que uno o más de los restos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente, o (iii) uno en el que el polipéptido maduro está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semi-vida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales están fusionados con el polipéptido maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que es empleada para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Se considera que tales fragmentos, derivados y análogos, están dentro del alcance de los expertos en la técnica, teniendo en cuenta las enseñanzas que aquí figuran.

45 Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se proporcionan, preferiblemente, en forma aislada, y, preferiblemente, son purificados hasta homogeneidad.

50 El término “aislado” significa que el material está separado de su medio ambiente original (por ejemplo, el medio ambiente natural si ocurre naturalmente). Por ejemplo, un polinucleótido o un polipéptido natural presente en un animal vivo no es aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado desde alguno o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, es aislado. Tales polinucleótidos podrían formar parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían formar parte de una composición, y todavía ser aislado, ya que tal vector o tal composición no forma parte de su medio ambiente natural.

55 La presente invención se refiere también a vectores que incluyen polinucleótidos de la presente invención, células huésped que son modificadas genéticamente con vectores de la invención y la producción de polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes.

## ES 2 285 701 T3

Las células huésped son modificadas por ingeniería genética (transducidas, transformadas o transfectadas) con los vectores de esta invención que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede tener, por ejemplo, la forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células huésped modificadas pueden ser cultivadas en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes del TNF-gamma. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y semejantes, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos de habilidad ordinaria.

Los polinucleótidos de la presente invención pueden ser empleados para producir polipéptidos mediante técnicas recombinantes. Así, por ejemplo, el polinucleótido puede ser incluido en una cualquiera de una diversidad de vectores de expresión para expresar un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de DNA cromosómicos, no cromosómicos y sintéticos, por ejemplo, derivadas de SV40; plásmidos bacterianos; DNA fágicos; baculovirus; plásmidos de levaduras; vectores que derivan de combinaciones de plásmidos y DNA fágico; DNA viral tal como virus vacunal, adenovirus, poxvirus aviar y pseudorrabia. Sin embargo, puede utilizarse cualquier otro vector en tanto sea capaz de replicación y viable en el hospedante.

La secuencia de DNA apropiada puede ser insertada en el vector mediante una diversidad de procedimientos operatorios. En general, la secuencia de DNA se inserta en un sitio o sitios apropiados de endonucleasas de restricción mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se considera que tales procedimientos y otros están dentro del alcance de los expertos en la técnica.

La secuencia de DNA en el vector de expresión está ligada operativamente a una secuencia o secuencias apropiadas de control de la expresión (promotor) para dirigir la síntesis de mRNA. Como ejemplos representativos de tales promotores, pueden citarse: el promotor LTR o SV40, el *lac* o *trp* de *E. coli*, el promotor P<sub>L</sub> lambda fágico y otros promotores que se sabe controlan la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión contiene también un sitio de unión de ribosomas para iniciar la traducción y un terminador de la transcripción. El vector puede incluir también secuencias apropiadas para amplificar la expresión.

Además, los vectores de expresión contienen preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas, tales como resistencia a la dihidrofolato-reductasa o a la neomicina, para cultivos de células eucarióticas, o tal como resistencia a la tetraciclina o la ampicilina, en *E. coli*.

El vector que contiene la secuencia de DNA apropiada según se ha descrito en esta memoria, así como un promotor o secuencia de control apropiados, puede ser empleado para transformar un hospedante apropiado permitiendo que el hospedante exprese la proteína.

Como ejemplos representativos de hospedantes apropiados, pueden citarse; células bacterianas tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; células de hongos, tales como levaduras; células de insectos tales como *Drosophila S2* y *Sf9*; células animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; células vegetales, etc. Se considera que la selección de un hospedante apropiado se encuentra dentro del alcance de los expertos en la técnica, teniendo en cuenta las enseñanzas de esta memoria.

Más particularmente, la presente invención incluye también construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias descritas ampliamente antes. Las construcciones comprenden un vector, tal como un plásmido o vector viral, en el que ha sido insertada una secuencia de la invención, en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende, además, secuencias reguladoras que incluyen, por ejemplo, un promotor, ligado operablemente a la secuencia. Gran número de vectores y promotores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica, y se encuentran disponibles en el comercio. A título de ejemplo se proporcionan los vectores que siguen. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucarióticos: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, puede usarse cualquier otro plásmido o vector en tanto puedan replicarse y ser viables en el hospedante.

Regiones de promotor pueden seleccionarse desde cualquier gen deseado usando vectores CAT (cloranfenicol-transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son el PKK232-8 y el PCM7. Los promotores particulares denominados bacterianos incluyen *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, lambda P<sub>R</sub>, P<sub>L</sub> y *trp*. Los promotores eucarióticos incluyen CMV inmediato precoz, timidina-quinasa de HSV, SV40 precoz y tardío, LTRs procedentes de retrovirus y metalotioneina-I del ratón. La selección del vector y el promotor apropiados se encuentra dentro del nivel de conocimiento ordinario de la técnica.

En otra realización, la presente invención se refiere a células huésped que contienen las construcciones descritas. La célula huésped puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariótica inferior, tal como una célula de levadura, o la célula huésped puede ser una célula procariótica, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección con mediación de DEAE-Dextrano, o por electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., *Basic Methods in Molecular Biology*, (1986)).

## ES 2 285 701 T3

Las construcciones en células huésped pueden ser usadas de modo convencional para obtener el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Alternativamente, los polipéptidos de la invención pueden ser producidos sintéticamente mediante sintetizadores convencionales de péptidos.

5 Las proteínas maduras pueden ser expresadas en células de mamífero, levaduras, bacterias u otras células, bajo el control de promotores apropiados. También pueden emplearse para producir tales proteínas, sistemas de traducción sin células, usando RNAs derivados de las construcciones de DNA de la presente invención. Vectores de clonación y expresión apropiados para usar con hospedantes procarióticos y eucarióticos, han sido descritos por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).

10 La transcripción del DNA que codifica los polipéptidos de la presente invención mediante eucariotas superiores, es aumentada mediante la inserción en el vector de una secuencia de un potenciador. Los potenciadores son elementos de DNA de efecto cis, habitualmente de alrededor de 10 a 300 bp que actúan sobre un promotor aumentando su transcripción. Ejemplos de ellos incluyen el potenciador de SV40 sobre el lado lejano del origen de la replicación, bp 15 100 a 270, un potenciador del promotor cercano del citomegalovirus, el potenciador de poliomias sobre el lado lejano del origen de la replicación, y los potenciadores de adenovirus.

En general, los vectores de expresión recombinantes incluyen orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten transformar la célula huésped, por ejemplo, el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 del *S. cerevisiae*, y un promotor derivado desde un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural situada aguas abajo. Tales promotores pueden ser derivados de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como la 3-fosfoglicerato-quinasa (PGK), el factor  $\alpha$ , la fosfatasa ácida o proteínas de choque térmico, entre otros. La secuencia estructural heteróloga es ensamblada en la fase adecuada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción y, de preferencia, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida hacia el espacio periplásmico o el medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión incluyendo un péptido de identificación del extremo amino terminal que comunica características deseadas, por ejemplo, estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

30 Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de DNA estructural que codifica una proteína deseada, junto con señales adecuadas de iniciación y terminación de la traducción en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector puede comprender uno o más marcadores fenotípicos seleccionables y un origen de la replicación, para asegurar el mantenimiento del vector y, si es deseable, proporcionar amplificación dentro del hospedante. Los hospedantes procarióticos adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y especies diversas dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aun cuando pueden emplearse también otros, como objeto de elección.

Como ejemplo representativo pero no limitativo, los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen bacteriano de replicación derivado de plásmidos de que se dispone en el comercio, que comprenden elementos genéticos del conocido vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, el pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) y el GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EE.UU.). Estas secciones de "espinas dorsales" del pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que ha de ser expresada,

45 Después de la transformación de una cepa adecuada de un hospedante y de crecimiento de la cepa del hospedante hasta obtener una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado es inducido por medios apropiados (por ejemplo, desplazamiento de la temperatura o inducción química) y las células son cultivadas durante un período adicional.

50 Las células se recolectan, típicamente, mediante centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante se retiene para su purificación posterior.

Las células microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden romperse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o uso de agentes de lisado de células; tales métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

55 También pueden emplearse para expresar proteínas recombinantes, sistemas diversos de cultivos de células de mamífero. Ejemplos de sistemas de expresión de células de mamífero incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descrita por Gluzman, Cell, 23:175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender un origen de replicación, un promotor adecuado y un potenciador, y también cualesquiera sitios necesarios de unión de ribosomas, sitio de poliadenilación, sitios de donante y aceptador de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción y secuencias sin transcribir de flanqueo del extremo 5'. Secuencias de DNA derivadas de los sitios de corte y empalme de SV40 y de los sitios de poliadenilación pueden ser usadas para proporcionar los elementos genéticos sin transcribir que se requieren.

65 Los polipéptidos del TNF-gamma pueden ser recuperados y purificados partiendo de cultivos de células recombinantes por métodos que incluyen precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromato-

grafía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatito y cromatografía con lectina. Pueden usarse, si es necesario, etapas de repliegamiento de proteínas para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, puede emplearse cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para las etapas finales de purificación.

5 Los polipéptidos de la presente invención pueden ser un producto purificado de modo natural o un producto de procedimientos sintéticos químicos, o puede haber sido producido mediante técnicas recombinantes partiendo de un hospedante procariótico o eucariótico (por ejemplo, mediante células bacterianas, de levadura, células de vege-  
tales superiores, células de insecto y de mamífero, en cultivo). Dependiendo del hospedante empleado en un pro-  
cedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden ser glicosilados o pue-  
den ser no glicosilados. Los polipéptidos de la invención pueden incluir también un resto inicial del aminoácido  
10 metionina.

El polipéptido del TNF-gamma de la presente invención puede ser empleado para inhibir el crecimiento de células tumorales o neoplasias. El polipéptido del TNF-gamma puede ser responsable de la destrucción de tumores mediante  
15 apoptosis que está caracterizada por zeiosis, condensación de citoplasma y la activación de una endonucleasa endógena (Figura 7). Como muestra la Tabla 1, el TNF-gamma posee una fuerte actividad citotóxica para las líneas celulares ensayadas que tienen proliferación y regulación celulares anormales, por ejemplo, la línea celular de fibrosarcomas y carcinomas. Este hecho se ilustra también en las Figuras 6A, 6B y 8 en que se indica que el TNF-gamma posee la capacidad de inhibir el crecimiento de células L929 y WEHI mediante actividad citotóxica. Las células WEHI 164 son  
20 células del fibrosarcoma del ratón. Un método preferible de administración del TNF-gamma es mediante inyección directamente en el tumor.

La actividad de adhesión celular del TNF-gamma puede ser empleada para la curación de heridas. Como muestran la Tabla 1 y la Figura 9, el TNF-gamma tiene un fuerte efecto de proliferación de células endoteliales, lo que es  
25 indicación de que el TNF-gamma desempeña un papel importante en la curación de heridas. Los efectos adhesivos de células del TNF-gamma pueden desempeñar, asimismo, un papel importante en la curación de heridas.

El TNF-gamma puede emplearse también para tratar enfermedades que requieren actividad de promoción del crecimiento, por ejemplo, la restenosis. Como se ha expuesto anteriormente, se pone de manifiesto que el TNF-gamma  
30 posee efectos potentes de proliferación sobre el crecimiento de células endoteliales. Por consiguiente, el TNF-gamma puede emplearse también para regular la hematopoyesis y el desarrollo de células endoteliales.

El polipéptido del TNF-gamma, por su capacidad para estimular la activación de células T, es un mediador impor-  
tante de la respuesta inmunitaria. Por tanto, este polipéptido puede ser usado para estimular una respuesta inmunitaria  
35 contra una diversidad de infecciones parasíticas, bacterianas y virales. El TNF-gamma puede lisar células infectadas con virus y, por consiguiente, puede ser empleado para detener células infectadas por el HIV.

El polipéptido del TNF-gamma puede ser empleado también para tratar enfermedades autoinmunitarias tales como la diabetes de Tipo I, por potenciación de la respuesta proliferativa de células T.  
40

(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

# ES 2 285 701 T3

TABLA 1

Resumen de la actividad del TNF-gamma

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Líneas celulares	Origen y tipo	Actividad			
		Citotoxicidad	Proliferación	Diferenciación	Adhesión
L929	Fibroblasto del ratón	+	-	-	-
WEHI 164	Fibrosarcoma del ratón	+++	-	-	-
NRK-54E	Semejante a epiteliales del riñón de la rata	+	-	-	-
THP-1	Leucemia monocítica humana	+	-	++	++
HL-60	Leucemia promielocítica humana	-	-	-	++
Kaji	Linfoma de Burkitt humano	-	-	-	-
Jurkat	Leucemia de células T humanas	++	-	-	-
Primaria	Células endoteliales venosas humanas	-	++	-	?
Primaria	Células endoteliales arteriales humanas	+*	++	-	?
A-431	Carcinoma epidermoide humano	++	-	-	-
293	Riñón embrionario humano	-	++	-	-

\* Solamente a dosis altas. Los números de + indican el nivel relativo de actividades.

- Indica que no se ha detectado actividad en el nivel de concentración ensayado.

Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención pueden ser empleados como reactivos para investigación y materiales para descubrir tratamientos y diagnósticos para enfermedades humanas.

Esta invención proporciona un método para la identificación del receptor del TNF-gamma. El gen que codifica el receptor puede ser identificado mediante numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, separación de ligandos y clasificación de FACS (Coligan, *et al.*, Current Protocols in Immun., 1(2), Capítulo 5, 1991. Preferiblemente, se emplea clonación de expresión en la que se prepara RNA poliadenilado a partir de una célula que responde al TNF-gamma, y una biblioteca de cDNA creada a partir de este RNA es dividida en agrupaciones y usada para transfectar células COS u otras células que no responden al TNF-gamma. Las células transfectadas que son cultivadas sobre portas de vidrio, se exponen a TNF-gamma marcado. El TNF-gamma puede marcarse por una diversidad de medios que incluyen yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína-quinasa específica del sitio. Después de fijación e incubación, los portas son sometidos a análisis autorradiográfico. Las agrupaciones positivas son identificadas y se preparan sub-agrupaciones que se vuelven a transfectar usando un proceso iterativo de sub-agrupación y re-clasificación, obteniendo finalmente un clon único que codifica el receptor putativo.

## ES 2 285 701 T3

Como enfoque alternativo para la identificación del receptor, el TNF-gamma marcado puede ser ligado por fotoafinidad con preparaciones de extracto o membrana celular que expresan la molécula del receptor. El material reticulado es resuelto mediante PAGE y expuesto a película de rayos X. El complejo marcado que contiene el TNF-gamma-receptor puede ser escindido, resuelto en fragmentos de péptido y sometido a microsecuenciación de proteína. La secuencia de aminoácidos que se obtiene de la microsecuenciación podría usarse para designar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para explorar una biblioteca de cDNA e identificar el gen que codifica el receptor putativo.

El TNF-gamma no se une de modo importante a dos receptores del TNF solubles, el sTNF-RI (p55) y el sTNF-RII (p75). Por consiguiente, el TNF-gamma puede tener actividades inclusivas y adicionales a las de las proteínas del TNF conocidas.

Además, se describe en esta memoria un método de selección de compuestos para identificar aquellos que imitan al TNF-gamma (agonistas) o que evitan el efecto del TNF-gamma. Un ejemplo de un método tal saca partido de la aptitud del TNF-gamma para estimular significativamente la proliferación de células endoteliales humanas en presencia del comitogén Con A. Se obtienen células endoteliales y se cultivan en placas de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Costar, Cambridge, MA) en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (Hyclone Labs, Logan UT), inactivado por calor, al 10%, L-glutamina al 1%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y gentamicina al 0,1% (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY), en presencia de Con-A (Calbiochem, La Jolla, CA), 2 µg/ml. El Con-A y el compuesto que ha de ser seleccionado se añaden hasta un volumen final de 0,2 ml. Al cabo de 60 horas a 37°C, los cultivos son pulsados con 1 µCi de [<sup>3</sup>H]timidina (5 Ci/mmol; 1 Ci = 37 BGq; NEN) durante 12-18 horas y recolectados sobre filtros de fibra de vidrio (PhD; Cambridge Technology, Watertown, MA) Se determina la media de la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina (cpm) de cultivos triplicados, usando un contador de centelleo líquido (Beckman Instruments, Irvine, CA). Una incorporación importante de [<sup>3</sup>H]timidina indica estimulación de la proliferación de células endoteliales.

Alternativamente, podría medirse la respuesta de un segundo sistema mensajero conocido después de la interacción del TNF-gamma y el receptor, y compararse en presencia o ausencia del compuesto. Tales segundos sistemas mensajeros incluyen, aun cuando no se limita a ellos, guanilato-ciclasa de cAMP, canales iónicos o hidrólisis de fosfoinositida.

Para ensayar antagonistas, se lleva a cabo el ensayo antes descrito; sin embargo, en este ensayo se añade TNF-gamma junto con el compuesto a ser seleccionado y la aptitud del compuesto para inhibir la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina en presencia del TNF-gamma, indica que el compuesto es un antagonista del TNF-gamma. Alternativamente, pueden detectarse antagonistas del TNF-gamma combinando TNF-gamma y un antagonista potencial, con receptores o receptores recombinantes del TNF-gamma unidos a la membrana, en condiciones apropiadas para realizar un ensayo de inhibición competitiva. El TNF-gamma puede marcarse, por ejemplo por radiactividad, de tal modo que el número de moléculas de TNF-gamma unidas al receptor pueda determinar la eficacia del antagonista potencial.

Alternativamente, una célula de mamífero o una preparación de membrana que expresan el receptor de TNF-gamma, es incubada con el TNF-gamma marcado, en presencia del compuesto. Luego puede medirse la aptitud del compuesto para potenciar o bloquear esta interacción.

Pueden usarse anticuerpos específicos para el TNF-gamma como antagonistas por unión al TNF-gamma y evitándole que se una a su receptor. A este respecto son particularmente eficaces los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos específicos para el receptor del TNF-gamma, sin embargo, pueden mediar distintas respuestas celulares que tienden a agonizar los efectos del TNF-gamma por interacción con su receptor.

Los antagonistas potenciales del TNF-gamma incluyen también mutantes del TNF-gamma que se unen al receptor de TNF-gamma y no provocan respuesta de segundo mensajero, bloqueando eficazmente el receptor desde su ligando natural. Oligonucleótidos específicamente diseñados y moléculas pequeñas pueden unirse también al receptor del TNF-gamma y bloquearle desde el TNF-gamma. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, aun cuando no se limitan a ellas, péptidos pequeños o moléculas pequeñas semejantes a péptidos.

Otro antagonista potencial del TNF-gamma es una forma soluble del receptor del TNF-gamma que se une al TNF-gamma y evita que reaccione con receptores del TNF-gamma unidos a la membrana. De este modo, los receptores no son estimulados por el TNF-gamma.

Otro antagonista potencial del TNF-gamma es una construcción antisentido preparado usando tecnología de antisentido. Puede usarse tecnología de antisentido para regular la expresión génica mediante la formación de una triple hélice o RNA o DNA antisentido, ambos de cuyos métodos están basados en la unión de un polinucleótido a DNA o RNA. Por ejemplo, se usa la parte codificadora de 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica los polipéptidos maduros de la presente invención, para diseñar un oligonucleótido de RNA antisentido de una longitud desde aproximadamente 10 a 40 pares de bases. El oligonucleótido de DNA está destinado a ser complementario de una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice, -véase Lee *et al.*, Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science, 241:456 (1988); y Dervan *et al.*, Science, 251: 1360 (1991)), evitando con ello la transcripción y la producción de TNF-gamma. El oligonucleótido de RNA antisentido se hibrida con el mRNA *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de mRNA en el polipéptido del TNF-gamma (Antisense - Okano, J. Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Los

## ES 2 285 701 T3

oligonucleótidos descritos pueden ser distribuidos a las células de tal modo que el RNA o DNA antisentido puede ser expresado *in vivo* inhibiendo la producción de TNF-gamma.

5 Los antagonistas de TNF pueden ser empleados también para tratar la caquexia, que es un efecto de aclarado de lípidos que resulta de una deficiencia sistémica de la lipasa lipoproteínica que es suprimida por el TNF-gamma. Los antagonistas del TNF-gamma se emplean también para tratar la malaria cerebral, en la que el TNF-gamma aparece desempeñando un papel patógeno. Los antagonistas pueden emplearse también para tratar la artritis reumatoide al inhibir la producción de citoquinas inflamatorias tales como IL-1 en las células sinoviales, inducida por el TNF-gamma. Cuando se trata la artritis el antagonista de TNF-gamma se inyecta, preferiblemente, por vía intra-articular,

10 Los antagonistas de TNF-gamma pueden emplearse también para prevenir el rechazo de injertos, al evitar la estimulación del sistema inmunitario por el TNF-gamma en presencia de un injerto.

15 Los antagonistas del TNF-gamma pueden emplearse también para tratar la osteoporosis, dado que el TNF-gamma puede inducir la resorción ósea.

También pueden emplearse antagonistas del TNF-gamma como agentes antiinflamatorios, puesto que el TNF-gamma media en una respuesta inflamatoria potenciada.

20 Los antagonistas pueden ser usados también para tratar el choque endotóxico, al que se alude también como choque séptico. Esta condición crítica es el resultado de una respuesta exagerada a una infección bacteriana u otros tipos de infección. Esta respuesta conduce a niveles elevados de TNF-gamma que causa choques y daño en los tejidos.

25 Los antagonistas pueden emplearse en una composición con un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, por ejemplo como se describe más adelante en esta memoria.

Fragmentos del gen del TNF-gamma de longitud total, pueden emplearse como sonda de hibridación para una genoteca de cDNA, para aislar el gen de longitud total y aislar otros genes que poseen una alta semejanza de secuencias con el gen o actividad biológica similar. Las sondas de este tipo pueden tener, por ejemplo, entre 20 y 2000 bases. Preferiblemente, sin embargo, las sondas tienen entre 30 y 50 pares de bases. La sonda puede utilizarse también para identificar un clon de cDNA que corresponde a un transcrito de longitud total y un clon o clones genómicos que contienen el gen del TNF-gamma completo, con inclusión de regiones reguladoras y de promotor, exones e intrones. Un ejemplo de selección, comprende aislar la región codificadora del gen del TNF-gamma usando las secuencias de DNA conocidas para sintetizar una sonda de un oligonucleótido. Oligonucleótidos marcados que tienen una secuencia complementaria de la del gen de la presente invención, se usan para explorar una colección de cDNA humano, DNA genómico o mRNA, y determinar qué miembros de la colección se hibridan con la sonda.

30 Los polipéptidos y antagonistas de la presente invención y agonistas aquí descritos, pueden emplearse en mezcla con un excipiente farmacéutico aceptable. Tales composiciones comprenden una cantidad del compuesto, eficaz desde el punto de vista terapéutico, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo o excipiente incluye, aun cuando no se limita a ellos, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerina, etanol y sus mezclas. La formulación debe ajustarse al modo de administración.

45 La invención proporciona también un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociado a tal recipiente o recipientes pueda haber una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental, que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuya nota refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta, para administración humana. Además, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden emplearse en asociación con otros compuestos terapéuticos.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de un modo conveniente tal como mediante las vías tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de la indicación específica. En general, se administran en una cantidad de al menos aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso, y en la mayoría de los casos, se administrará en una cantidad que no excede de aproximadamente 8  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso, por día. En la mayor parte de los casos, la dosis es desde aproximadamente 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a 1  $\text{mg}/\text{kg}$  de peso, por día, teniendo en cuenta las vías de administración, los síntomas, etc.

60 Los polipéptidos del TNF-gamma y los agonistas y antagonistas que son polipéptidos, pueden emplearse también según la presente invención, por expresión de tales polipéptidos *in vivo*, a lo que se alude con frecuencia como "terapia génica".

Así, por ejemplo, pueden modificarse células de un paciente, con un polinucleótido (DNA o RNA) que codifica un polipéptido *ex vivo*, suministrándole después al paciente que ha de ser tratado, las células modificadas con el polipéptido. Tales métodos son bien conocidos en la técnica y resultan evidentes de las enseñanzas de esta memoria. Por ejemplo, las células pueden modificarse mediante el uso de una partícula retroviral que contiene RNA que codifica un polipéptido de la presente invención.

## ES 2 285 701 T3

Similarmente, pueden modificarse las células *in vivo* para obtener la expresión de un polipéptido *in vivo*, por ejemplo, mediante procedimientos operatorios conocidos en la técnica. Por ejemplo, una célula productora que da lugar a una partícula retroviral que contiene RNA que codifica un polipéptido de la presente invención, puede ser administrada a un paciente para modificar células *in vivo*, y para la expresión de un polipéptido *in vivo*. Estos y otros métodos de administración de un polipéptido de la presente invención mediante tales métodos, deben ser evidentes a los expertos en la técnica teniendo en cuenta las enseñanzas de la presente invención. Por ejemplo, el vehículo de expresión para las células transformadas puede ser distinto de un retrovirus, por ejemplo, un adenovirus que puede ser usado para modificar células *in vivo* después de mezclar con un vehículo de administración adecuado.

Esta invención se refiere también al uso del gen del TNF-gamma como parte de un ensayo de diagnóstico, para detectar enfermedades o susceptibilidad a enfermedades relacionadas con la presencia de TNF-gamma mutado. Tales enfermedades está relacionadas con la sub-expresión de TNF-gamma, por ejemplo, proliferación celular anormal, tales como tumores y cánceres.

Individuos portadores de mutaciones en el gen del TNF-gamma humano, pueden detectarse en el nivel del DNA mediante una diversidad de técnicas. Pueden obtenerse ácidos nucleicos con fines de diagnóstico partiendo de células de un paciente, tales como de sangre, orina, saliva, biopsia de tejidos y material procedente de autopsias. El DNA genómico puede usarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente utilizando PCR (Saiki *et al.*, Nature, 324:163-166 (1986)) con anterioridad al análisis. También puede usarse RNA o cDNA con la misma finalidad. Como ejemplo, cebadores de la PCR complementarios del ácido nucleico que codifica el TNF-gamma, pueden usarse para la identificación y el análisis de mutaciones del TNF-gamma. Por ejemplo, pueden detectarse supresiones e inserciones por un cambio de tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Pueden identificarse mutaciones puntuales por hibridación del DNA amplificado con RNA del TNF-gamma radiomarcado o, alternativamente, secuencias de DNA antisentido del TNF-gamma, radiomarcadas. Las secuencias perfectamente emparejadas pueden distinguirse de los dúplexes sin emparejar por digestión con RNasa A o por diferencias en las temperaturas de fusión.

Un ensayo genético basado en diferencias de las secuencias de DNA, puede ser conseguido mediante la detección de alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de DNA, en geles, con o sin agentes desnaturizantes. Las supresiones e inserciones secuenciales pequeñas pueden ser visualizadas mediante electroforesis de alta resolución en gel. Los fragmentos de DNA de secuencias diferentes pueden distinguirse sobre geles desnaturizantes de gradiente de formamidina en los que las movilidades de diferentes fragmentos de DNA están retardadas en el gel, en posiciones diferentes, según sus temperaturas de fusión específicas o sus temperaturas de fusión parciales (véase, por ejemplo, Myers *et al.*, Science, 230:1242 (1985)).

Los cambios de las secuencias en posiciones específicas, pueden ser revelados también por ensayos de protección frente a nucleasas, tales como protección frente a RNasa y S1, o el método de la segmentación química (por ejemplo, Cotton *et al.*, PNAS. USA, 85:4397-4401 (1985)).

Así pues, la detección de una secuencia específica de DNA puede conseguirse por métodos tales como hibridación, protección frente a RNasas, segmentación química, secuenciación directa de DNA o el uso de enzimas de restricción (por ejemplo, Polimorfismos de la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP)) y transferencia Southern de DNA genómico.

Además de la electroforesis en gel, más convencional, y la secuenciación de DNA, también pueden detectarse mutaciones mediante análisis *in situ*.

La presente invención se refiere también a un ensayo de diagnóstico *in vitro* para detectar niveles alterados de la proteína del TNF-gamma en tejidos diversos, puesto que una sobre-expresión de las proteínas en comparación con la de muestras de tejidos tipo normales, puede detectar la presencia de una enfermedad o una susceptibilidad a una enfermedad, por ejemplo, tumores y malaria cerebral. Los ensayos que se utilizan para detectar los niveles de proteína del TNF-gamma de una muestra que deriva de un hospedante, son bien conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia Western, ensayos ELISA y ensayo "sandwich". Un ensayo ELISA (Coligan, *et al.*, Current Protocols in Immunology 1(2), Capítulo 6, (1991) comprende preparar inicialmente un anticuerpo específico para el antígeno del TNF-gamma, preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Además, se prepara un anticuerpo informador contra el anticuerpo monoclonal. Al anticuerpo informador se fija un reactivo detectable tal como radiactividad, fluorescencia o, en este ejemplo, una enzima de peroxidasa de rábano picante. Ahora se separa de un hospedante una muestra y se incuba sobre un soporte sólido, por ejemplo un soporte de poliestireno, que fija las proteínas de la muestra. Cualesquiera sitios libres de unión de proteína sobre el soporte son cubiertos luego por incubación con una proteína inespecífica tal como BSA. Seguidamente, el anticuerpo monoclonal se incuba en el soporte, durante cuyo tiempo los anticuerpos monoclonales fijan a cualesquiera proteínas del TNF-gamma unidas al soporte de poliestireno. La totalidad del anticuerpo monoclonal sin unir se separa por lavado con una solución tampón. El anticuerpo informador ligado a la peroxidasa de rábano picante está situado ahora en el soporte, dando por resultado la unión del anticuerpo informador a cualquier anticuerpo monoclonal unido al TNF-gamma. Luego se separa por lavado el anticuerpo informador sin unir. Después se añaden al sustrato de poliestireno sustratos de peroxidasa y la cantidad de color que se desarrolla en un período de tiempo dado es una medida de la cantidad de proteína de TNF-gamma presente en un volumen dado de muestra del paciente cuando se compara frente a una curva estándar.

Puede emplearse un ensayo de competición en el que anticuerpos específicos para el TNF-gamma se fijan a un soporte sólido y TNF-gamma marcado y se hace pasar sobre el soporte sólido una muestra obtenida del hospedante, y la cantidad de marcador detectada, por ejemplo, mediante cromatografía de centelleo de líquido, puede correlacionarse con la cantidad de TNF-gamma de la muestra.

Un ensayo "sandwich" es similar a un ensayo ELISA. En un ensayo "sandwich" se hace pasar TNF-gamma sobre un soporte sólido y se une a un anticuerpo fijado al soporte sólido. Luego se une al TNF-gamma un segundo anticuerpo. Después se hace pasar sobre el soporte sólido un tercer anticuerpo que está marcado y que es específico del segundo anticuerpo, uniéndose al segundo anticuerpo, pudiendo cuantizarse entonces una cantidad.

Las secuencias de la presente invención son valiosas también para la identificación de cromosomas. La secuencia es elegida específicamente como objetivo para una posición particular sobre un cromosoma humano individual y puede hibridarse con ella. Además, existe una necesidad actual para identificar sitios particulares sobre el cromosoma. Pocos reactivos para marcar cromosomas, basados en los datos actuales de secuencias (polimorfismos de repetición) están disponibles en la actualidad para marcar posiciones cromosómicas. El mapeo de DNAs para cromosomas según la presente invención, es una primera etapa importante para la correlación de aquellas secuencias con genes asociados con la enfermedad.

En breve, pueden mapearse secuencias para cromosomas mediante la preparación de cebadores de la PCR (preferiblemente 15-25 bp) a partir del cDNA. El análisis por medio de ordenador de la región 3' de la secuencia sin traducir, se usa para seleccionar rápidamente cebadores que no se extienden más de un exón en el DNA genómico, complicando por tanto el proceso de amplificación. Estos cebadores se usan luego para seleccionar por PCR híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Solamente aquellos híbridos que contienen el gen humano que corresponde al cebador proporcionarán un fragmento amplificado.

El mapeo por PCR de híbridos de células somáticas es un procedimiento operatorio rápido para asignar un DNA particular a un cromosoma particular. Usando la presente invención con los mismos cebadores de oligonucleótidos, puede conseguirse una sub-localización con paneles de fragmentos procedentes de cromosomas específicos o agrupaciones de clones genómicos grandes, de un modo análogo. Otras estrategias de mapeo que puede ser usadas de modo semejante para mapear su cromosoma incluyen hibridación *in situ*, clasificación preliminar con cromosomas marcados, sometidos a separador de flujo y preselección por hibridación para construir colecciones de cDNA específicas de los cromosomas.

La hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) de un clon de cDNA para una extensión cromosómica metafásica puede usarse para proporcionar una localización cromosómica precisa en una etapa. Esta técnica puede usarse con un cDNA tan corto como de 500 ó 600 bases; sin embargo, los clones de más de 2.000 bp poseen una mayor probabilidad de fijación a una posición cromosómica única con suficiente intensidad de la señal para realizar una detección sencilla. La FISH requiere el uso de los clones desde los que fue derivada la diana expresada de la secuencia (EST), y cuanto más largo mejor. Por ejemplo, 2.000 bp es bueno, 4.000 es mejor y más de 4.000 no es necesario, probablemente, para obtener buenos resultados un tanto por ciento razonable de la veces. Para realizar una revisión de esta técnica, véase Verma *et al.*, Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988).

Una vez mapeada una secuencia para una posición cromosómica precisa, la posición física de la secuencia sobre el cromosoma puede correlacionarse con datos del mapa genético. Tales datos pueden encontrarse, por ejemplo, en el trabajo de V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en línea a través de la Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación existente entre genes y enfermedades que se han mapeado para la misma región cromosómica, se identifica después por medio de análisis de segregación (coherencia de genes físicamente adyacentes).

Seguidamente, es necesario determinar las diferencias del cDNA o secuencia genómica entre individuos afectados y sin afectar. Si se observa una mutación en alguno o todos los individuos afectados pero no en ningún individuo normal, entonces es probable que la mutación sea el agente causante de la enfermedad.

Con las técnicas actuales de resolución de mapeo físico y de mapeo genético, un cDNA localizado con precisión para una región cromosómica asociada con la enfermedad, podría ser uno de entre 50 y 500 genes causativos potenciales. (Esto supone una resolución de mapeo de 1 megabase y un gen por 20 kb).

Los polipéptidos, sus fragmentos u otros derivados o sus análogos, o células que los expresan, pueden usarse como inmunógeno para producir anticuerpos. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. La presente invención incluye también anticuerpos quiméricos, monocatenarios, y humanizados, así como fragmentos Fab, o el producto de una biblioteca de expresión de Fab. Diversos procedimientos operatorios, conocidos en la técnica, pueden usarse para la producción de tales anticuerpos y fragmentos.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos que corresponden a una secuencia de la presente invención, puede ser obtenidos mediante inyección directa de los polipéptidos en un animal, o administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente uno no humano. El anticuerpo obtenido de este modo se unirá entonces a los propios polipéptidos. De este modo, puede usarse incluso una secuencia que codifique solamente un fragmento de los polipéptidos para generar anticuerpos que se unen a los polipéptidos nativos totales. Tales anticuerpos pueden ser usados luego para aislar el polipéptido desde tejidos que expresan tal polipéptido.

## ES 2 285 701 T3

Para preparar anticuerpos monoclonales, puede usarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas celulares. Ejemplos de ello incluyen la técnica del hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983), *Immunology Today* 4:72), la técnica del hibridoma de EBV, para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., páginas 77-96).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de EE.UU. 4.946.778) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios para los productos polipeptídicos inmunógenos de esta invención. Asimismo, pueden usarse ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados para los productos polipeptídicos inmunógenos de esta invención.

La presente invención será descrita, además, con referencia a los Ejemplos que siguen; sin embargo, ha de entenderse que la presente invención no se limita a tales Ejemplos. Todas las partes o todas las cantidades, a menos que se especifique de otro modo, son en peso.

Con objeto de facilitar la comprensión de los Ejemplos que siguen, se describen ciertos métodos y/o términos o expresiones que se presentan frecuentemente.

Los "plásmidos" son designados mediante la letra minúscula p precedida y/o seguida por letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida que figuran en esta memoria o bien pueden obtenerse en el comercio, están a disposición del público sin restricción alguna, o pueden ser construidos partiendo de plásmidos disponibles según procedimientos operatorios publicados. Además, plásmidos equivalentes a los descritos, son conocidos en la técnica y serán evidentes para los técnicos de habilidad ordinaria.

"Digestión" de DNA se refiere a la segmentación catalítica del DNA con una enzima de restricción que actúa solamente en ciertas secuencias del DNA. Las diversas enzimas de restricción usadas en esta invención pueden obtenerse en el comercio y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requisitos han sido usados como puede ser conocido por los técnicos de conocimientos ordinarios. Con fines analíticos, se usa, típicamente, 1  $\mu$ g de plásmido o de fragmento de DNA con aproximadamente 2 unidades de enzima en aproximadamente 20  $\mu$ l de solución tampón. Con la finalidad de aislar fragmentos de DNA para construir plásmidos, se someten a digestión, típicamente, 5 a 50  $\mu$ g de DNA con 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor. Las cantidades apropiadas de soluciones tampón y de sustratos para enzimas de restricción particulares están especificadas por el fabricante. Habitualmente se emplean tiempos de incubación de aproximadamente 1 hora a 37°C, pero las condiciones pueden variar según las indicaciones del proveedor. Después de la digestión, la mezcla de reacción se somete a electroforesis directamente sobre un gel de poliacrilamida para aislar el fragmento deseado.

La separación por tamaños de los fragmentos segmentados se lleva a cabo empleando el gel de poliacrilamida al 8 por ciento, descrito por Goeddel, D., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980).

"Oligonucleótidos" se refiere o bien a un polioxinucleótido monocatenario o a dos cadenas de polioxinucleótido complementarias que pueden sintetizarse químicamente. Tales oligonucleótidos sintéticos no tienen fosfato en el extremo 5' y por tanto no pueden ligarse a otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético puede ligarse a un fragmento que no haya sido desfosforilado.

"Ligación" se refiere al proceso de formación de enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácidos nucleicos bicatenarios (Maniatis, T., *et al.*, *Id.*, p. 146). A menos que se indique de otro modo, la ligación puede conseguirse usando soluciones tampón y condiciones conocidas, con 10 unidades de DNA ligasa T4 ("ligasa") por 0,5  $\mu$ g de cantidades aproximadamente equimolares de los fragmentos de DNA que han de ser ligados.

A menos que se exponga de otro modo, la transformación fue realizada según se describe en el método de Graham, F. y Van der Eb, A., *Virology*, 52:456-457 (1973).

### Ejemplo 1

#### Expresión bacteriana y purificación del TNF-gamma

La secuencia de DNA que codifica el TNF-gamma, ATCC N° 75927, es amplificada inicialmente usando cebadores de oligonucleótidos de la PCR, correspondientes a las secuencias de 5' de la proteína del TNF-gamma y las secuencias de 3' del vector para el gen del TNF-gamma. Se añadieron nucleótidos adicionales correspondientes al TNF-gamma, para las secuencias de 5' y 3', respectivamente. El cebador del oligonucleótido de 5' tiene la secuencia 5' GCGCG GATCCACCATGAGACGCTTTTAAAGCAAAGTC 3', contiene un sitio de la enzima de restricción Bam HI seguido por los primeros 24 nucleótidos de la secuencia codificadora del TNF-gamma partiendo del aminoácido terminal presumido del codón de proteína procesada. La secuencia de 3' 5' CGCGTCTAGACTATAGTAAGAAGGCTCCAAA GAAGG 3' contiene secuencias complementarias para un sitio Xba I y va seguida por 22 nucleótidos del TNF-gamma y para una secuencia del vector pQE-9 situada en 3' respecto a la inserción de DNA del TNF-gamma. Los sitios de enzimas de restricción corresponden a los sitios de enzimas de restricción sobre el vector de expresión bacteriana pQE-9 (Qiagen). El pQE-9 fue sometido a digestión luego con Bam HI y Xba I. Las secuencias amplificadas fueron ligadas en el pQE-9 e insertadas en el marco de lectura con la secuencia que codifica la marca de histidina y el RBS. La mezcla

## ES 2 285 701 T3

de ligación se usó luego para transformar una cepa de *E. coli* disponible de Qiagen, bajo la marca comercial M15/rep 4, mediante el procedimiento operatorio descrito por Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning; A Laboratory Manual. Cold Spring Laboratory Press, (1989). La cepa M15/rep 4 contiene copias múltiples del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y que también confiere resistencia a la kanamicina (Kan<sup>r</sup>). Se identifican transformantes por su aptitud para crecer en placas LB y se seleccionaron colonias resistentes a la ampicilina/kanamicina. Se aisló DNA plasmídico y se confirmó mediante análisis de restricción. Los clones que contenían las construcciones deseadas fueron cultivados durante la noche (O/N) en cultivo líquido en medio LB suplementado con Amp (100 ug/ml) y Kan (25 ug/ml). El cultivo de O/N se usó para inocular un cultivo mayor en una proporción de 1:100 a 1:250. Las células fueron cultivadas hasta obtener una densidad óptica 600 (O.D.<sup>600</sup>) de entre 0,4 y 0,6. Después se añadió IPTG (“Isopropil-B-D-tiogalacto piranosido”) hasta una concentración final de 1 mM. El compuesto IPTG induce, por inactivación, el represor lacI, clarificando el P/O que conduce a una expresión génica aumentada. Las células fueron cultivadas un período extra de 3 a 4 horas. Las células fueron recolectadas luego por centrifugación. El aglomerado de células se solubilizó en el seno del agente caotrópico hidrócloruro de guanidina 6 Molar. Después de clarificación, se purificó el TNF-gamma partiendo de esta solución mediante cromatografía en una columna de quelato de níquel en condiciones que permitan una fuerte unión por proteínas que contienen la marca 6-His (Hochuli, E. *et al.*, J. Chromatography 411:177-184 (1984)). El TNF-gamma se purificó mediante una segunda operación en la columna de quelato de níquel. El TNF-gamma (90% de pureza) eluyó desde la columna en guanidina.HCl 6 molar, pH 5,0, y con fines de renaturalización fue dializado en solución tampón de PBS. El producto de expresión fue sometido a electroforesis mediante SDS-PAGE y los resultados pueden apreciarse en la Figura 4, en la que M representa los marcadores de pesos moleculares; la calle 1 es lisado celular inducido; la calle 2 es lisado celular sin inducir; la calle 3 es la proteína del TNF-gamma después de dos purificaciones en la columna de quelato de níquel; la calle 4 es la proteína del TNF-gamma después de 1 purificación en la columna.

### Ejemplo 2

#### *Clonación y expresión de TNF-gamma usando el sistema de expresión de baculovirus*

La secuencia de DNA que codifica la proteína del TNF-gamma, de longitud total, ATCC N° 75927, fue amplificada usando cebadores de oligonucleótidos de la PCR correspondientes a las secuencias de los extremos 5' y 3' del gen.

El cebador de 5' tiene la secuencia 5' **GCGCGGATCCACCATGAGACGCTTTTTAAGCAAAGTC** 3', y contiene un sitio de la enzima de restricción Bam HI (en negrita) seguido de 24 nucleótidos del gen del TNF-gamma (el codón de iniciación de la traducción “ATG”) está subrayado).

El cebador de 3' tiene la secuencia 5' CGCGTCTAGACTATAGTAAGAAGGCTCCAAAGAAGG 3' y contiene el sitio de segmentación para la endonucleasa de restricción XbaI y 22 nucleótidos complementarios de la secuencia de 3' sin traducir del gen del TNF-gamma. Las secuencias amplificadas fueron aisladas desde un gel de agarosa al 1% usando un kit de que se dispone en el comercio (“GeneClean,” BIO 101 Inc., La Jolla, CA). El fragmento se sometió a digestión después con las endonucleasas BamHI y XbaI, y luego se purificó otra vez sobre un gel de agarosa al 1%. Este fragmento fue denominado F2.

El vector pA2 (modificación del vector pVL941, que se discute más adelante) se usa para la expresión de la proteína del TNF-gamma usando el sistema de expresión de baculovirus (para realizar una revisión véase la publicación de Summers, M.D. y Smith, G.E., 1987, “A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell cultures procedures”, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555). Este vector de expresión contiene el promotor potente de polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear californica Autographa (AcMNPV) seguido de los sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción BamHI y XbaI. Se usa el sitio de poliadenilación del virus 40 de simios (SV40) para obtener una poliadenilación eficaz. Para realizar una selección fácil de virus recombinantes, el gen de beta-galactosidasa procedente de *E. coli* es insertado en la misma orientación que el promotor de polihedrina seguido por la señal de poliadenilación del gen de polihedrina. Las secuencias de polihedrina están flanqueadas en ambos lados por secuencias virales para la recombinación homóloga mediada por células, del DNA viral de tipo salvaje transfectado conjuntamente. Muchos otros vectores de baculovirus podrían usarse en lugar del pA2, tales como el pRG1, el pAc373, el pVL941 y el pAcIM1 (Luckow, V.A. y Summers, M.D. Virology, 170:31-39).

El plásmido se sometió a digestión con las enzimas de restricción BamHI y XbaI y luego se desfosforiló usando fosfatasa intestinal de ternera, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Después se aisló el DNA desde un gel de agarosa al 1% usando un kit de que se dispone en el comercio (“GeneClean” BIO 101 Inc. LaJolla, Ca.). Este DNA vector es denominado V2.

El fragmento F2 y el plásmido V2 desfosforilado fueron ligados con DNA ligasa T4. Células azules XL1 de *E. coli* fueron transformadas luego. La secuencia del fragmento clonado fue confirmada mediante secuenciación del DNA.

5 µg del plásmido pBAC TNF-gamma fueron transfectados conjuntamente con 1,0 µg de un baculovirus linearizado, disponible en el comercio, (“DNA de baculovirus BaculoGold™”, Pharmingen, San Diego, CA) usando el método de la lipofección (Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417 (1987)).

1 µg de DNA de virus BaculoGold™ y 5 µg del plásmido pBAC TNF-gamma fueron mezclados en un pocillo estéril de una placa de microtitulación que contenía 50 µl de medio de Grace (Life Technologies Inc., Gaithersburg,

## ES 2 285 701 T3

MD) desprovisto de suero. Después se añadieron 10  $\mu$ l de lipofectina más 90  $\mu$ l de medio de Grace, se mezcló y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego la mezcla de transfección se añadió gota a gota a las células de insecto Sf9 (ATCC CRL 1711) y sembradas en una placa de cultivo de tejidos, de 35 mm, con 1 ml de medio de Grace, sin suero. La placa se hizo oscilar adelante y atrás para mezclar la solución añadida de nuevo. La placa se incubó luego durante 5 horas a 27°C. Al cabo de 5 horas la solución de transfección se separó de la placa y se añadió 1 ml de medio de insectos de Grace suplementado con suero fetal de ternera al 1%. La placa se puso de nuevo en un incubador y se continuó el cultivo a 27°C durante cuatro días.

Después de cuatro días se recogió el sobrenadante y se llevó a cabo un ensayo en placa semejante al descrito por Summers y Smith (referencia anterior). Como modificación se usó un gel de agarosa con "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg), que permite un aislamiento fácil de las placas teñidas de azul. (Una descripción detallada de un "ensayo de placas" puede encontrarse también en la guía del usuario para cultivos de células de insectos y baculovirología, distribuida por Life Technologies Inc., Gaithersburg, página 9-10).

Cuatro días después de la dilución seriada, se añadió el virus a las células, las placas teñidas de azul fueron elegidas con la punta de una pipeta Eppendorf. El agar que contenía los virus recombinantes fue resuspendido luego en un tubo Eppendorf que contenía 200  $\mu$ l de medio de Grace. El agar se separó mediante una centrifugación breve y se usó el sobrenadante, que contenía el baculovirus recombinante, para infectar células Sf9 sembradas en placas de 35 mm. Cuatro días más tarde los sobrenadantes de estas placas de cultivo fueron recolectados y mantenidos luego a 4°C.

Las células Sf9 fueron cultivadas en medio de Grace suplementado con FBS al 10%, inactivado por calor. Las células fueron infectadas con el baculovirus V recombinante-TNF-gamma a una multiplicidad de infección (MOI) de 2. Seis horas más tarde se separó el medio y se reemplazó con medio SF900 II menos metionina y cisteína (Life Technologies Inc., Gaithersburg). 42 horas después se añadieron 5  $\mu$ Ci de <sup>35</sup>S-metionina y 5  $\mu$ Ci de <sup>35</sup>S-cisteína (Amersham). Las células fueron incubadas posteriormente durante 16 horas antes de recolectarlas por centrifugación y las proteínas marcadas fueron visualizadas mediante SDS-PAGE y autorradiografía. La Figura 5 ilustra el gel en el que las Calles 1 y 3 son el medio del TNF-gamma y el testigo; y las calles 2 y 4 son el lisado celular del TNF-gamma y el testigo.

### Ejemplo 3

#### *Expresión de TNF-gamma recombinante en células COS*

La expresión de plásmido, TNF-gamma HA se deriva desde un vector pcDNAI/Amp (Invitrogen) que contiene: 1) origen de replicación de SV40, 2) gen de resistencia a la ampicilina, 3) origen de replicación de *E. coli*, 4) promotor de CMV seguido de una región de poliengarce, un intrón de SV40 y sitio de poliadenilación. Un fragmento de DNA que codifica el precursor de TNF-gamma entero y una marca HA fusionada en el marco de lectura para su extremo 3', fue clonado en la región de poliengarce del vector; por tanto, la expresión de la proteína recombinante está dirigida bajo el promotor de CMV. La marca HA corresponde a un epítipo que deriva de la proteína de la hemaglutinina de la influenza, como ha sido descrito anteriormente (I. Wilson, H. Niman, R. Heighten, A. Cherenon, M. Connolly y R. lerner, 1984, Cell 37, 767). La infusión de la marca HA a la proteína diana permite una detección fácil de la proteína recombinante con un anticuerpo que reconoce el epítipo HA.

La estrategia de construcción del plásmido se describe a continuación:

La secuencia de DNA que codifica el TNF-gamma, ATCC N° 75927, fue construida por PCR sobre el EST original clonado, usando dos cebadores: el cebador de 5' (el mismo que para el ejemplo del bacula) contiene un sitio BamHI seguido por 24 nucleótidos de secuencia codificadora del TNF-gamma partiendo desde el codón de iniciación; la secuencia de 3' 5' CGCTCTAGATCAAGCGTAGTCTGGGACGTCGTATGGATAGTAAGAAGGCTCCAAAG 3' contiene secuencias complementarias al sitio XbaI, codón de detención de la traducción, marca HA y los últimos 18 nucleótidos de la secuencia codificadora del TNF-gamma (sin incluir el codón de detención). Por consiguiente, el producto de la PCR contiene un sitio BamHI, secuencia codificadora del TNF-gamma seguida de la marca HA fusionada en el marco, un codón de detención de la terminación de la traducción a continuación de la marca HA, y un sitio XbaI. El fragmento de DNA amplificado por PCR y el vector, pcDNAI/Amp, fueron sometidos a digestión con las enzimas de restricción BamHI y XbaI y ligados. La mezcla de ligación fue transformada en la cepa de *E. coli* SURE (disponible de Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037), el cultivo transformado se extendió en placa sobre placas con medios de ampicilina y se seleccionaron las colonias resistentes. Se aisló el DNA plasmídico desde los transformantes y se examinaron mediante análisis de restricción para determinar la presencia del correcto fragmento. Para la expresión del TNF-gamma recombinante, se transfectaron células COS con el vector de expresión mediante el método de DEAE-DEXTRANO (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989). La expresión de la proteína HA del TNF-gamma fue detectada el método de radiomarcado e inmunoprecipitación. (E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). Se marcaron las células durante 8 horas con <sup>35</sup>S-cisteína dos días después de la transfección. Después se recogieron los medios de cultivo y las células fueron lisadas con detergente (tampón RIPA (NaCl 150 mM, NP-40 al 1%, SDS al 0,1%, NP-40 al 1%, DOC al 0,5%, Tris 50 mM, pH 7,5). (Wilson, I. *et al.*, Id. 37:767 (1984)). El lisado celular y los medios de cultivo fueron precipitados con un anticuerpo monoclonal específico de HA. Las proteínas precipitadas fueron analizadas sobre geles de PAGE-SDS al 15%.

## ES 2 285 701 T3

### Ejemplo 4

#### *Tipo de expresión del TNF-gamma en tejido humano*

5 Se llevó a cabo análisis de transferencia de RNA para examinar los niveles de expresión del TNF-gamma en tejidos humanos. Muestras de RNA celular total fueron aisladas con el sistema RNazol™ B (Biotecx Laboratories, Inc. 6023 South Loop East, Houston, TX 77033). Aproximadamente 2 µg (para la transferencia de RNA de la Figura 3A) de RNA total aislado desde cada tejido humano especificado, fueron separados sobre gel al 1% de agarosa-formaldehído y transferidos sobre un filtro de nilón. (Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press, 10 (1989)). La reacción de marcado se llevó a cabo conforme al kit Prime-It de Stratagene con 50 ng de cDNA de TNF-gamma, para producir cDNA de TNF-gamma marcado con <sup>32</sup>P. El DNA marcado fue purificado con una columna Select-G-50 (5 Prima - 3 Prima, Inc. 5603 Arapahoe Road, Boulder, CO 80303). El filtro fue hibridado luego con gen de TNF-gamma, de longitud total, marcado radiactivo a 1.000.000. cpm/ml, en NaPO<sub>4</sub> 0,5 M, pH 7,4 y SDS al 7%, durante la noche, a 65°C. Después de lavar dos veces a temperatura ambiente y dos veces a 60°C con 0,5 x SSC, SDS 15 al 0,1%, el filtro se expuso a -70°C durante la noche, con una pantalla de intensificación. El RNA mensajero para el TNF-gamma es abundante en el riñón (Figuras 3A).

La misma reacción se llevó a cabo obteniendo los resultados indicados en la Figura 3B, siendo el único cambio que se usaron 10 µg de RNA de poli A a partir de los tejidos indicados. El RNA mensajero para el TNF-gamma es expresado predominantemente en células HUVEC (Figura 3B).

### Ejemplo 5

25 *Aptitud del TNF-gamma recombinante para inhibir el crecimientos de las células WEHI 164 y L929, inducir la adhesión celular en células HL-60 y favorecer el crecimiento de células endoteliales*

Las células diana adherentes fueron preparadas partiendo de cultivos confluentes por tripsinización en PBS, y las células diana no adherentes fueron recolectadas desde cultivos estacionarios y lavadas con medio una vez. Las células diana fueron suspendidas en la proporción de 3 x 10<sup>5</sup> células/ml, en medio que contenía FCS al 10%. Alícuotas de 0,1 30 ml fueron distribuidas en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos que contenían 0,1 ml de las muestras de ensayo de las células, diluidas en seriadamente (WEHI 164 y L929). La incubación se continuó durante 70 horas. Se añadieron TNF-α, TNF-β y TNF-gamma en una concentración de 0,5 µg/ml. La citotoxicidad y la actividad de proliferación fueron cuantificadas usando un ensayo MTS, llevado a cabo mediante la adición a cada pocillo de 20 µl de MTS y solución de metosulfato de fenazina (PMS). Al cabo de un período de incubación de tres horas, se midió la 35 densidad óptica (OD) en 492 nm mediante un lector de placas ELISA. La densidad óptica en 492 nm es proporcional al número de células viables en los pocillos. El tanto por ciento de citotoxicidad se calculó del modo siguiente: % de citotoxicidad = (100 - OD<sub>experimental</sub> - OD<sub>testigo</sub>) x 100. Las fotografías fueron tomadas al cabo de 72 horas. Como muestra la Figura 6A y 8, el TNF-gamma indujo un cambio de morfología que apareció como células redondeadas oscuras que estaban muertas.

40 En la gráfica de la Figura 6B, el ensayo se llevó a cabo como se ha descrito antes, sin embargo, se añadieron cantidades crecientes de TNF. Los resultados indican que el TNF-gamma es un inhibidor de las células WEHI 164.

45 Para ensayar la aptitud de adhesión del TNF-gamma, se usaron células HL-60 y la adhesión celular y el contacto de célula-célula fueron medidos por observación al microscopio y calificados subjetivamente por dos investigadores independientes. La Figura 10 ilustra la aptitud del TNF-gamma para inducir la adhesión celular.

50 En el ensayo efectuado para determinar la aptitud del TNF-gamma para potenciar el crecimiento de células endoteliales, el índice de proliferación (PI) se calculó del modo siguiente: PI = OD<sub>experimental</sub> - OD<sub>testigo</sub>. La Figura 8 ilustra que el TNF-gamma es un promotor del crecimiento de células endoteliales.

### Ejemplo 6

#### *Medida de la capacidad de apoptosis del TNF-gamma*

55 En una primera etapa de incubación, anticuerpo anti-histona se fija por adsorción sobre la pared de un módulo de una placa de microtitulación. Seguidamente, los sitios de unión inespecífica sobre la pared son saturados mediante tratamiento con tampón de incubación (por ejemplo, solución bloqueante). Durante la segunda etapa de incubación, los nucleosomas contenidos en la muestra de células WEHI 164 tratados con TNF-α, TNF-β o TNF-gamma, se unen por medio de sus componentes de histona al anticuerpo anti-histona inmovilizado. En la tercera etapa de incubación, peroxidasa anti-DNA (POD) reacciona con la parte de DNA del nucleosoma. Después de separar mediante una etapa de lavado todo el conjugado de peroxidasa sin unir, se determina fotométricamente con ABTS (2,2'-azino-di-[sulfonato de 3-etilbenzotiazolina], como sustrato, la cantidad de peroxidasa retenida en el inmunocomplejo. El anticuerpo anti-histona reacciona con las histonas H1, H2A, H2B, H3 y H4 procedente de la muestra. El anticuerpo anti-DNA POD 65 se une a DNA monocatenario y bicatenario. Por tanto, el ensayo ELISA permite la detección de mono- y oligonucleosomas y puede ser aplicado a la medida de la muerte celular apoptótica. El nivel de muerte celular se mide mediante la cantidad de fragmentos de DNA asociados a la histona citoplásmica, lo que está indicado como la absorbancia A405 nm/A490 (Véase Catálogo de Boehringer Mannheim, 0990 C 93 2 1541170) (véase la Figura 7).

## ES 2 285 701 T3

### Ejemplo 7

#### *Ensayo de unión al receptor usando TNF-gamma*

5 TNF- $\alpha$  y TNF-gamma fueron purificados por cromatografía de afinidad de Ni-NTA usando la marca 6-His y se  
añadió 1  $\mu\text{g}$ /pocillo a una placa de 96 pocillos (Xenopore Corp.) revestidos con quelato de níquel, incubándose durante  
2 horas. Después de lavar tres veces se añadió a cada pocillo 100 ng de receptores de TNF solubles, humanos, sTNF  
RI ó sTNF RII, y se incubó durante 2 horas. La placa se lavó tres veces y se añadió anticuerpo policlonal marcado con  
10 fosfatasa alcalina, para sTNF RI ó sTNF RII (200  $\mu\text{l}$ ). Se añadió a cada pocillo solución de sustrato, 200  $\mu\text{l}$ , y la placa  
se incubó durante 2 horas. Se midió la OD usando un lector de ELISA (longitud de onda de ensayo 450 nm, longitud  
de onda de corrección 590 nm). Los resultados que se indican en la Figura 11 ilustran que el TNF-gamma no se une  
significativamente a los receptores sTNF.

15 Numerosas modificaciones y variaciones de la presente invención son posibles a la luz de las enseñanzas anteriores  
y, por tanto, dentro del alcance de las reivindicaciones que se acompañan, la invención puede ser puesta en práctica de  
otro modo que el descrito particularmente

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido seleccionado entre el grupo que consiste en
  - (a) polinucleótidos que codifican al menos la forma madura del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida indicada en SEQ ID NO: 2;
  - (b) polinucleótidos que tienen la secuencia codificadora indicada en SEQ ID NO: 2 que codifica al menos la forma madura del polipéptido;
  - (c) polinucleótidos que codifican el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos la forma madura del polipéptido codificado por el cDNA contenido en ATCC 75927;
  - (d) polinucleótidos que tienen la secuencia codificadora del cDNA contenido en ATCC 75927 que codifican al menos la forma madura del polipéptido; y
  - (e) polinucleótidos que son al menos 95% idénticos con el polinucleótido de cualquiera de (a) a (d), que codifican un polipéptido que estimula la liberación de citoquina proinflamatoria desde células T.
2. El polinucleótido según la reivindicación 1, que es DNA.
3. El DNA según la reivindicación 2, que es DNA genómico.
4. El polinucleótido según la reivindicación 1, que es RNA.
5. Un vector que contiene el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. El vector según la reivindicación 5, en el que polinucleótido está ligado operablemente a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células huésped procarióticas o eucarióticas.
7. Una célula huésped modificada por ingeniería genética con el vector según la reivindicación 5 ó 6.
8. Un procedimiento de producción de un polipéptido que posee actividad de TNF-gamma, que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 7 y recuperar desde el cultivo el polipéptido codificado por dicho polinucleótido.
9. Un procedimiento de producción de células capaces de expresar un polipéptido que posee actividad de TNF-gamma, que comprende modificar células por ingeniería genética con el vector según la reivindicaciones 5 ó 6.
10. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u obtenible mediante el procedimiento según la reivindicación 8.
11. Un anticuerpo contra el polipéptido según la reivindicación 10.
12. Un antagonista/inhibidor contra el polipéptido según la reivindicación 10, que es un anticuerpo según la reivindicación 11, o una construcción antisentido que es capaz de hibridarse con un transcrito del polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
13. Una molécula de ácido nucleico que se hibrida específicamente con un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
14. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el polipéptido según la reivindicación 10, y, opcionalmente, un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
15. Una composición de diagnóstico que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 13 o el anticuerpo según la reivindicación 11.
16. El uso del polipéptido según la reivindicación 10 o del polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para preparar una composición farmacéutica para curar heridas, para inhibir la proliferación de tumores o las neoplasias, para el tratamientos de las restenosis o para la prevención de enfermedades autoinmunitarias.
17. El uso del antagonista según la reivindicación 12, para preparar una composición farmacéutica para el tratamiento de la caquexia, la malaria cerebral, la artritis reumatoide, la osteoporosis, el choque endotóxico (séptico), para la prevención del rechazo de los injertos, o útil como agente antiinflamatorio.

## ES 2 285 701 T3

18. Un método para identificar agonistas y antagonistas del polipéptido según la reivindicación 10, que comprende:

- (a) combinar selectivamente células endoteliales, Concanavalina A, el compuesto a seleccionar y [3H] timidina, en presencia o ausencia del polipéptido según la reivindicación 10;
- (b) medir la incorporación de [3H]timidina por las células endoteliales; y
- (c) determinar si el compuesto ha potenciado o bloqueado la incorporación de [3H] timidina.

5

19. Un método *in vitro* para diagnosticar un tumor o una susceptibilidad a un tumor, que comprende detectar una forma mutada de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido según la reivindicación 10.

10

20. El anticuerpo según la reivindicación 11, que es un anticuerpo policlonal.

21. El anticuerpo según la reivindicación 11, que está seleccionado entre el grupo que consiste en:

15

- (a) un anticuerpo monoclonal;
- (b) un anticuerpo quimérico;
- (c) un anticuerpo monocatenario; y
- (d) un fragmento Fab.

20

22. Una célula que produce el anticuerpo según la reivindicación 11.

25

23. Un hibridoma que produce el anticuerpo según la reivindicación 11.

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 285 701 T3

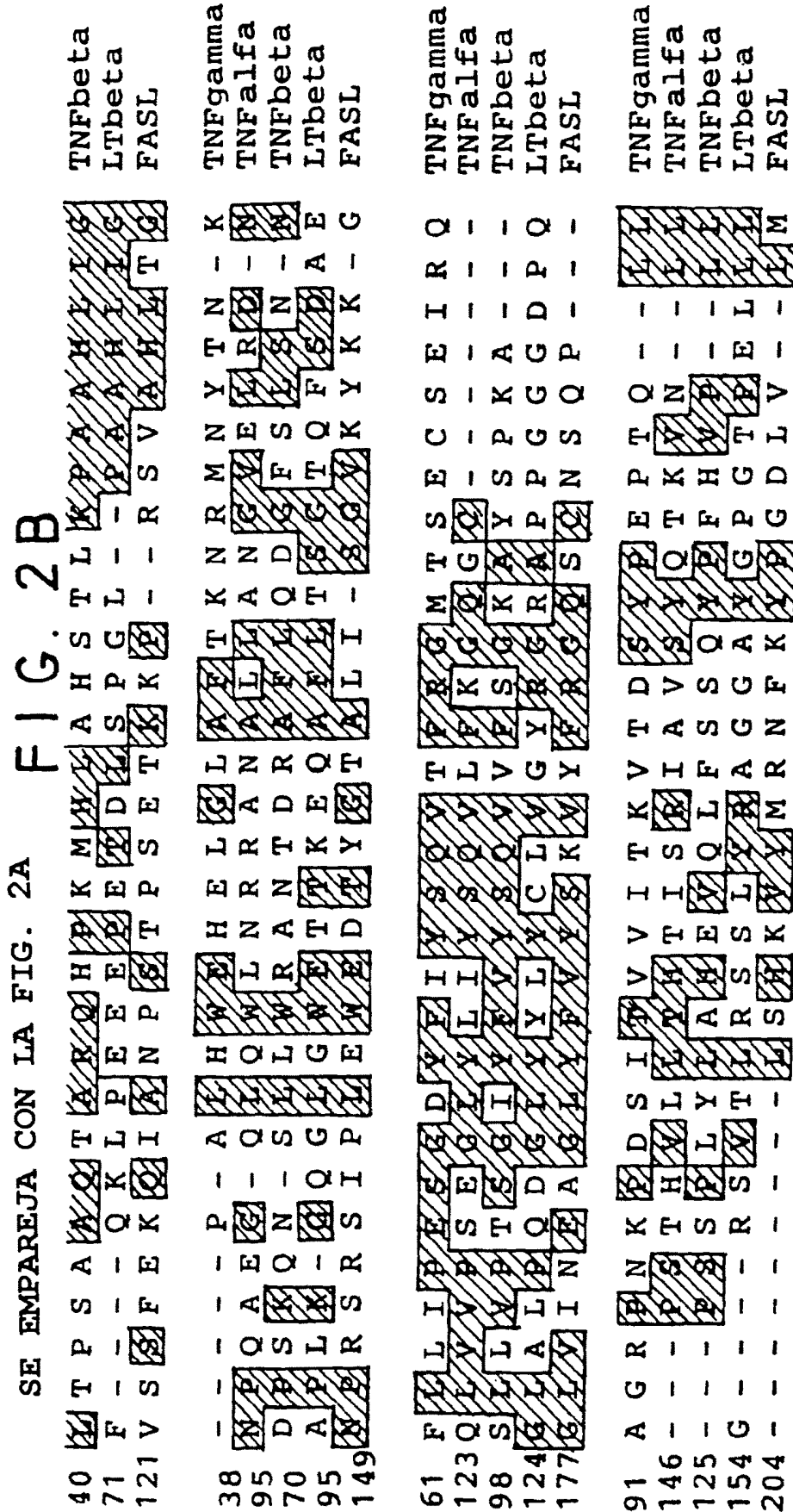
1           CCCAATCAAGAGAAAATTCCATACTATCACCAAGTTGGGUGACTTTTCCAAGTCTAGTGUAGA  
 41           AATCCAAGGCACCTCACACCTAGAGTTCCCTATACCTCTGAGACTCCAGAGGAAAGAACAA  
 121          GACAGTGCAGAAGGATATGTTAGAACCCACTGAAAACCTAGAACGTTGAAAAGGAAGCAT  
 181          ACCTCTCTGACCTATAAGAAAATTTGAGTCTGCAAGGUGATATCCTTGTGGCCCAAGAC  
 241          ATTGGTGTATCATTGTGACTAAGAGGAAATTTGTTGGTGAGCTCTGAGTGAGGATTAG  
 301          GACCAGGGAGATGCCAAGTTTCTATCACTTACCTCATGCCGTGAAGACAAGTGTGTTGTT  
 361          CCAATTGATGAATGGGGAGAAAACACTTCAGCCAATCACTTATGGGACAGAAATGGAATT  
 421          TGAAGGCTCTGGTGCCTGCCCTTCTCATACGTAAACAAGAGAGGCATCGATGAGTTTTAT  
 481          CTGAGTCATTTGGGAAAGGATAATTCTTGCACCAAGCCATTTTCTAAACACAGAAGAAT  
 541          AGGGGATTCCTTAACCTTCACTTGTTCCTCCAGGATCATAGGCTCAGGATAAAATTAAGAA  
 601          TTTTAGGTCAGACCACTCAGTCTCAGAAAAGGCAAGTAAATTTGCCCCAGGTCACAGTC  
 661          CAAGATGTTATTCTCTTTGAACAAATGCTATGTCCAGTCACATATTCTTCATTCATTCC  
 721          TCCCCAAAGCAGTTTTTAGCTGTTAGGTATATTGGATCACTTTAGTCTATTTTGAAGATG  
 781          ATATGAGACGCTTTTTAAGCAAAGTCTACAGTTTCCCAATGAGAAAATTAATCCTCTTTC  
 1           M R R F L S K V V S F P M R Y L I I L F L  
  
 841          TTGTCTTTCCAGTTGTGAGACAACTCCCACACAGCACTTTAAAAATCAGTTCCCAGCTC  
 21          V F P V R Q T P T Q H F K N Q F P A L  
  
 901          TGCCTGGGAACATGAACTAGGCCTCGCCTTCACCAAGAACC GAATGAACTATACCAACA  
 41          H W E H E L G L A F T K N R M N Y T N K  
  
 961          AATTCCTGCTGATCCCAGAGTGGGAGACTACTTCAATTTACTCCCAGGTCACATTCGGTG  
 61          F L L I P E S G D Y F I Y S Q V T F R G  
  
 1021       GGATGACCTCTGAGTGCAGTGAATCAGACAAGCAGGCGGACCAACAAGCCAGACTCCA  
 81          M T S E C S E I R Q A G R P N K P D S I  
  
 1081       TCACTGTGGTCATCACCAAGGTAACAGACAGCTACCCTGAGCCAACCAGCTCCTCATGG  
 101       T V V I T K V T D S Y P E P T Q L L M G  
  
 1141       GGACCAAGTCTGTATGCCAAGTAGCTAGCAACTGCTTCCAGCCCATCTACCTCGGAGCCA  
 121       T K S V C E V G S N W F Q P I Y L G A M  
  
 1201       TGTTCTCCTTGCAAGAAGGGGACAAGCTAATGGTGAACGTCAGTGACATCTCTTTGGTGG  
 141       F S L Q E C D K L M V N V S D I S L V D  
  
 1261       ATTACACAAAAGAAGATAAAACCTTCTTTGGAGCCTTCTTACTATAGGAGGAGAGCAAAAT  
 161       Y T K E D K T F F G A F L L  
  
 1321       ATCATTATATGAAAGTCCCTCTGCCACCGAGTTCCTAATTTTCTTTGTTCAAATGTAATTA  
 1381       TAACCAGGGGTTTTCTTGGGGCCGGGAGTAGGGGCATTCCACAGGGACAACGGTTTTAGC  
 1441       TATGAAATTTGGGGCCAAAATTTACACTTCAATGTCCTTACTGATGAGAGTACTAAGT  
 1501       GAAAAGGGCTGAAGAGAGCAAAATATATTATTAAGATGGGTTGGAGGATTTGGCGAGTTTCT  
 1561       AAATATTAAGACACTGATCACTAAATGAATGGATGATCTACTCGGGTCAGGATTGAAAGA  
 1621       GAAATATTTCAACACCTCCCTGCTATACAATGGCTACCAGTGGTCCAGTTATTGTTCAAT  
 1681       TTGATCATAAAATTTGCTTCAATTCAGGAGCTTTGAAGGAAGTCCAAGGAAAGCTCTAGAA  
 1741       AACAGTATAAACTTTTCAGAGGCAAAATCCTTCACCAATTTTCCACATACTTTTCATGCCT  
 1801       TGCCTAAAAAAAATGAAAAGAGAGTTGGTATGCTCTCATGAATGTTACACAGAAGGAGTT  
 1861       GGTTTTTCATGTCATCTACAGCATATGAGAAAAGCTACCTTTCTTTTGATTATGTACACAG

FIGURA 1

1921 ATATCTAAATAAGGAAGTTTGAATTTACATGTATAATCCAAATACAAAGTTTCTTTTA  
1981 TTCAGTAGAGTTTCTTGGCCACCTATTTTGTGCTGGTTCTACCTTAACCCAGAAGACA  
2041 CTATGAAAAACAAAGACAGACTCCACTCAAAATTTATATGAACACCCTAGATACTTCTTG  
2101 ATCAAACATCAGTCAACATACTCTAAAGAATAACTCCAAGTCTTGGCCAGGCGGAGTGGC  
2161 TCACACCTGTAATCCCAACACTTTGGGAGGCCAAGGTGGGTGGATCATCTAAGGCCGGGA  
2221 GTTCAAGACCAGCCTGACCAACGTTGGAGAAACCCCATCTTACTNAAAATACNAATTAG  
2281 CCGGGCGTGTAGCCCATGGCTGTAANCCTGCTACTCAGGAGGCCGAGCCAGAAATTT  
2341 NCTTGAACTGGGAGGCAGAGGTTGGGGTGAAGCCAGANCGCCCATTTCCACTCCAGCCT  
2401 GGGTAACAAGAGCAAACTCTGTCCAAAAA

**FIGURA 1 (continuación)**





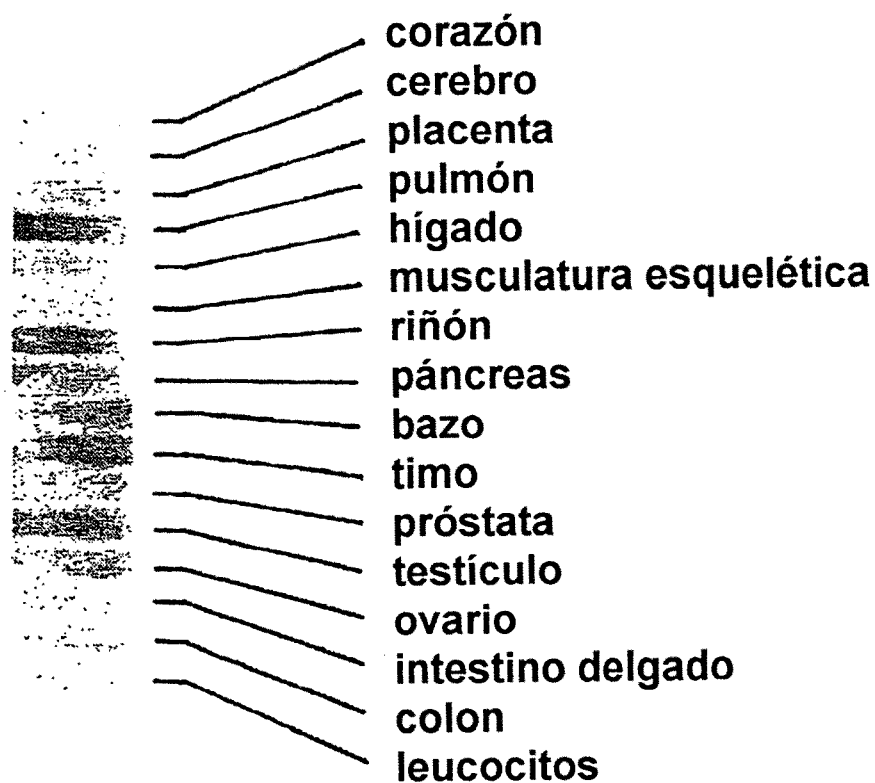
SE EMPAREJA CON LA FIG. 2A

SE EMPAREJA CON LA FIG. 2C



# FIG. 3A

Distribución en tejidos de mRNA del TNFgamma



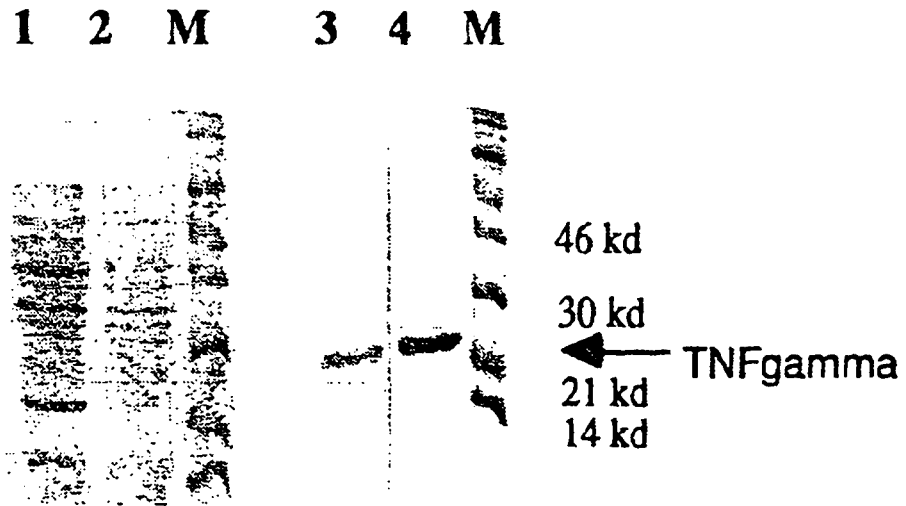
# FIG. 3B

Expresión del TNF gamma en HUVEC

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

FIG. 4

Expresión de TNF $\gamma$  en *E. coli*



# FIG. 5

Expresión de TNF $\gamma$  en sistema de baculovirus

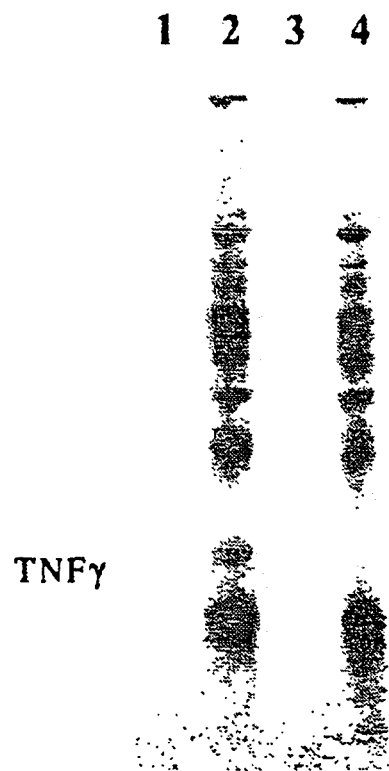


FIG. 6Aa  
Testigo



WEHI164

FIG. 6Ab  
TNF $\alpha$



FIG. 6Ac  
TNF $\gamma$

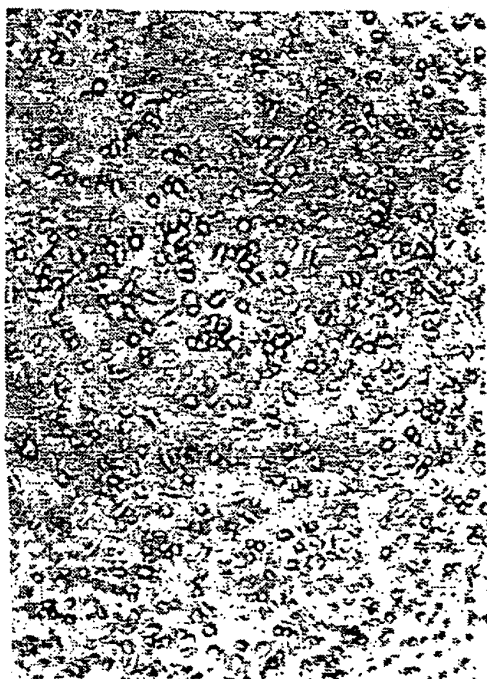


FIG. 6Ad  
TNF $\beta$



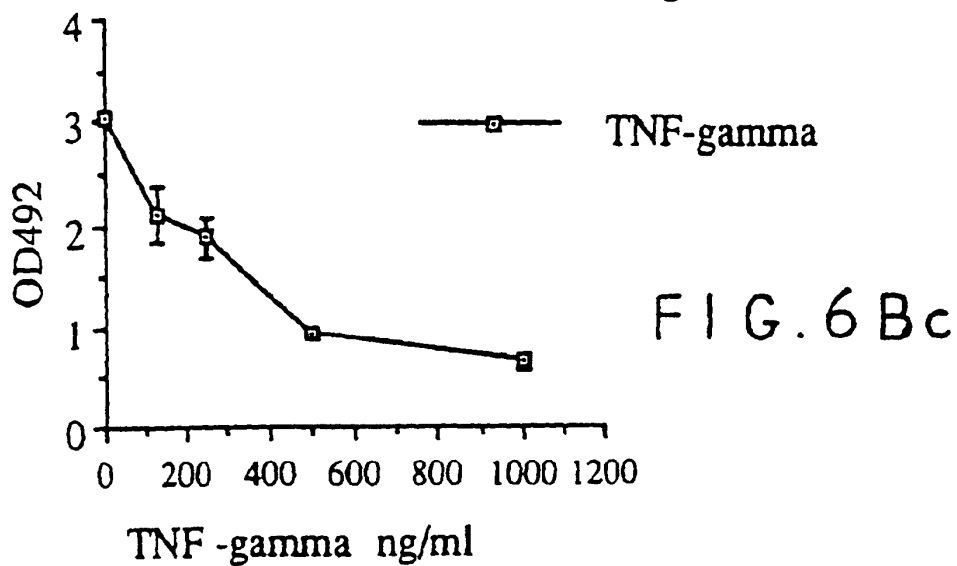
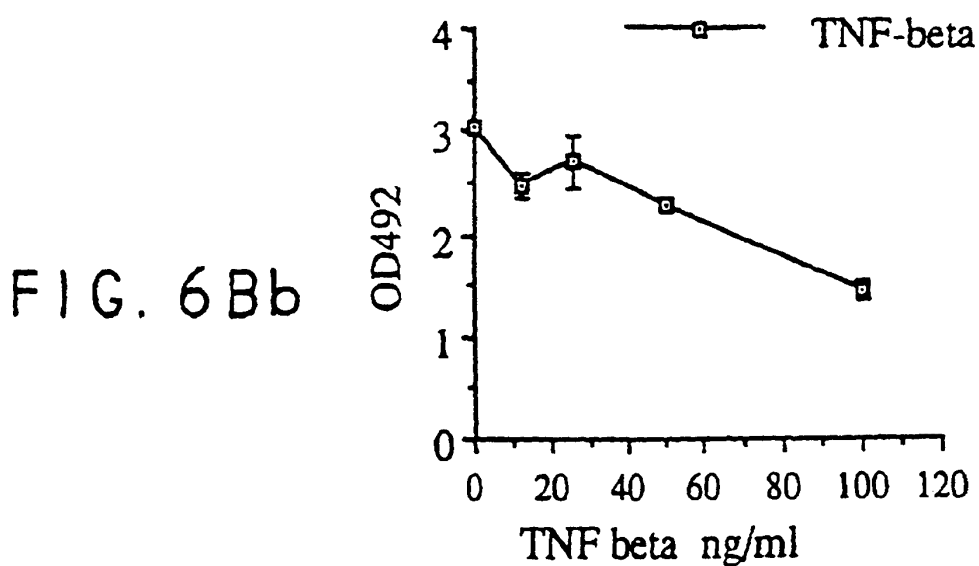
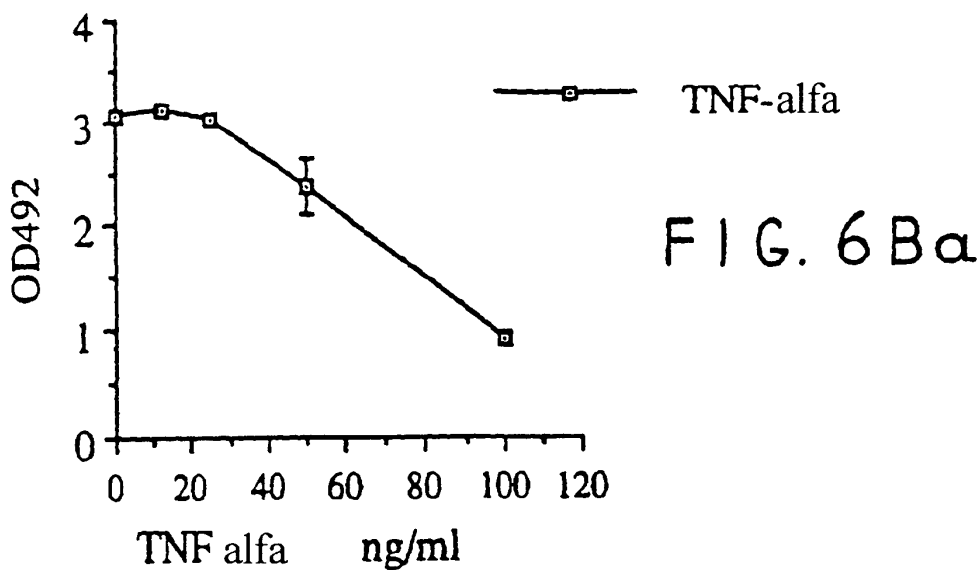


FIG. 7

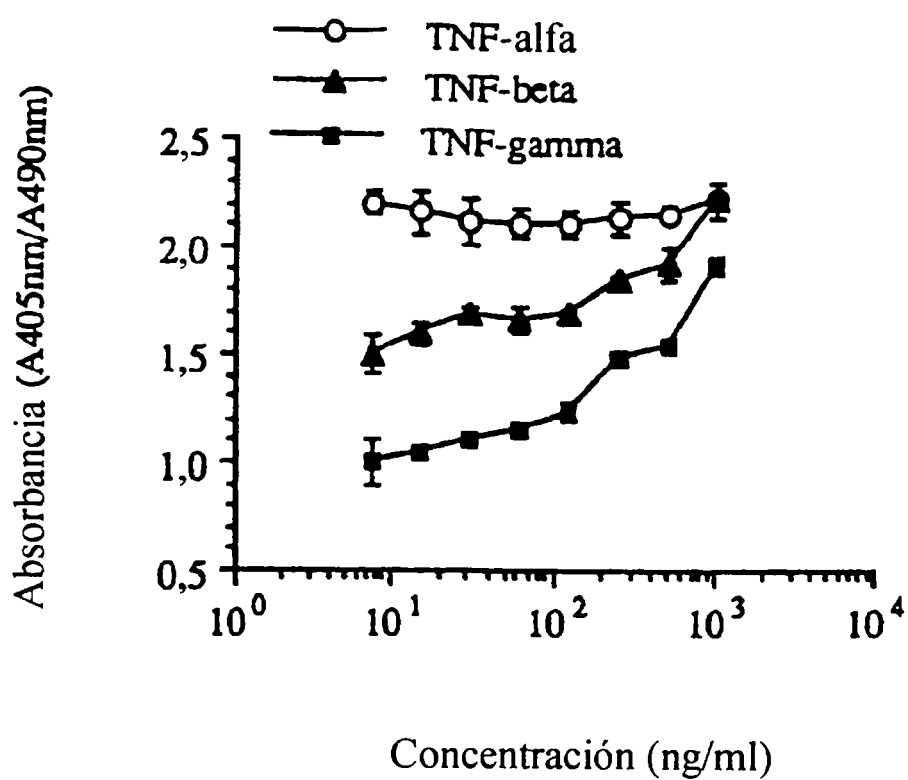
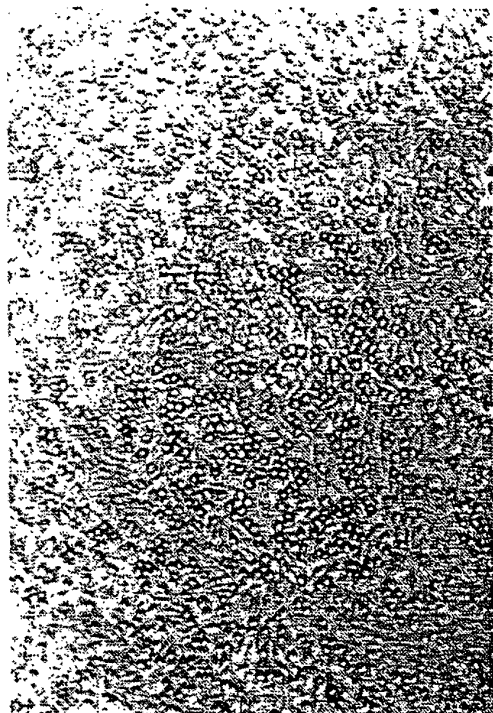


FIG. 8A

Testigo



L929

FIG. 8B

TNF $\alpha$

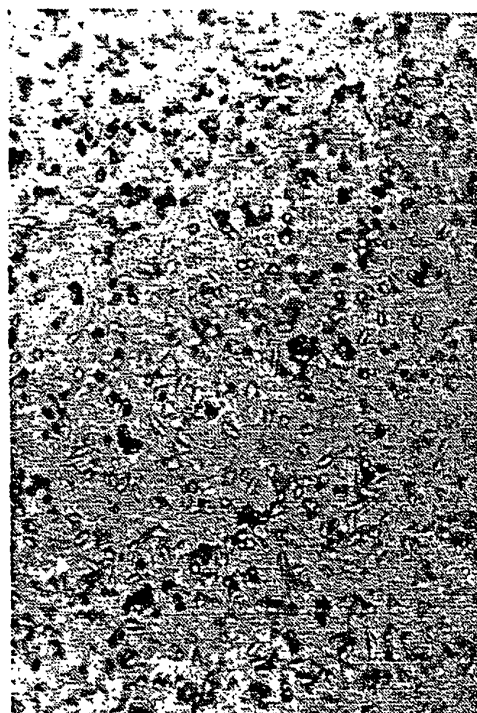


FIG. 8C

TNF $\gamma$

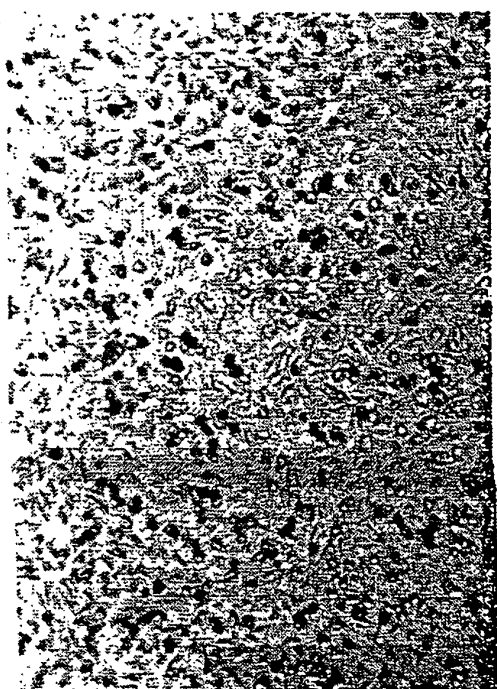
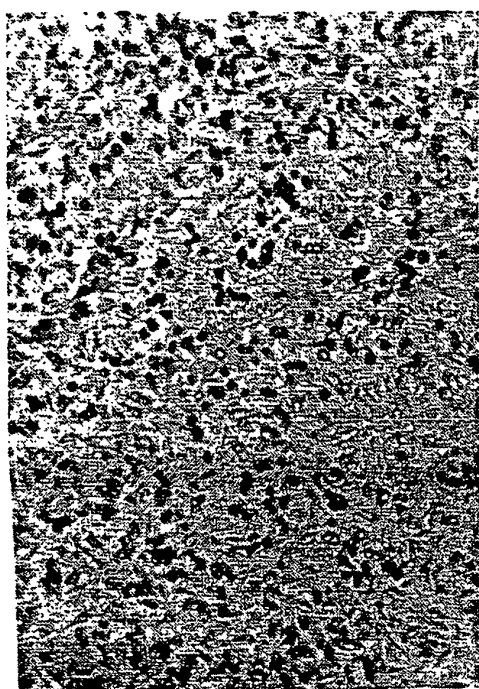


FIG. 8D

TNF $\beta$



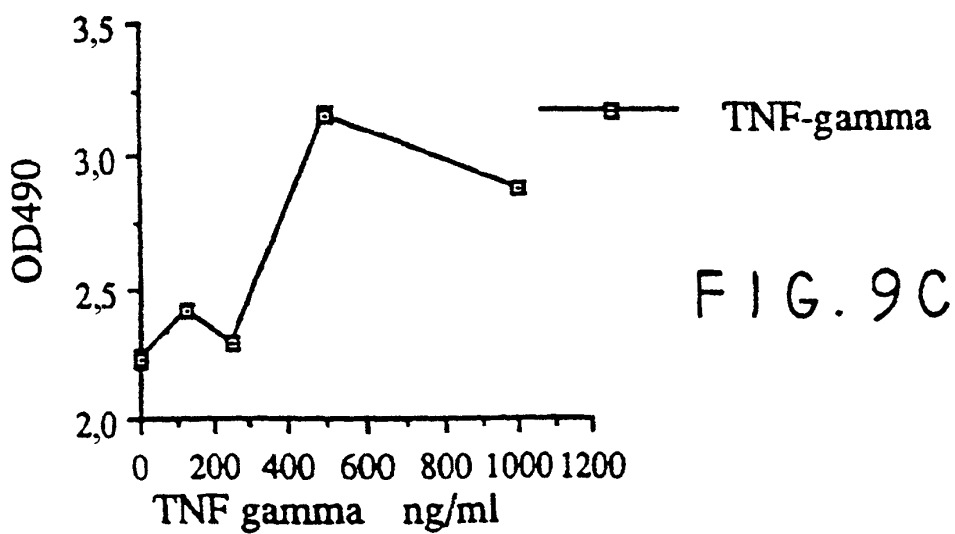
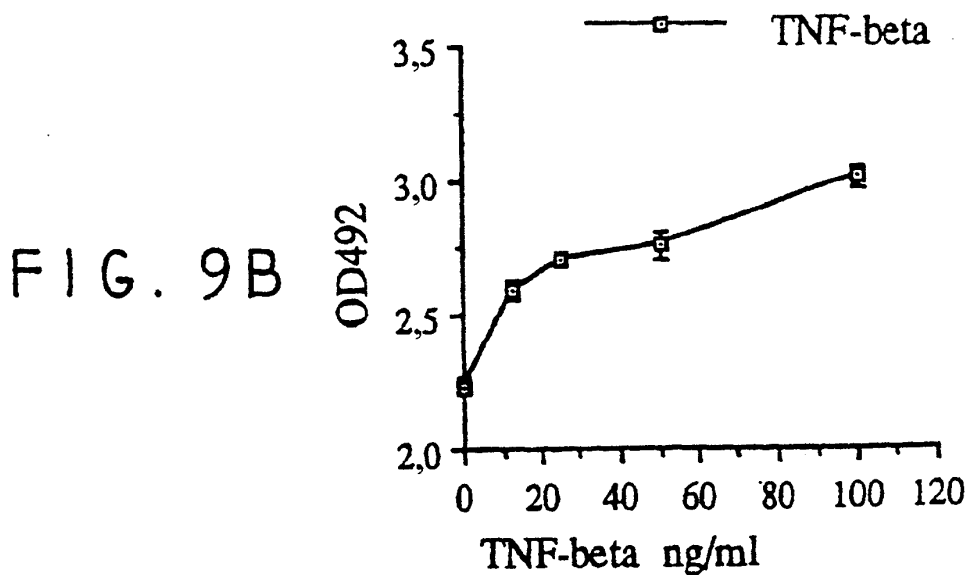
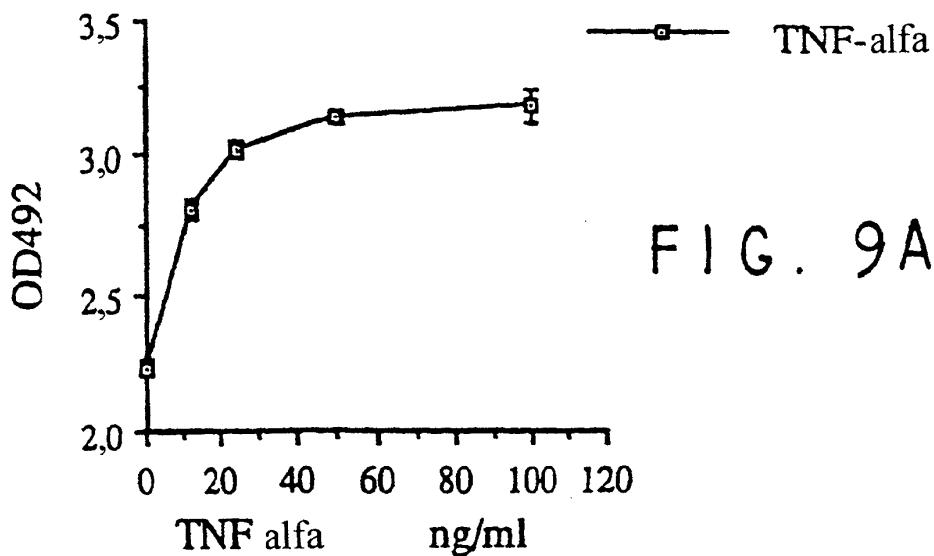
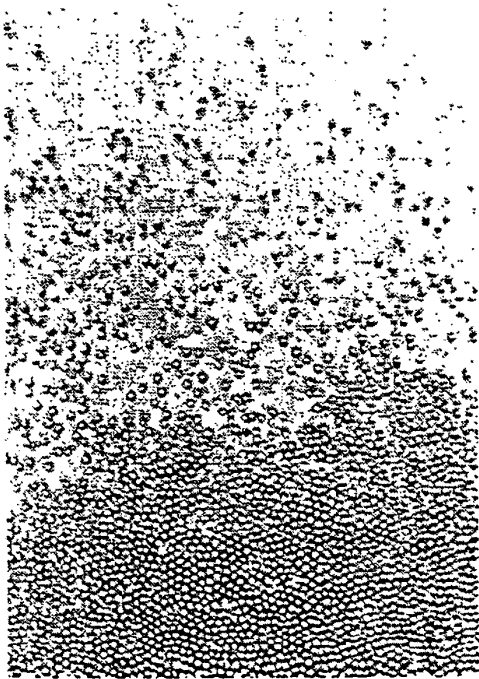


FIG. 10A

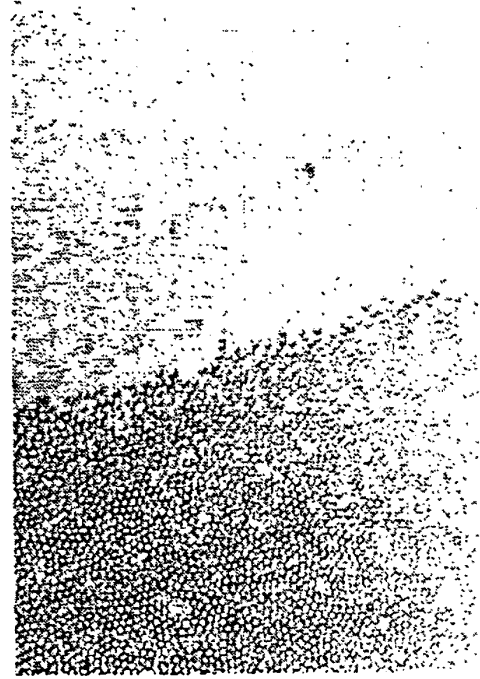
Testigo



HL60

FIG. 10B

TNF $\alpha$



TNF $\gamma$

FIG. 10C

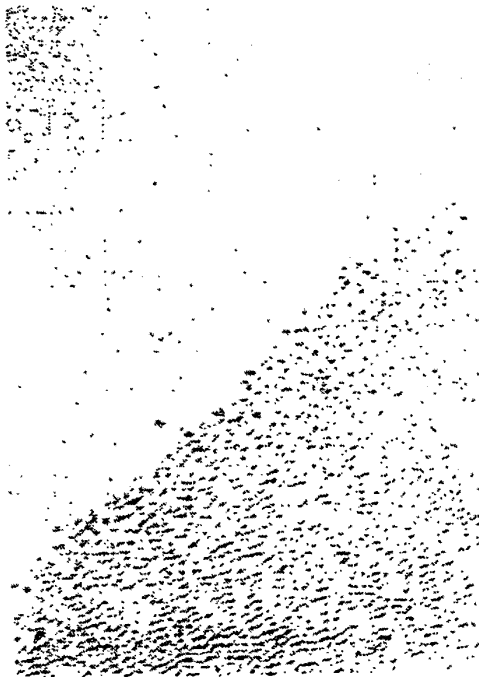
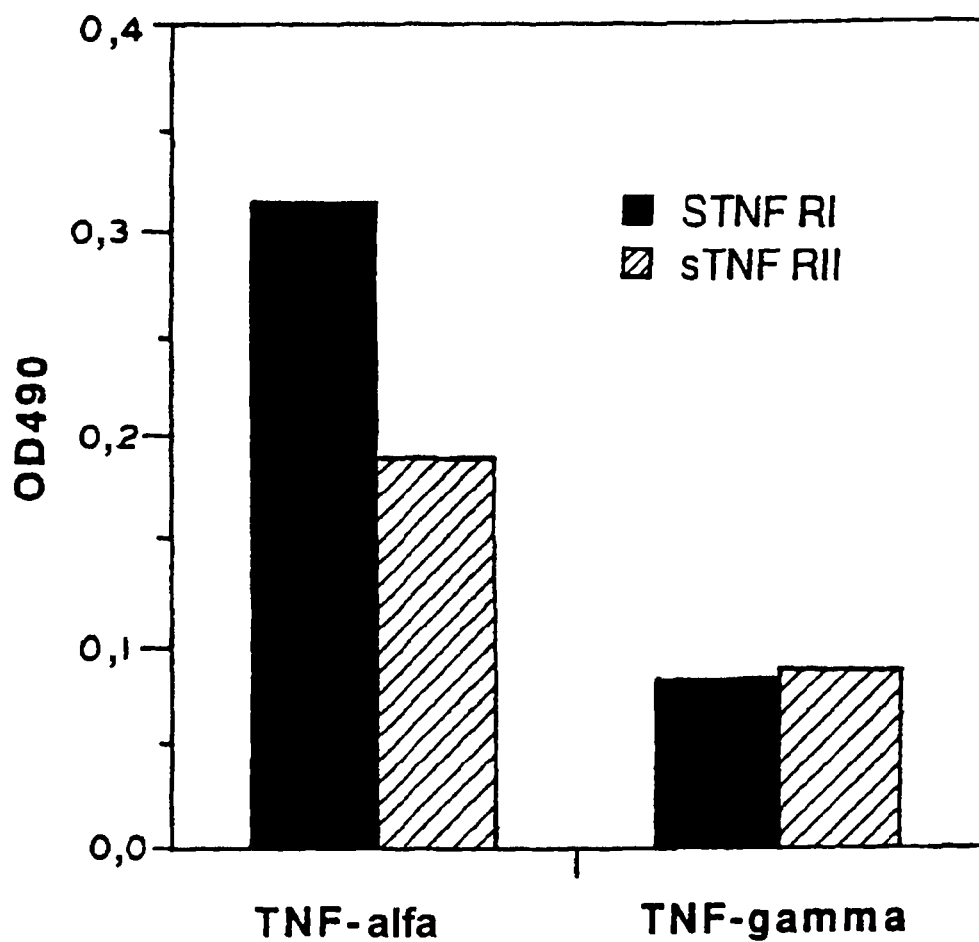


FIG. II



# ES 2 285 701 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: YU, *ET AL.*
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Factor-Gamma de la necrosis tumoral humana
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 2
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE LA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI, STEWART and OLS-  
TEIN
- 15 (B) CALLE: 6 BECKER FARM ROAD
- (C) CIUDAD: ROSELAND
- (D) ESTADO: NEW JERSEY
- (E) PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 07068
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: DISQUETE DE 9 CM
- 25 (B) ORDENADOR: IBM PS/2
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS
- (D) SOFTWARE: WORD PERFECT 5.1
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: Presentada con la presente
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) FECHA DE LA SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- 40 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (viii) INFORMACIÓN DEL APODERADO/AGENTE:
- (A) NOMBRE: FERRARO, GREGORY D.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.134
- 45 (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 325800-256
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- (A) TELÉFONO: 201-994-1700
- 50 (B) TELEFAX: 201-994-1744

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO: 1:

- 55 (i) CARÁCTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 2442 PARES DE BASES
- (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- (C) CATENARIEDAD: SENCILLA
- 60 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:
- 65

ES 2 285 701 T3

	CCCAATCAAG	AGAAATTCCA	TACTATCACC	AGTTGGCCGA	CTTCCAAGT	CTAGTCAGA	60
	AATCCAAGGC	ACCTCACACC	TAGAGTTCCT	ATACCTCTGA	GACTCCAGAG	GAAAGAACAA	120
	GACAGTGCAG	AAGGATATGT	TAGAACCAC	TGAAAACCTA	GAAGGTTGAA	AAGGAAGCAT	180
5	ACCCTCCTGA	CCTATAAGAA	AATTTTCAGT	CTGCAGGGG	ATATCCTTGT	GGCCCAAGAC	240
	ATTGGTGTTA	TCATTTGACT	AAGAGGAAAT	TATTTGTGGT	GAGCTCTGAG	TGAGGATTAG	300
	GACCAGGGAG	ATGCCAAGTT	TCTATCACTT	ACCTCATGCC	TGTAAGACAA	GTGTTTTGTT	360
	CCAATTGATG	AATGGGGAGA	AAACAGTTCA	GCCAATCACT	TATGGGCACA	GAATGGAATT	420
10	TGAAGGGTCT	GGTGCCTGCC	CTTGTCTATC	GTAACAAGA	GAGGCATCGA	TGAGTTTTAT	480
	CTGAGTCATT	TGGGAAAGGA	TAATTCCTTG	ACCAAGCCAT	TTTCCTAAAC	ACAGAAGAAT	540
	AGGGGGATT	CTTAACCTTC	ATTGTTCTCC	AGGATCATAG	GTCTCAGGAT	AAATTAATAA	600
15	TTTTCAGGTC	AGACCACTCA	GTCTCAGAAA	GGCAAAGTAA	TTTGCCCCAG	GTCACTAGTC	660
	CAAGATGTTA	TTCTCTTTGA	ACAAATGTGT	ATGTCCAGTC	ACATATTCTT	CATTCACTCC	720
	TCCCCAAAGC	AGTTTTTAGC	TGTTAGGTAT	ATTCGATCAC	TTTAGTCTAT	TTTGAAAATG	780
	ATATGAGACG	CTTTTTAAGC	AAAGTCTACA	GTTTCCCAAT	GAGAAAATTA	ATCCTCTTTC	840
20	TTGTCTTFC	AGTTGTGAGA	CAAACTCCCA	CACAGCACTT	TAAAATCAG	TTCCAGCTC	900
	TGCACTGGGA	ACTAGAACTA	GGCCTGGCCT	TCACCAAGAA	CCGAATGAAC	TATACCAACA	960
	AATTCCTGCT	GATCCCAGAG	TCGGGAGACT	ACTTCATTTA	CTCCAGGTC	ACATTCCGTC	1020
25	GGATGACCTC	TGAGTGCAGT	GAAATCAGAC	AAGCAGCCG	ACCAAACAAG	CCAGACTCCA	1080
	TCACTGTGGT	CATCACCAG	GTAACAGACA	GCTACCCTGA	GCCAAACCAG	CTCCTCATGG	1140
	GGACCAAGTC	TGTATGCGAA	GTAGGTAGCA	ACTGGTTC	GCCCATCTAC	CTCGGAGCCA	1200
	TGTTCTCCTT	GCAAGAAGGG	GACAAGCTAA	TGGTGAACGT	CAGTGACATC	TCTTTGGTGG	1260
30	ATTACACAAA	AGAAGATAAA	ACCTTCTTTG	GAGCCTTCTT	ACTATAGGAG	GAGAGCAAAT	1320
	ATCATTATAT	GAAAGTCCTC	TGCCACCAG	TTCTTAATTT	TCTTTGTTCA	AATGTAATTA	1380
	TAACCAGGGG	TTTTCTTGGG	GCCGGGAGTA	GGGGGCATT	CACAGGGACA	ACGGTTTAGC	1440
	TATGAAATTT	GGGGCCAAA	TTTCACACTT	CATGTGCCTT	ACTGATGAGA	GTACTAAGTG	1500
35	GAAAAAGGCT	GAAGAGAGCA	AATATATTAT	TAAGATGGGT	TGGAGGATTG	GCGAGTTTCT	1560
	AAATATTAAG	ACACTGATCA	CTAAATGAAT	GGATGATCTA	CTCGGTCAG	GATTGAAAGA	1620
	GAAATATTT	AACACCTCCC	TGCTATACAA	TGGTCACCAG	TGGTCCAGTT	ATTGTTCAAT	1680
40	TTGATCATAA	ATTTGCTTCA	ATTCAGGAGC	TTTGAAGGAA	GTCCAAGGAA	AGCTCTAGAA	1740
	AACAGTATAA	ACTTTCAGAG	GCAAAATCCT	TCACCAATTT	TTCCACATAC	TTTCATGCCT	1800
	TGCCTAAAAA	AAATGAAAAG	AGAGTTGGTA	TGTCTCATGA	ATGTTCCAC	AGAAGGAGTT	1860
	GGTTTTCATG	TCATCTACAG	CATATGAGAA	AAGCTACCTT	TCTTTTGATT	ATGTACACAG	1920
45	ATATCTAAAT	AAGGAAGTTT	GAGTTTACA	TGTATATCCC	AAATACRACA	GTTGCTTGTA	1980
	TTCAGTAGAG	TTTTCTTGCC	CACCTATTTT	GTGCTGGGTT	CTACCTTAAC	CCAGAAGACA	2040
	CTATGAAAAA	CAAGACAGAC	TCCACTCAA	ATTTATATGA	ACACCACTAG	ATACTTCTG	2100
	ATCAAACATC	AGTCAACATA	CTCTAAAGAA	TAACCTCAAG	TCTTGGCCAG	GCGCAGTGGC	2160
50	TCACACCTGT	AATCCCAACA	CTTTGGGAGG	CCAAGGTGGG	TGGATCATCT	AAGGCCGGGA	2220
	GTTCAAGACC	AGCCTGACCA	ACGTGGAGAA	ACCCCATCTC	TACTNAAAAT	ACNAAATFAG	2280
	CCGGGCGTGG	TAGCGCATGG	CTGTAANCCT	GGCTACTCAG	GAGGCCGAGG	CAGAAATTT	2340
	NCTTGAACCTG	GGGAGGCAGA	GGTTGCGGTG	AGCCCAGANC	GCGCCATTGC	ACTCCAGCCT	2400
55	GGGTAACAAG	AGCAAAACTC	TGTCCAAAA	AAAAAAAAAA	AA		2442

(2) INFORMACIÓN DE LA SEQ ID NO: 2:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 174 AMINOÁCIDOS
  - (B) TIPO: AMINOÁCIDO
  - (C) CATENARIEDAD:
  - 65 (D) TOPOLOGIA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

ES 2 285 701 T3

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

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