



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 144 386**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/19 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **97952609 .2**

(96) Fecha de presentación : **22.12.1997**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0951551**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.1999**

(54) Título: **Ligando para el activador del receptor de NF- κ B, el ligando es miembro de la superfamilia de TNF.**

(30) Prioridad: **23.12.1996 US 59978 P**
07.03.1997 US 77181 P
14.10.1997 US 64671 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.01.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.01.2009

(73) Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320, US

(72) Inventor/es: **Anderson, Dirk, M.;**
Galibert, Laurent, J. y
Maraskovsky, Eugene

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

DESCRIPCIÓN

Ligando para el activador del receptor de NF- κ B, el ligando es miembro de la superfamilia de TNF.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de las citoquinas, y más específicamente a pares receptor/ligando de citoquina que tienen actividad inmunorreguladora.

10 **Antecedentes de la invención**

El funcionamiento eficiente del sistema inmunitario requiere un balance sutil entre la proliferación y diferenciación celular y la muerte celular, a fin de asegurar que el sistema inmunitario es capaz de reaccionar a los antígenos extraños, pero no a los propios. Integrales con el proceso de regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria son varios miembros de la superfamilia Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNF)/Receptor del Factor del Crecimiento de los Nervios (Smith *et al.*, *Science* 248: 1019; 1990). Esta familia de receptores incluye dos receptores TNF diferentes (Tipo I y Tipo II; Smith *et al.*, *supra*; y Schall *et al.*, *Cell* 61: 361, 1990), el receptor del factor de crecimiento de los nervios (Johnson *et al.*, *Cell* 47: 545, 1986), el antígeno CD40 de las células B (Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.* 8: 1403, 1989), CD27 (Camerini *et al.*, *J. Immunol.* 147: 3165, 1991), CD30 (Durkop *et al.*, *Cell* 68: 421, 1992), el antígeno OX40 de las células T (Malleu *et al.*, *EMBO J.* 9: 1063, 1990), el antígeno humano *Fas* (Itoh *et al.*, *Cell* 66: 233, 1991), el receptor murino 4-1BB (Kwon *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1963, 1989) y un receptor al que se hace referencia como Receptor Inductor de Apoptosis (AIR; USSN 08/720.864, presentada el 4 de octubre de 1996).

CD40 es un receptor presente en los linfocitos B, las células epiteliales y algunas líneas de células de carcinoma que interacciona con un ligando encontrado en las células T activadas, CD40L (documento USSN 08/249.189, presentado el 24 de mayo de 1994). La interacción de este par ligando/receptor es esencial para la respuesta inmunológica tanto celular como humoral. La transducción de señales por CD40 está mediada por la asociación del dominio citoplásmico de esta molécula con miembros de los factores asociados al receptor TNF (TRAFs; Baker y Reddy, *Oncogene* 12: 1, 1996). Se ha encontrado recientemente que los ratones que son deficientes en la expresión de TRAF3 debido a una disrupción direccionada en el gen que codifica TRAF3 parecen normales al nacer pero desarrollan hipoglucemia progresiva y empobrecimiento en glóbulos blancos periféricos, y mueren al cabo de aproximadamente 10 días de edad (Xu *et al.*, *Immunity* 5: 407, 1996). Las respuestas inmunológicas de ratones quiméricos reconstituidos con células hepáticas fetales TRAF3^{-/-} se asemejan a las de los ratones deficientes en CD40, aunque las células DTRAF3^{-/-} parecen ser funcionalmente normales.

El papel crítico de TRAF3 en la transducción de señales puede residir en su interacción con uno de los otros miembros de la superfamilia de receptores TNF, por ejemplo, CD30 o CD27, que están presentes en las células T. Alternativamente, pueden existir otros miembros, todavía no identificados, de esta familia de receptores que interaccionan con TRAF3 y juegan un papel importante en el desarrollo post-natal así como en el desarrollo de un sistema inmunitario competente. La identificación de miembros adicionales de la superfamilia de receptores TNF podría proporcionar un medio adicional de regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria, así como proporcionar potencialmente una mejor comprensión en cuanto al desarrollo post-natal de los mamíferos.

El documento WO 98/25958 describe una secuencia de aminoácidos murina a la que se hace referencia como 499E9 y un anticuerpo que es inmunorreactivo con la secuencia de aminoácidos murina 499E9.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una contraestructura, o ligando, para un nuevo receptor al que se hace referencia como RANK (para receptor activador de NF- κ B), que es un miembro de la superfamilia TNF. El ligando, al que se hace referencia como RANKL, es una proteína transmembranal de Tipo 2 con un dominio intracelular que tiene menos de aproximadamente 50 aminoácidos, un dominio transmembranal y un dominio extracelular de aproximadamente 240 a 250 aminoácidos. Análogamente a otros miembros de la familia TNF a la que pertenece, RANKL tiene una región "espaciadora" entre el dominio transmembranal y el dominio de fijación de receptores que no es necesaria para la fijación de receptores. De acuerdo con ello, formas solubles de RANKL pueden comprender el dominio extracelular entero o fragmentos del mismo que incluyen la región de fijación de receptores.

RANK es una proteína transmembranal de Tipo I que tiene 616 residuos de aminoácidos, que es un miembro de la superfamilia TNFR, e interacciona con TRAF3. La excitación de RANK por sobre-expresión, co-expresión de RANK y RANKL fijado a la membrana, o por RANKL soluble o anticuerpos agonistas de RANK, da como resultado la regulación creciente del factor de transcripción NF- κ B, un factor de transcripción ubicuo que es utilizado de modo muy extenso en células del sistema inmunitario.

Estos y otros aspectos de la presente invención resultarán evidentes después de considerar la descripción detallada que sigue de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 demuestra la influencia de RANK.Fc y hRANKL en el crecimiento de las células T activadas. Se cultivaron células T de sangre periférica humana como se describe en el Ejemplo 12; la recuperación de células T viables se determinó por conteos triplicados con azul tripán.

La Figura 2 ilustra la aptitud de RANKL para inducir la formación de aglomerados DC humanos. Células dendríticas (DC) funcionalmente maduras se generaron *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea (BM) CD34⁺, y se cultivaron como se describe en el Ejemplo 13. Se cultivaron DC CD1a⁺ en un cóctel de citoquinas aislado (Figura 2A), en cóctel más CD40L (Figura 2B), RANKL (Figura 2C), o RANKL desactivado por calentamiento (Δ H) (Figura 2D), y se fotografiaron luego utilizando un microscopio de inversión.

La Figura 3 demuestra que RANKL aumenta la capacidad alo-estimuladora de DC. Se incubaron células T alogénicas con números variables de DC irradiadas cultivadas como se describe en el Ejemplo 13. Los cultivos se pulsaron con [³H]-timidina y las células se cosecharon sobre hojas de fibra de vidrio para conteo. Los valores representan el valor medio $\pm$ la desviación estándar (SD) de cultivos triplicados.

La Figura 4 presenta una alineación de RANK humana con otros miembros de la familia TNFR en la región de pseudorrepeticiones extracelulares ricas en cisteína, estructuralmente conservadas. Se indican los enlaces disulfuro predichos (DS1-DS3). RANK y CD40 contienen sustituciones idénticas de aminoácidos (C^H, C^G) que eliminan DS2 en la segunda pseudorrepetición.

La Figura 5 presenta una alineación de RANKL humana con otros miembros de la familia TNF.

Descripción detallada de la invención

Una nueva inserción parcial de cDNA con un marco de lectura abierto predicho que tiene cierta semejanza con CD40 se identificó en una base de datos que contenía información de secuencias de cDNAs generados a partir de células dendríticas (DC) derivadas de médula ósea humana. La inserción se utilizó para hibridación a transferencias de colonias generadas a partir de una genoteca de DC cDNA que contenía cDNAs de longitud total. Se analizaron varias hibridaciones de colonias, y se aislaron dos clones (SEQ ID Nos: 1 y 3). SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de nucleótidos y aminoácidos de una proteína de longitud total predicha basada en alineación de las secuencias solapantes de SEQ ID Nos: 1 y 3.

RANK es un miembro de la superfamilia de receptores TNF; el mismo se asemeja estrechamente a CD40 en la región extracelular. Análogamente a CD40, RANK se asocia con TRAF2 y TRAF3 (como se ha determinado por ensayos de co-inmunoprecipitación sustancialmente como ha sido descrito por Rothe *et al.*, *Cell* 83: 1243, 1995. TRAFs son críticamente importantes en la regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria. Por su asociación con diversos miembros de la superfamilia de receptores TNF, se transduce una señal a una célula. Dicha señal da como resultado la proliferación, diferenciación o apoptosis de la célula, dependiendo del receptor o receptores que se exciten y del o de los TRAF(s) que se asocien con el o los receptores; diferentes señales pueden transducirse a una célula por coordinación de diversos sucesos de señalización. Así, una señal transducida por un miembro de esta familia puede ser proliferativa, diferenciadora o apoptótica, dependiendo de otras señales que sean transducidas a la célula, y/o del estado de diferenciación de la célula. Dicha regulación exquisita de este camino proliferativo/apoptótico es necesaria para desarrollar y mantener protección contra los patógenos; los desequilibrios pueden dar como resultado una enfermedad autoinmune.

RANK se expresa en células epiteliales, algunas líneas de células B, y en células T activadas. Sin embargo, su expresión en las células T activadas es tardía, aproximadamente 4 días después de la activación. Esta evolución temporal de la expresión coincide con la expresión de Fas, un conocido agente de apoptosis. RANK puede actuar como señal anti-apoptótica, salvando las células que expresan RANK de la apoptosis como se sabe que hace CD40. Alternativamente, RANK puede confirmar una señal apoptótica en las circunstancias apropiadas, nuevamente de modo análogo a CD40. RANK y su ligando desempeñan probablemente un papel integral en la regulación de la respuesta inmunológica e inflamatoria.

Además, la letalidad post-natal de los ratones que tienen una disrupción direccionada del gen TRAF3 demuestra la importancia de esta molécula, no sólo en la respuesta inmunológica, sino en el desarrollo. El aislamiento de RANK, como proteína que se asocia con TRAF3, y su ligando, RANKL, permitirá la definición ulterior de este camino de señalización, y el desarrollo de modalidades diagnósticas y terapéuticas para uso en el área de las enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.

DNAs, Proteínas y Análogos

La presente invención proporciona polipéptidos humanos RANKL aislados, análogos (o muteínas) de los mismos que tienen una actividad exhibida por la molécula nativa (es decir, muteínas RANKL que se fijan específicamente a un RANK expresado en las células o inmovilizado en una superficie, o a anticuerpos RANKL específicos; formas solubles de los mismos que inhiben la señalización por RANK inducida por el ligando RANK) y fragmentos que son capaces de fijar RANK. Tales proteínas están sustancialmente exentas de materiales contaminantes endógenos y,

opcionalmente, sin glicosilación asociada a un patrón nativo. Derivados de RANKL dentro del alcance de la invención incluyen también diversas formas estructurales de las proteínas primarias que retienen actividad biológica. Debido a la presencia de grupos amino y carboxilo ionizables, por ejemplo, una proteína RANKL puede hallarse en la forma de sales ácidas o básicas, o puede encontrarse en forma neutra. Los residuos de aminoácidos individuales pueden estar modificados también por oxidación o reducción. La estructura primaria de aminoácidos puede estar modificada por formación de conjugados covalentes o agregativos con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y análogos, o por creación de mutantes de las secuencias de aminoácidos. Se preparan derivados covalentes por enlace de grupos funcionales particulares a cadenas laterales de aminoácidos o a los términos N o C.

Derivados de RANKL pueden obtenerse también por la acción de agentes de reticulación, tales como el éster de M-maleimidobenzoil-succinimida y N-hidroxisuccinimida, en los residuos cisteína y lisina. Las proteínas de la invención pueden estar unidas también covalentemente por grupos laterales reactivos a diversos sustratos insolubles, tales como estructuras de agarosa activadas por bromuro de cianógeno, activadas por bisoxirano, activadas por carbonildiimidazol o activadas por tosilo, o por adsorción a superficies de poliolefinas (con o sin reticulación por aldehído glutárico). Una vez fijadas a un sustrato, las proteínas pueden utilizarse para fijar selectivamente (para propósitos de ensayo o de purificación) anticuerpos generados contra las proteínas o contra otras proteínas que son similares a RANKL, así como otras proteínas que fijan RANKL u homólogos del mismo.

Formas solubles de RANKL están también dentro del alcance de la invención. La secuencia de nucleótidos y la secuencia predicha de aminoácidos de RANKL se muestra en SEQ ID NO: 12 (humana). El análisis por ordenador indicó que RANKL es una proteína transmembranal Tipo 2; RANKL murina contiene un dominio intracelular predicho de 48 aminoácidos, un dominio transmembranal de 21 aminoácidos y un dominio extracelular de 247 aminoácidos, y RANKL humana contiene un dominio intracelular predicho de 47 aminoácidos, un dominio transmembranal de 21 aminoácidos y un dominio extracelular de 249 aminoácidos.

RANKL soluble comprende un péptido de señal y el dominio extracelular o un fragmento del mismo que es capaz de fijar el polipéptido RANK. Un péptido de señal ilustrativo es el representado en SEQ ID NO: 9; otros péptidos de señal (o conductores) son bien conocidos en la técnica, e incluyen el de interleuquina-7 murina o la hormona de crecimiento humana. RANKL es similar a otros miembros de la familia TNF en que tiene una región de aminoácidos entre el dominio transmembranal y la región de fijación de receptores que no parece ser necesaria para la actividad biológica; se hace referencia a ésta como región "espaciadora". La alineación de la secuencia de aminoácidos indica que la región de fijación de receptores comprende desde aproximadamente el aminoácido 162 de RANKL humana hasta aproximadamente el aminoácido 317 (correspondiente a los aminoácidos 139 a 294 de RANKL murina, SEQ ID NO: 10), comenzando con un residuo Ala que está conservado entre muchos miembros de la familia (aminoácido 162 de SEQ ID NO: 12).

Además, fragmentos del dominio extracelular proporcionarán también formas solubles de RANKL. Los expertos en la técnica reconocerán que la región de fijación de receptores real puede ser diferente de la predicha por análisis mediante ordenador. Así, es de esperar que el aminoácido N-terminal de una RANKL soluble se encuentre dentro de aproximadamente 5 aminoácidos a cada lado del residuo Ala conservado. Alternativamente, la totalidad o una porción de la región espaciadora puede estar incluida en el término N de una RANKL soluble, como puede ser la totalidad o una porción de los dominios transmembranal y/o intracelular, con tal que la RANKL soluble resultante no esté asociada a la membrana. De acuerdo con ello, una RANKL soluble tendrá un aminoácido N-terminal seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos 1 a 162 de SEQ ID NO: 13. Preferiblemente, el aminoácido del terminal amino está comprendido entre los aminoácidos 69 y 162 de SEQ ID NO: 13 (RANKL humana). Análogamente, el aminoácido del terminal carboxi puede estar comprendido entre los aminoácidos 313 y 317 de SEQ ID NO: 13 (RANKL humana). Los expertos en la técnica pueden preparar estas formas y formas solubles adicionales por experimentación de rutina.

Pueden prepararse fragmentos utilizando técnicas conocidas para aislar una porción deseada de la región extracelular, y pueden prepararse, por ejemplo, por comparación de la región extracelular con las de otros miembros de la familia TNF (de la cual forma parte RANKL) y selección de formas similares a las preparadas para otros miembros de la familia. Alternativamente, pueden utilizarse sitios de restricción únicos o métodos PCR que se conocen en la técnica para preparar numerosas formas truncadas que pueden expresarse y analizarse en cuanto a actividad.

Otros derivados de las proteínas RANKL comprendidos dentro del alcance de esta invención incluyen conjugados covalentes o agregativos de las proteínas o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo por síntesis en cultivo recombinante como fusiones N-terminales o C-terminales. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser una secuencia de polipéptido de señal (o conductor) en la región N-terminal de la proteína que dirige por co-traducción o post-traducción la transferencia de la proteína desde su sitio de síntesis a su sitio de función dentro o fuera de la membrana o pared celular (v.g., el conductor del factor α de levadura).

Las fusiones de proteínas pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de proteínas RANKL y homólogos (v.g., poli-His). La secuencia de aminoácidos de las proteínas de la invención puede estar enlazada también a un péptido de identificación tal como ha sido descrito por Hopp *et al.*, *Bio/Technology* 6: 1204 (1988). Un péptido fuertemente antigénico de este tipo proporciona un epítope enlazado reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico, que permite el ensayo rápido y la purificación fácil de la proteína recombinante expresada. La secuencia de Hopp *et al.* es escindida también específicamente por la enteroquinasa mucosal bovina,

permitiendo la eliminación del péptido de la proteína purificada. Proteínas de fusión protegidas terminalmente con tales péptidos pueden ser también resistentes a la degradación intracelular en *E. coli*.

Las proteínas de fusión comprenden adicionalmente la secuencia de aminoácidos de una RANKL enlazada a una región Fc de inmunoglobulina. Una región Fc ilustrativa es una IgG₁ humana, teniendo un nucleótido una secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 8. Pueden utilizarse también fragmentos de una región Fc, al igual que mutéas Fc. Por ejemplo, ciertos residuos dentro de la región bisagra de una región Fc son críticos para fijación de alta afinidad a FcγRI. Canfield y Morrison (*J. Exp. Med.* 173: 1483; 1991) consignaron que Leu₍₂₃₄₎ y Leu₍₂₃₅₎ eran críticas para fijación con afinidad alta de IgG₃ a FcγRI presente en células U937. Resultados similares fueron obtenidos por Lund *et al.* (*J. Immunol.* 147: 2657, 1991; *Molecular Immunol.* 29: 53, 1991). Tales mutaciones, solas o en combinación, pueden producirse en una región Fc de IgG₁ para disminuir la afinidad de IgG₁ para FcR. Dependiendo de la porción de la región Fc utilizada, una proteína de fusión puede expresarse como un dímero, por formación de puentes disulfuro intercatenarios. Si las proteínas de fusión se producen con ambas cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, es posible formar un oligómero proteínico con tantas como 4 regiones RANKL.

En otra realización, las proteínas RANKL comprenden adicionalmente un péptido de oligomerización tal como un dominio cremallera de leucina. Las cremalleras de leucina fueron identificadas originalmente en varias proteínas de fijación de DNA (Landschulz *et al.*, *Science* 240: 1759, 1988). El dominio de cremallera de leucina es un término utilizado para hacer referencia a un dominio peptídico conservado presente en estas (y otras) proteínas, que es responsable de la dimerización de las proteínas. El dominio de cremallera de leucina (al que se hace referencia también en esta memoria como dominio de oligomerización, o formador de oligómeros) comprende una repetición de heptada repetitiva, con cuatro o cinco residuos leucina intercalados con otros aminoácidos. Ejemplos de dominios de cremallera de leucina son los encontrados en el factor de transcripción de levadura GCN4 y una proteína de fijación de DNA termoestable encontrada en hígado de rata (C/EBP; Landschulz *et al.* *Science* 243: 1681, 1989). Dos proteínas de transformación nucleares, *fos* y *jun*, exhiben también dominios de cremallera de leucina, como lo hace el producto génico del proto-oncogén murino, *c-myc* (Landschulz *et al.*, *Science* 240: 1759, 1988). Los productos de los oncogenes nucleares *fos* y *jun* comprenden dominios de cremallera de leucina preferentemente en forma de un heterodímero (O'Shea *et al.*, *Science* 245: 646, 1989; Turner y Tjian, *Science* 243: 1689, 1989). El dominio de cremallera de leucina es necesario para la actividad biológica (fijación de DNA) en estas proteínas.

Las proteínas fusógenas de varios virus diferentes, con inclusión de paramixovirus, coloravirus, virus del sarampión y muchos retrovirus, poseen también dominios de cremallera de leucina (Buckland y Wild, *Nature* 338: 547, 1989; Britton, *Nature* 353: 394, 1991; Delwart y Mosialos, *AIDS Research and Human Retroviruses* 6: 703, 1990). Los dominios de cremallera de leucina en estas proteínas fusógenas virales están próximos a la región transmembranal de las proteínas; se ha sugerido que los dominios de cremallera de leucina podrían contribuir a la estructura oligómera de las proteínas fusógenas. La oligomerización de las proteínas fusógenas virales está implicada en la formación de poros de fusión (Spruce *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3523, 1991). Se ha comunicado también recientemente que los dominios de cremallera de leucina juegan un papel en la oligomerización de los factores de transcripción del choque térmico (Rabindran *et al.*, *Science* 259: 230, 1993).

Los dominios de cremallera de leucina se pliegan como serpientes enrollados, cortos y paralelos. (O'Shea *et al.*, *Science* 254: 539; 1991). La arquitectura general del serpentín enrollado paralelo ha sido bien caracterizada, con un empaquetamiento del tipo de "botones en ojales" como fue propuesto por Crick en 1953 (*Acta Crystallogr.* 6: 689). El dímero formado por un dominio de cremallera de leucina es estabilizado por la repetición de heptada, designada (*abcdefg*)_n de acuerdo con la notación de McLachlan y Stewart (*J. Mol. Biol.* 98: 293; 1975), en la cual los residuos *a* y *d* son generalmente residuos hidrófobos, siendo *d* una leucina, que están alineados en la misma cara de una hélice. Residuos de carga opuesta se encuentran comúnmente en las posiciones *g* y *e*. Así pues, en un serpentín enrollado paralelo formado por dos dominios de cremallera de leucina helicoidales, los "botones" formados por las cadenas laterales hidrófobas de la primera hélice están empaquetados en los "ojales" formados entre las cadenas laterales de la segunda hélice.

Los residuos leucina en la posición *d* aportan grandes energías de estabilización hidrófoba, y son importantes para la formación de dímeros (Krystek *et al.*, *Int. J. Peptide Res.* 38: 229, 1991). Lovejoy *et al.* comunicaron recientemente la síntesis de un haz helicoidal α de tres cadenas en el cual las hélices están dirigidas arriba-arriba-abajo (*Science* 259: 1288, 1993). Sus estudios confirmaron que la energía de estabilización hidrófoba proporciona la principal fuerza impulsora para la formación de serpientes enrollados a partir de monómeros helicoidales. Estos estudios indican también que interacciones electrostáticas contribuyen a la estequiometría y la geometría de los serpientes enrollados.

Varios estudios han indicado que aminoácidos conservadores pueden encontrarse en sustitución de residuos leucina individuales con una disminución mínima de la aptitud para la formación de dímeros; sin embargo, los cambios múltiples dan usualmente como resultado la pérdida de esta aptitud (Landschulz *et al.*, *Science* 243: 1681, 1989; Turner y Tjian, *Science* 243: 1689, 1989; Hu *et al.*, *Science* 250: 1400, 1990). Van Heekeren *et al.* comunicaron que cierto número de residuos amino diferentes pueden encontrarse en sustitución de los residuos leucina en el dominio de cremallera de leucina de GCN4, y encontraron adicionalmente que algunas proteínas GCN4 que contienen dos sustituciones leucina eran débilmente activas (*Nucl. Acids. Res.* 20: 3721, 1992). La mutación de las leucinas heptádicas primera y segunda del dominio de cremallera de leucina de la proteína de fusión con el virus del sarampión (MVF) no afectaba la formación de sincitios (una medida de la fusión celular inducida por virus); sin embargo, la mutación de

la totalidad de los cuatro residuos leucina impedía la fusión completamente (Buckland *et al.*, *J. Gen. Virol.* 3: 1703, 1992). Ninguna de las mutaciones afectaba a la aptitud de MVF para formar un tetrámero.

Se ha encontrado que las sustituciones de aminoácidos en los residuos *a* y *d* de un péptido sintético que representa el dominio de cremallera de leucina GCN4 cambian las propiedades de oligomerización del dominio de cremallera de leucina (Alber, Sexto Simposium de la Sociedad de Proteínas, San Diego, CA). Cuando todos los residuos en la posición *a* están cambiados a isoleucina, la cremallera de leucina forma todavía un dímero paralelo. Cuando, además de este cambio, todos los residuos leucina en la posición *d* están cambiados también a isoleucina, el péptido resultante forma espontáneamente un serpentín enrollado paralelo trímero en solución. La sustitución de todos los aminoácidos en la posición *d* con isoleucina y en la posición *a* con leucina da como resultado un péptido que se tetrameriza. Los péptidos que contienen estas sustituciones se designan también como dominios de cremallera de leucina.

La presente invención incluye también RANKL con o sin glicosilación de patrón nativo asociada. Las proteínas expresadas en levadura o sistemas de expresión de mamífero, v.g. las células COS-7, pueden ser similares o ligeramente diferentes en peso molecular y patrón de glicosilación a las moléculas naturales, dependiendo del sistema de expresión. La expresión de DNAs que codifican las proteínas de la invención en bacterias tales como *E. coli* proporciona moléculas no glicosiladas. Análogos mutantes funcionales de la proteína RANKL que tienen sitios de glicosilación en N desactivados pueden producirse por síntesis de oligonucleótidos y ligación o por técnicas de mutagénesis orientada. Estas proteínas análogas pueden producirse en una forma homogénea, de carbohidratos reducidos con buen rendimiento utilizando sistemas de expresión de levadura. Los sitios de glicosilación en N en proteínas eucariotas se caracterizan por el triplete de aminoácidos Asn-A₁-Z, donde A₁ es cualquier aminoácido excepto Pro, y Z es Ser o Thr. En esta secuencia, la asparagina proporciona un grupo amino de cadena lateral para unión covalente de carbohidrato. Dicho sitio puede ser eliminado por reemplazamiento de Asn o del residuo Z por otro aminoácido, delección de Asn o Z, o inserción de un aminoácido distinto de Z entre A₁ y Z, o un aminoácido distinto de Asn entre Asn y A₁.

Derivados de la proteína RANKL pueden obtenerse también por mutaciones de la RANKL nativa o subunidades de la misma. Una proteína RANKL mutada, como se contempla en esta memoria, es un polipéptido homólogo a una proteína RANKL nativa, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de la proteína nativa debido a una o una pluralidad de delecciones, inserciones o sustituciones. El efecto de cualquier mutación realizada en un DNA que codifica un péptido mutado puede ser determinado fácilmente por análisis de la aptitud del péptido mutado para fijar su contraestructura de una manera específica. Además, la actividad de análogos, muteínas o derivados de RANKL puede determinarse por cualquiera de los ensayos descritos en esta memoria (por ejemplo, inducción de la activación de NF-κB).

Análogos de las proteínas de la invención pueden construirse, por ejemplo, por realización de diversas sustituciones de residuos o secuencias o delección de residuos terminales o internos o secuencias no necesarias para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos cisteína pueden ser deleccionados o reemplazados con otros aminoácidos para impedir la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos después de renaturalización. Otros métodos distintos de la mutagénesis implican modificación de residuos de aminoácidos dibásicos adyacentes para intensificar la expresión en sistemas de levadura en los cuales está presente actividad de la proteasa KEX2.

Cuando se adopta una estrategia de delección o inserción, debería considerarse el efecto potencial de la delección o inserción sobre la actividad biológica. Subunidades de las proteínas de la invención pueden construirse por delección de residuos o secuencias terminales o internos. Formas solubles de RANKL pueden prepararse y testarse fácilmente en cuanto a su aptitud para inducir la activación de NF-κB. Polipéptidos correspondientes a las regiones citoplásmicas, y fragmentos de los mismos (por ejemplo, un dominio de muerte) pueden prepararse por técnicas similares. Una orientación adicional en cuanto a los tipos de mutaciones que pueden hacerse se proporciona por una comparación de la secuencia de RANKL con proteínas que tienen estructuras similares, y por realización de análisis estructurales de las proteínas RANKL de la invención.

Generalmente, las sustituciones deberían hacerse de manera conservadora; es decir, los aminoácidos sustitutos más preferidos son aquéllos que no afectan a la actividad biológica de RANKL (es decir, la aptitud de las proteínas de la invención para fijar anticuerpos a la proteína nativa correspondiente de manera sustancialmente equivalente, la aptitud para fijar la contraestructura sustancialmente del mismo modo que la proteína nativa, la aptitud para inducir una señal de RANKL, o la aptitud para inducir la activación de NF-κB). Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de aminoácidos situados fuera del o de los dominios de fijación (sean áreas ligando/receptor o áreas de fijación de anticuerpos para el dominio extracelular, o regiones que interaccionan con otras proteínas intracelulares en cuanto al dominio citoplásmico), y sustitución de aminoácidos que no alteran la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína nativa. Ejemplos adicionales incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala uno por otro, o sustituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras sustituciones conservadoras de este tipo, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son bien conocidas.

Las mutaciones en secuencias de nucleótidos construidas para expresión de proteínas análogas o fragmentos de las mismas deben preservar, por supuesto, la fase de marco de lectura de las secuencias codificantes y preferiblemente no crearán regiones complementarias que pudieran hibridarse para producir estructuras secundarias de mRNA tales como bucles u horquillas que podrían afectar de manera desfavorable a la traducción del mRNA.

No todas las mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína RANKL o fragmentos de la misma se expresarán en el producto final; por ejemplo, pueden hacerse sustituciones de nucleótidos para intensificar la expresión, fundamentalmente con objeto de evitar bucles de estructura secundaria en el mRNA transcrito (véase el documento EPA 75.444A, que se incorpora en esta memoria por referencia), o para proporcionar codones que son traducidos más fácilmente por el hospedador seleccionado, v.g., los codones de preferencia de *E. coli* bien conocidos para expresión en *E. coli*.

Aunque un sitio de mutación puede estar predeterminado, no es necesario que la naturaleza de la mutación esté predeterminada *per se*. Por ejemplo, con objeto de seleccionar características óptimas de mutantes, puede realizarse una mutagénesis aleatoria y las proteínas mutadas expresadas pueden escrutarse respecto a la actividad deseada. Las mutaciones pueden introducirse en loci particulares por síntesis de oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligación a fragmentos de la secuencia nativa. Después de la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o delección de aminoácido deseada.

Alternativamente, pueden emplearse procedimientos de mutagénesis orientada dirigida a oligonucleótidos a fin de proporcionar un gen alterado que tenga codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, delección, o inserción requerida. Métodos ilustrativos de realización de las alteraciones arriba expuestas han sido descritos por Walter *et al.* (*Gene* 42: 133, 1986); Bauer *et al.* (*Gene* 37: 73, 1985); Craik (*BioTechniques*, enero de 1985, 12-19); Smith *et al.* (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); y las Patentes U.S. Núms. 4.518.584 y 4.737.462 describen técnicas adecuadas, y se incorporan por referencia en esta memoria.

Una realización de la invención es

un DNA que codifica una proteína que tiene un aminoácido como se indica en SEQ ID NO: 13, en donde la proteína tiene un término amino seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 162, inclusive, y un término carboxi seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 313 y el aminoácido 317, inclusive;

moléculas de DNA que codifican fragmentos de proteínas codificadas por el DNA de la invención que son capaces de fijación de polipéptido;

un DNA que comprende un nucleótido como se indica en los nucleótidos 1-951 de SEQ ID NO: 12; un DNA que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en los nucleótidos 484 a 951 de SEQ ID NO: 12, y un DNA que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos entre el aminoácido 1 y el aminoácido 317 de SEQ ID NO: 13.

Realizaciones adicionales de las proteínas de la invención incluyen polipéptidos RANKL codificados por un DNA que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en los nucleótidos 1 a 951 de SEQ ID NO: 12, nucleótidos 484 a 951 de SEQ ID NO: 12 y un polipéptido RANKL que tiene una secuencia de aminoácidos entre el aminoácido 1 y el aminoácido 317 de SEQ ID NO: 13. En una realización preferida, polipéptidos de la invención son aquéllos que son idénticos al menos aproximadamente en un 90% a un polipéptido RANKL codificado por un DNA que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en los nucleótidos 1 a 951 de SEQ ID NO: 12, o un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos entre el aminoácido 1 y el aminoácido 317 de SEQ ID NO: 3.

El porcentaje de identidad puede determinarse utilizando un programa de ordenador, por ejemplo, el programa de ordenador GAP descrito por Devereux *et al.* (*Nucl. Acids Res.* 12: 387, 1984) y disponible del Grupo de Genética de Ordenador de la Universidad de Wisconsin (UWGCG). Para fragmentos derivados de la proteína RANKL, la identidad se calcula sobre la base de la porción de la proteína RANKL que está presente en el fragmento.

La actividad biológica de los análogos o muteínas de RANKL puede determinarse testando la aptitud de los análogos o muteínas para inducir una señal a través de RANK, por ejemplo, activación o transcripción como se describe en los Ejemplos de esta memoria. Alternativamente, pueden utilizarse ensayos adecuados, por ejemplo, un inmunoensayo enzimático o una transferencia de puntos, empleando un anticuerpo que se fija a RANKL nativa, o una forma soluble de RANK, para evaluar la actividad de análogos o muteínas de RANKL. Ensayos adecuados incluyen también, por ejemplo, ensayos que miden la aptitud de un péptido o muteína de RANKL para fijar células que expresan RANK, y/o los efectos biológicos en las mismas. Tales métodos son bien conocidos en la técnica.

Fragmentos de las secuencias de nucleótidos RANKL que codifican fragmentos de proteínas que son capaces de fijar el polipéptido RANK son también útiles. En una realización, tales fragmentos comprenden al menos aproximadamente 17 nucleótidos consecutivos, con preferencia aproximadamente al menos 25 nucleótidos, más preferiblemente al menos 30 nucleótidos consecutivos, del DNA de RANKL descrito en esta memoria. Complementos de DNA y RNA de tales fragmentos se proporcionan en esta memoria, junto con formas monocatenarias y bicatenarias de los DNAs RANKL de SEQ ID Nos: 10 y 12, y los que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente. Un fragmento de DNA RANKL comprende por regla general al menos aproximadamente 17 nucleótidos, con preferencia desde aproximadamente 17 a aproximadamente 30 nucleótidos. Tales fragmentos de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda que corresponde al dominio extracelular de RANKL) se utilizan como sonda o como iniciadores en una reacción en cadena de polimerasa (PCR).

Las sondas encuentran uso también en la detección de la presencia de ácidos nucleicos RANKL en ensayos *in vitro* y en procedimientos tales como transferencias Northern y Southern. Pueden identificarse también tipos de células que expresan RANKL. Tales procedimientos son bien conocidos, y el técnico experto puede seleccionar una sonda de longitud adecuada, dependiendo de la aplicación particular propuesta. Para PCR, se emplean iniciadores 5' y 3' correspondientes a los términos de una secuencia de DNA RANKL a fin de amplificar dicha secuencia, utilizando técnicas convencionales.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos RANKL son oligonucleótidos de sentido o antisentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (sea RNA o DNA) capaz de fijarse a secuencias diana de mRNA RANKL (sentido) o DNA RANKL (antisentido). La aptitud para crear un oligonucleótido antisentido u oligonucleótido de sentido, basado en una secuencia de cDNA para una proteína dada, se describe, por ejemplo, en Stein y Cohen, *Cancer Res.* 48: 2659, 1998 y van der Krol *et al.*, *BioTechniques* 6: 958, 1988.

Usos de DNAs, Proteínas y Análogos

Los DNAs, proteínas y análogos de RANKL descritos en esta memoria tendrán numerosos usos, que incluyen la preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, formas solubles de RANKL serán útiles para transducción de señales por vía de RANK. Composiciones RANKL (tanto proteína como DNAs) serán útiles también en el desarrollo de anticuerpos para RANKL, tanto aquéllos que inhiben la fijación a RANK como los que no lo hacen. Una realización de la invención es un anticuerpo inmunorreactivo con un polipéptido RANKL de la invención, que no es inmunorreactivo con la secuencia de aminoácidos murina denominada 499E9 en WO 98/25958. Los DNAs de la invención son útiles para la expresión de proteínas recombinantes, y como sondas para análisis (sea cuantitativo o cualitativo) de la presencia o distribución de transcritos RANKL.

Las proteínas de la invención serán útiles también en la preparación de kits que se utilizan para detectar RANK o RANKL soluble, o monitorizar la actividad relacionada con RANK, por ejemplo, en muestras de pacientes. Las proteínas RANKL encontrarán usos también en la monitorización de la actividad relacionada con RANK en otras muestras o composiciones, como es necesario cuando se realiza un cribado para antagonistas o miméticos de esta actividad (por ejemplo, péptidos o moléculas pequeñas que inhiben o mimetizan, respectivamente, la interacción). Una diversidad de formatos de ensayo son útiles en tales kits, que incluyen (pero sin carácter limitante) ELISA, transferencia de puntos, ensayos de fijación en fase sólida (tales como los que utilizan un biosensor), ensayos de formato rápido y bioensayos.

El uso de un polipéptido RANKL purificado en el cribado para inhibidores potenciales es importante y puede eliminar virtualmente la posibilidad de reacciones de interferencia con contaminantes. Un ensayo de cribado de este tipo puede utilizar el dominio extracelular de RANKL, o un fragmento del mismo. La detección de la actividad inhibidora de una molécula implicaría típicamente el uso de una forma soluble de RANKL derivada del dominio extracelular en un ensayo de cribado para detectar moléculas capaces de fijar RANK e inhibir la fijación de RANKL.

Adicionalmente, pueden utilizarse también polipéptidos RANKL para diseño basado en la estructura de inhibidores de RANKL. Dicho diseño basado en estructura se conoce también como "diseño racional de fármacos". Los polipéptidos RANKL pueden analizarse tridimensionalmente mediante, por ejemplo, cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o modelización de homología, todos los cuales son métodos bien conocidos. El uso de información estructural de RANKL en sistemas de software de modelización molecular para ayudar al diseño de inhibidores está abarcado también por la invención. Dicha modelización y diseño de fármacos asistida(o) por ordenador pueden utilizar información tal como análisis químico conformacional, potencial electrostático de las moléculas, plegado de proteínas, etc. Un método particular de la invención comprende analizar la estructura tridimensional de RANKL para sitios probables de fijación de sustratos, síntesis de una nueva molécula que incorpora un sitio reactivo predictivo, y ensayo de la nueva molécula como se ha descrito arriba.

Además, como se muestra en los ejemplos de esta memoria, formas solubles de RANKL serán útiles para inducir la maduración de células dendríticas (DC), y para mejorar su capacidad alo-estimulante. De acuerdo con ello, las proteínas RANKL serán útiles en el aumento de una respuesta inmunológica, y pueden utilizarse para estos propósitos sea *ex vivo* (es decir, en la obtención de células tales como DC de un individuo, exposición de las mismas a un antígeno y citoquinas *ex vivo*, y readministración de las mismas al individuo) o *in vivo* (es decir, como un adyuvante de vacuna que aumentará la inmunidad humoral y/o celular). RANKL será útil también para promover la viabilidad de las células T en presencia de TGFB, que será útil también en la regulación de una respuesta inmunológica.

Expresión de RANKL Recombinante

Las proteínas de la presente invención se producen preferiblemente por métodos de DNA recombinante mediante inserción de una secuencia de DNA que codifica la proteína RANKL o un análogo de la misma en un vector de expresión recombinante y expresión de la secuencia de DNA en un sistema de expresión recombinante en condiciones que promueven la expresión. Las secuencias de DNA que codifican las proteínas proporcionadas por esta invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos de cDNA y enlazadores oligonucleotídicos cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, a fin de proporcionar un gen sintético que es susceptible de ser insertado en un vector de expresión recombinante y expresarse en una unidad recombinante de transcripción.

Vectores de expresión recombinantes incluyen fragmentos de DNA sintéticos o derivados de cDNA, que codifican RANKL, u homólogos, mutéfnas o análogos bioequivalentes de los mismos, enlazados operativamente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción adecuados derivados de genes de mamíferos, microbios, virus o insectos. Tales elementos reguladores incluyen un promotor de transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de fijación de ribosoma de mRNA adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción, como se describe en detalle más adelante. Adicionalmente, puede incorporarse la aptitud para replicarse en un hospedador, conferida usualmente por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes.

Las regiones de DNA están enlazadas operativamente cuando las mismas están relacionadas funcionalmente unas con otras. Por ejemplo, el DNA de un péptido de señal (conductor secretorio) está enlazado operativamente a DNA para un polipéptido si se expresa como precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está enlazado operativamente a una secuencia codificante si el mismo controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de fijación de ribosoma está enlazado operativamente a una secuencia codificante si el mismo está posicionado de tal modo que permite la traducción. Por regla general, enlazado operativamente significa contiguo y, en el caso de conductores secretores, contiguo y en marco de lectura. Las secuencias de DNA que codifican RANKL, u homólogos o análogos de las mismas que deben expresarse en un microorganismo no contendrán preferiblemente intrón alguno que pudiera terminar prematuramente la transcripción del DNA en mRNA.

Vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del vector de clonación pBR322 bien conocido (ATCC 37017). Vectores comerciales de este tipo incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EE.UU.). Estas secciones de "cadena principal" pBR322 se combinan con un promotor apropiado y con la secuencia estructural a expresar. *E. coli* se transforma típicamente utilizando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (Bolívar *et al.*, *Gene* 2: 95, 1977). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y proporciona por tanto medios simples para identificación de células transformadas.

Los promotores utilizados comúnmente en vectores de expresión microbiana recombinantes incluyen el sistema de promotores de β -lactamasa (penicilinas) y lactosa (Chang *et al.*, *Nature* 275: 615, 1978; y Goeddel *et al.*, *Nature* 281: 544, 1979), el sistema del promotor triptófano (*trp*) (Goeddel *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 8: 4057, 1980; y EPA 36.776) y el promotor *tac* (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). Un sistema de expresión bacteriano particularmente útil emplea el promotor P_L del fago λ y el represor termolábil cI857ts. Vectores plasmídicos disponibles de la American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor P_L λ incluyen el plásmido pHUB2, residente en la cepa JMB9 de *E. coli* (ATCC 37092) y pPLc28, residente en *E. coli* RR1 (ATCC 53082).

Secuencias de promotores adecuados en vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato-quinasa (Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.* 255: 2073, 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.* 7: 149, 1968; y Holland *et al.*, *Biochem.* 17: 4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato Descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3-fosfo-glicerato-mutasa, piruvato-quinasa, triosafosfato-isomerasa, fosfoglucosa-isomerasa, y glucoquinasa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en R. Hitzeman *et al.*, EPA 73657.

Vectores de levadura preferidos pueden ensamblarse utilizando secuencias de DNA a partir de pBR322 para selección y replicación en *E. coli* (gen Amp^r y origen de replicación) y secuencias de DNA de levadura que incluyen un promotor ADH2 reprimible por glucosa y un conductor de secreción del factor α . El promotor ADH2 ha sido descrito por Russell *et al.* (*J. Biol. Chem.* 258: 2674, 1982) y Beier *et al.* (*Nature* 300: 724, 1982). El conductor del factor α de levadura, que dirige la secreción de proteínas heterólogas puede insertarse entre el promotor y el gen estructural para ser expresado. Véase, v.g., Kurjan *et al.*, *Cell* 30: 933, 1982; y Bitter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5330, 1984. La secuencia conductora puede modificarse de modo que contenga, cerca de su extremo 3', uno o más sitios de restricción útiles para facilitar la fusión de la secuencia conductora a genes extraños.

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción en vectores de expresión a utilizar en la transformación de células de vertebrados pueden ser proporcionadas por fuentes virales. Por ejemplo, promotores e intensificadores utilizados comúnmente se derivan de Polyoma, Adenovirus 2, el Virus 40 de los Simios (SV40), y citomegalovirus humano. Secuencias de DNA derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo, el origen de SV40, el promotor precoz y tardío, el intensificador, el sitio de remodelación y los sitios de poliadenilación pueden utilizarse para proporcionar los otros elementos genéticos requeridos para expresión de una secuencia de DNA heteróloga. Los promotores precoz y tardío son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente a partir del virus como un fragmento que contiene también el origen de replicación viral de SV40 (Fiers *et al.*, *Nature* 273: 113, 1978). Pueden utilizarse también fragmentos de SV40 menores o mayores, con tal que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hasta el sitio *Bgl* II localizado en el origen de replicación viral. Adicionalmente, el promotor genómico viral, las secuencias de control y/o de señal pueden utilizarse, con tal que tales secuencias de control sean compatibles con la célula hospedadora seleccionada. Vectores ilustrativos pueden construirse como se describe por Okayama y Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3: 280, 1983).

Un sistema útil para expresión estable a alto nivel de cDNAs receptores de mamífero en células epiteliales mamarias de murino C127 puede construirse sustancialmente como ha sido descrito por Cosman *et al.* (*Mol. Immunol.* 23: 935, 1986). Se hace referencia a un vector eucariota preferido para expresión de DNA de RANKL como pDC406 (McMahan *et al.*, *EMBO J.* 10: 2821, 1991), e incluye secuencias reguladoras derivadas de SV40, el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y el virus Epstein-Barr (EBV). Otros vectores preferidos incluyen pDC409 y pDC410, que se derivan de pDC406. pDC410 se derivó de pDC406 sustituyendo el origen de replicación de EBV con secuencias que codificaban el antígeno T grande de SV40. pDC409 difiere de pDC406 en que un sitio de restricción *Bgl* II fuera del sitio de clonación múltiple ha sido delecionado, haciendo único el sitio *Bgl* II dentro del sitio de clonación múltiple.

Una línea de células útil que permite la replicación episómica de vectores de expresión, tales como pDC406 y pDC409, que contienen el origen de replicación de EBV, es CV-1/EBNA (ATCC CRL10478). La línea de células CV-1/EBNA se derivó por transfección de la línea de células CV-1 con un gen que codificaba el antígeno 1 nuclear del virus Epstein-Barr (EBNA-1) y expresaba constitutivamente EBNA-1 dirigido por el intensificador/promotor inmediato-precoz de CMV humano.

Células Hospedadoras

Las células hospedadoras transformadas son células que se han transformado o transfectado con vectores de expresión contruidos utilizando técnicas de DNA recombinante y que contienen secuencias que codifican las proteínas de la presente invención. Las células hospedadoras transformadas pueden expresar la proteína deseada (RANKL, u homólogos o análogos de la misma), pero las células hospedadoras transformadas para propósitos de clonación o amplificación del DNA de la invención no precisan expresar la proteína. Las proteínas expresadas se secretarán preferiblemente en el sobrenadante de cultivo, dependiendo del DNA seleccionado, pero pueden depositarse en la membrana celular.

Células hospedadoras adecuadas para expresión de proteínas incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores, bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo *E. coli* o *Bacillus* spp. Las células eucariotas superiores incluyen líneas de células establecidas de origen mamífero como se describe más adelante. Los sistemas de traducción exentos de células podrían emplearse también para producir proteínas utilizando RNAs derivados de las construcciones de DNA descritas en esta memoria. Vectores apropiados de clonación y expresión para uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura, y de mamífero, han sido descritos por Pouwels *et al.* (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, 1985), cuya descripción pertinente se incorpora por la presente como referencia.

Pueden utilizarse hospedadores de expresión procariotas para expresión de RANKL, u homólogos o análogos de la misma que no requieren procesamiento extensivo proteolítico y de disulfuro. Vectores de expresión procariotas comprenden generalmente uno o más marcadores fenotípicos seleccionables, por ejemplo un gen que codifica proteínas que confieren resistencia a antibióticos o que suministra un requerimiento autotrófo, y un origen de replicación reconocido por el hospedador que asegura la amplificación dentro del hospedador. Hospedadores procariotas adecuados para transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque pueden emplearse también otros como cuestión de elección.

RANKL recombinante puede expresarse también en hospedadores de levadura, preferiblemente de las especies *Saccharomyces*, tales como *S. cerevisiae*. Levaduras de otros géneros, tales como *Pichia* o *Kluyveromyces* pueden emplearse también. Los vectores de levadura contendrán generalmente un origen de replicación a partir del plásmido de levadura 2 μ o una secuencia de replicación autónoma (ARS), promotor, DNA codificante de la proteína, secuencias para poliadenilación y terminación de la transcripción, y un gen de selección. Preferiblemente, los vectores de levadura incluirán un origen de replicación y un marcador seleccionable que permita la transformación tanto de la levadura como de *E. coli*, v.g. el gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli* y el gen *trp1* de *S. cerevisiae*, que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, y un promotor derivado de un gen de levadura fuertemente expresado que induce la transcripción de una secuencia estructural aguas abajo. La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona luego un entorno eficaz para detección de la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano.

Protocolos adecuados de transformación de levadura son conocidos por los expertos en la técnica: una técnica ilustrativa ha sido descrita por Hinnen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929, 1978, seleccionando transformantes Trp⁺ en un medio selectivo constituido por 0,67% de base nitrogenada de levadura, 0,5% de casaminoácidos, 2% de glucosa, 10 μ g/ml de adenina y 20 μ g/ml de uracilo. Las cepas hospedadoras transformadas por vectores que comprenden el promotor ADH2 pueden dejarse crecer para la expresión en un medio rico constituido por 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, y 1% de glucosa suplementado con 80 μ g/ml de adenina y 80 μ g/ml de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 ocurre después de agotamiento del medio glucosa. Los sobrenadantes de levadura brutos se recogen por filtración y se mantienen a 4°C antes de la purificación ulterior.

Diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto pueden emplearse para expresar la proteína recombinante. Sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto han sido revisados por Luckow y Summers, *BioTechnology* 6: 47 (1988). Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (*Cell* 23: 175, 1981), y otras líneas de células capaces de expresar un vector apropiado que incluyen, por ejemplo, las líneas de células

CV-1/EBNA (ATCC CRL10478), L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor e intensificador adecuado enlazado al gen a expresar, y otras secuencias 5' o 3' flanqueantes no transcritas, y secuencias 5' o 3' no traducidas, tales como los sitios de fijación de ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de remodelación, y secuencias de terminación de la transcripción.

Purificación de RANKL recombinante

RANKL purificada, y homólogos o análogos de la misma se preparan por cultivo de sistemas hospedador/vector adecuados para expresar los productos de traducción recombinantes de los DNAs de la presente invención, que se purifican luego a partir de los medios de cultivo o extractos de células. Por ejemplo, los sobrenadantes de sistemas que secretan proteína recombinante en el medio de cultivo pueden concentrarse primeramente utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

Después del paso de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender una molécula de proteína o de lectina o anticuerpo de contraestructura unida a un soporte adecuado. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio de anión, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en purificación de proteínas. Alternativamente, puede emplearse un paso de intercambio de catión. Cambiadores de catión adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo. La cromatografía de filtración con gel proporciona también un medio de purificación de las proteínas de la invención.

La cromatografía de afinidad es un método particularmente preferido de purificación de RANKL y homólogos de la misma. Por ejemplo, una RANKL expresada como proteína de fusión que comprende una región de inmunoglobulina Fc puede purificarse utilizando cromatografía de afinidad con proteína A o proteína G. Además, una proteína RANKL que comprende un dominio de oligomerización de cremallera puede purificarse en una resina que comprende un anticuerpo específico para el dominio de oligomerización de cremallera. Anticuerpos monoclonales contra la proteína RANKL pueden ser útiles también en purificación por cromatografía de afinidad, utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. Puede utilizarse también un ligando para preparar una matriz de afinidad para purificación de RANKL por afinidad.

Finalmente, pueden emplearse uno o más pasos de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios RP-HPCL hidrófobos, v.g., gel de sílice que tiene grupos colgantes metilo u otros grupos alifáticos, para purificar ulteriormente una composición de RANKL. Algunos o la totalidad de los pasos de purificación que anteceden, en diversas combinaciones, pueden emplearse también para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano se aísla usualmente por extracción inicial a partir de pelets de células, seguida por uno o más pasos de concentración, salificación, e intercambio acuoso de iones o cromatografía de exclusión de tamaños. Finalmente, puede emplearse cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para los pasos de purificación finales. Las células microbianas empleadas en la expresión de proteína recombinante pueden someterse a disrupción por cualquier método conveniente, con inclusión de sometimiento a ciclos congelación-descongelación, tratamiento por ultrasonidos, disrupción mecánica, o uso de agentes de lisis celular.

La fermentación de levaduras que expresan la proteína de la invención como una proteína secretada simplifica notablemente la purificación. La proteína recombinante secretada que resulta de una fermentación en gran escala puede purificarse por métodos análogos a los descritos por Urdal *et al.* (*J. Chromatog.* 296: 171, 1984). Esta referencia describe dos pasos HPLC secuenciales de fase inversa para purificación de GM-CSF humano recombinante en una columna HPLC preparativa.

La proteína sintetizada en cultivo recombinante se caracteriza por la presencia de componentes celulares, con inclusión de proteínas, en cantidades y de un carácter que dependen de los pasos de purificación realizados para recuperar la proteína de la invención a partir del cultivo. Estos componentes serán ordinariamente de origen levadura, procariota o eucariota superior no humano, y preferiblemente están presentes en cantidades contaminantes inocuas, del orden de menos de aproximadamente 1 por ciento en peso. Adicionalmente, el cultivo de células recombinantes permite la producción de las proteínas de la invención exentas de otras proteínas que pueden estar asociadas normalmente con las proteínas cuando se encuentran en la naturaleza en las especies de origen.

Usos y Administración de las Composiciones RANKL

La presente invención proporciona métodos de utilización de composiciones terapéuticas que comprenden una cantidad eficaz de una proteína y un diluyente y vehículo adecuado, y métodos para regulación de una respuesta inmunológica o inflamatoria. Se contempla también el uso de RANKL en asociación con receptores de citoquinas o citoquinas solubles, u otras moléculas inmunorreguladoras.

Para uso terapéutico, la proteína purificada se administra a un paciente, preferiblemente un humano, para tratamiento de una manera apropiada para la indicación. Así, por ejemplo, composiciones de proteína RANKL administradas para regular la función inmunitaria pueden administrarse por inyección de bolus, infusión continua, liberación sostenida desde implantes, u otra técnica adecuada. Típicamente, un agente terapéutico se administrará en la forma de una composición que comprende RANKL purificada, en asociación con vehículos, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Tales vehículos serán no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas.

Ordinariamente, la preparación de tales composiciones proteínicas implica combinación de la proteína de la invención con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de peso molecular bajo (menor que aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos con inclusión de glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizadores y excipientes. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con seroalbúmina coespecífica son diluyentes ilustrativos apropiados. Preferiblemente, el producto se formula como un liofilizado utilizando soluciones excipientes apropiadas (v.g., sacarosa) como diluyentes. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse en pruebas. La cantidad y frecuencia de administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y gravedad de la indicación de que se trate, la respuesta deseada, el estado del paciente, etcétera.

Como se muestra en esta memoria, RANKL tiene efectos beneficiosos sobre diversas células importantes en el sistema inmunitario. De acuerdo con ello, RANKL puede administrarse a un individuo como un adyuvante de vacuna, o como un agente terapéutico para regular en el sentido creciente una respuesta inmunológica, por ejemplo, una enfermedad infecciosa. Además, se ha encontrado que NF- κ B juega un papel protector en la prevención de la muerte apoptótica de las células inducida por TNF- α o quimioterapia. De acuerdo con ello, los agonistas de RANK (es decir, RANKL y anticuerpos agonistas) serán útiles en la protección de las células que expresan RANK contra los efectos negativos de la quimioterapia o la presencia de niveles altos de TNF- α tal como sucede en la sepsis (v.g., a saber, Barinaga, *Science* 274: 724, 1996, y los artículos de Beg y Baltimore y Wang *et al.*, páginas 782 y 784 del mismo ejemplar de *Science*).

Los ejemplos que siguen se ofrecen a modo de ilustración, y no con carácter de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden hacerse variaciones de la invención materializada en los ejemplos, especialmente a la vista de la doctrina de las diversas referencias citadas en esta memoria, cuyas descripciones se incorporan por referencia.

Ejemplo 1

El ejemplo describe la identificación y el aislamiento de un DNA codificante de un nuevo miembro de la superfamilia de receptores TNF. Una inserción de cDNA parcial con un marco de lectura abierto predicho que tiene cierta semejanza con CD40 (un antígeno de la superficie celular presente en la superficie de las células B humanas tanto normales como neoplásticas, que se ha demostrado juega un papel importante en la proliferación y diferenciación de las células B; Stamenkovic *et al.*, *EMBO J.* 8: 1403, 1989), se identificó en una base de datos que contenía información de secuencias de cDNAs generados por células dendríticas (DC) derivadas de médula ósea humana. La inserción se separó del vector por digestión con endonucleasas de restricción, se purificó en gel, se marcó con ^{32} P, y se utilizó para hibridación a transferencias de colonias generadas a partir de una genoteca de cDNA de DC que contenía inserciones mayores de cDNA utilizando técnicas de hibridación y lavado de alta severidad (hibridación en 5 x SSC, 50% de formamida a 42°C durante una noche, lavado en 0,5 x SSC a 63°C); otras condiciones adecuadas de alta severidad se describen en Sambrook *et al.* en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 1989), 9,52-9,55. Los experimentos iniciales produjeron un clon al que se hizo referencia como 9D-8A (SEQ ID NO: 1); el análisis subsiguiente indicó que este clon contenía la totalidad excepto el extremo 5' de un cDNA nuevo, con secuencia de intrones predicha en el extremo 5' final (nucleótidos 1-92 de SEQ ID NO: 1). Se realizaron hibridaciones de colonias adicionales, y se aisló un segundo clon. El segundo clon, al que se hizo referencia como 9D-15C (SEQ ID NO: 3), contenía el extremo 5' sin interrupción de intrones, pero no el extremo 3' entero. SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de una proteína de longitud total basada en la alineación de las secuencias solapantes de SEQ ID NOS. 1 y 3.

La proteína codificada se designó RANK, para activador del receptor de NF- κ B. El cDNA codifica una proteína transmembranal predicha de Tipo 1 que tiene 616 residuos de aminoácidos, con una secuencia de señal predicha de 24 aminoácidos (el sitio de escisión predicho por el ordenador se encuentra detrás de Leu24), un dominio extracelular de 118 aminoácidos, un dominio transmembranal de 21 aminoácidos, y una cola citoplásmica de 383 aminoácidos. La región extracelular de RANK exhibía una homología de aminoácidos importante (38,5% de identidad, 52,3% de semejanza) a CD40. Un vector de clonación (pBluescript SK⁻) que contenía la secuencia RANK humana, designada pBluescript:huRANK (en *E. coli* DH10B), se depositó en la American Type Culture Collection, Rockville, MD (ATCC) el 20 de febrero de 1996, bajo los términos del Tratado de Budapest, y ha recibido el número de acceso 98285.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe la realización de una construcción de DNA de RANK para expresar una proteína de fusión RANK/Fc. Se construyó una forma soluble de RANK fusionada a la región Fc de IgG₁ humana en el vector de expresión de mamífero pDC409 (U.S. Pat. 5,711,579). Este vector de expresión codifica la secuencia conductora del marco de lectura abierto del citomegalovirus (CMV) R27080 (SEQ ID NO: 9), seguido por los aminoácidos 33-213 de RANK, seguido por una forma mutada del dominio constante de IgG₁ humana, que exhibe afinidad reducida para los receptores Fc (SEQ ID NO: 8; para la proteína de fusión, la porción Fc de la construcción consistía en Arg3 hasta Lys232). Se preparó también un vector de expresión alternativo que abarca los aminoácidos 1-213 de RANK (utilizando la secuencia conductora nativa) seguido por la mutación IgG₁. Se encontró que ambos vectores de expresión inducían niveles altos de expresión de la proteína de fusión RANK/Fc en las células transfectadas.

Para obtener la proteína RANK/Fc, se transfecta un plásmido de expresión RANK/Fc en células CV-1/EBNA, y se recogen los sobrenadantes durante aproximadamente 1 semana. La proteína de fusión RANK/Fc se purifica por medios bien conocidos en la técnica para purificación de las proteínas de fusión Fc, por ejemplo, por cromatografía en columna de Sepharose con proteína A, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (a saber, Pharmacia, Uppsala, Suecia). La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida indicaba que la proteína RANK/Fc purificada migraba con un peso molecular de ~55 kDa en presencia de un agente reductor, y con un peso molecular de ~110 kDa en ausencia de un compuesto reductor.

La secuenciación del aminoácido N-terminal de la proteína purificada producida utilizando el conductor R27080 de CMV demostró un 60% de escisión después de Ala20, 20% de escisión después de Pro22 y 20% de escisión después de Arg28 (que es el sitio de escisión de Furina; los residuos de aminoácidos se refieren a SEQ ID NO: 9); el análisis de aminoácidos N-terminal de la proteína de fusión expresada con el conductor nativo demostró escisión predominantemente después de Gln25 (80% después de Gln25 y 20% después de Arg23; los residuos de aminoácidos hacen referencia a SEQ ID NO: 6, RANK de longitud total). Ambas proteínas de fusión eran capaces de fijarse a un ligando para RANK de manera específica (a saber, se fijaban a la superficie de diversas líneas de células tales como una línea de células de timoma de murino, EL4), lo que indicaba que la presencia de aminoácidos adicionales en el término N de RANK no interfiere con su aptitud para fijarse a RANKL. Además, la construcción que comprendía el conductor de CMV codificaba RANK que comenzaba en el aminoácido 33; así pues, se espera que un péptido de RANK que tenga un término N en un aminoácido comprendido entre Arg23 y Pro33, inclusive, sea capaz de fijarse a un ligando para RANK de manera específica.

Otros miembros de la superfamilia de receptores TNF tienen una región de aminoácidos entre el dominio transmembranal y el dominio de fijación de ligandos al que se hace referencia como región "espaciadora", que no es necesaria para la fijación de ligandos. En RANK, los aminoácidos comprendidos entre 196 y 213 se predice que forman una región espaciadora de este tipo. De acuerdo con ello, se espera que una forma soluble de RANK que termina con un aminoácido en esta región retenga la capacidad para fijarse a un ligando para RANK de una manera específica. Los aminoácidos C-terminales preferidos para péptidos RANK solubles se seleccionan del grupo constituido por los aminoácidos 213 y 196 de SEQ ID NO: 6, aunque pueden utilizarse como término C otros aminoácidos comprendidos en la región espaciadora.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales contra RANK. Preparaciones de RANK recombinante purificada, por ejemplo, o células transfectadas que expresaban niveles altos de RANK, se emplean para generar anticuerpos monoclonales contra RANK utilizando técnicas convencionales, tales como las descritas en la Patente U.S. 4,411,993. Puede utilizarse también como inmunógeno DNA que codifica RANK, por ejemplo, como ha sido revisado por Pardoll y Beckerleg en *Immunity* 3: 165, 1995. Tales anticuerpos serán probablemente útiles en la interferencia con la señalización inducida por RANK (anticuerpos antagonistas o bloqueantes) o en la inducción de una señal por reticulación de RANK (anticuerpos agonistas, como componentes de ensayos de diagnóstico o de investigación para RANK o actividad de RANK, o en purificación de RANK por afinidad).

Para inmunizar roedores, se emulsiona un inmunógeno RANK en un adyuvante (tal como adyuvante de Freund completo o incompleto, alumbre, u otro adyuvante, tal como el adyuvante R700 de Ribí (Ribí, Hamilton, MT), y se inyecta en cantidades que van desde 10 a 100 µg subcutáneamente en un roedor seleccionado, por ejemplo ratones Balb/c o ratas Lewis. El DNA puede administrarse intradérmicamente (Raz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9519, 1994) o por vía intramuscular (Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4156, 1993); se ha encontrado que la solución salina es un diluyente adecuado para antígenos basados en DNA. De 10 días a 3 semanas más tarde, los ratones inmunizados se refuerzan con inmunógeno adicional y se refuerzan después periódicamente de acuerdo con un programa de inmunización semanal, bisemanal o cada tercera semana.

Se toman periódicamente muestras de suero por sangría retro-orbital o escisión en el extremo de la cola para sometimiento a test por ensayo de transferencia de puntos (sándwich de anticuerpos), ELISA (ensayo de inmunosorbente unido a enzima), inmunoprecipitación, u otros ensayos adecuados, con inclusión del análisis FACS. Después de la detección de un título de anticuerpos apropiado, los animales positivos reciben una inyección intravenosa de antígeno en solución salina. Tres a cuatro días después, se sacrifican los animales, se recogen los esplenocitos, y se fusionan a

una línea de células de mieloma murina (v.g., NS1 o preferiblemente Ag 8.653 [ATCC CRL1580]). Las líneas de células de hibridoma generadas por este procedimiento se extienden en placas de microtitulación múltiples en un medio selectivo (por ejemplo, uno que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina, o HAT) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, híbridos mieloma-mieloma, e híbridos esplenocito-esplenocito.

Los clones de hibridoma así generados pueden someterse a cribado por ELISA respecto a reactividad con RANK, por ejemplo, por adaptaciones de las técnicas descritas por Engvall *et al.* *Immunochem.* 8: 871 (1971) y en la Patente U.S. 4.703.004. Una técnica de cribado preferida es la técnica de captura de anticuerpos descrita por Beckman *et al.*, *J. Immunol.* 144: 4212 (1990). Los clones positivos se inyectan luego en las cavidades peritoneales de roedores singénicos para producir ascitis que contiene concentraciones elevadas (>1 mg/ml) del anticuerpo monoclonal anti-RANK. El anticuerpo monoclonal resultante puede purificarse por precipitación con sulfato de amonio seguida por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede utilizarse también cromatografía de afinidad basada en la fijación del anticuerpo a proteína A o proteína G, al igual que cromatografía de afinidad basada en fijación a la proteína RANK.

Se generaron anticuerpos monoclonales utilizando la proteína de fusión RANK-Fc como inmunógeno. Estos reactivos se sometieron a cribado para confirmar la reactividad contra la proteína RANK. Utilizando los métodos descritos en esta memoria para monitorizar la actividad de los mAbs, se aislaron tanto bloqueantes (es decir, anticuerpos que se fijan a RANK e inhiben la fijación de un ligando a RANK) como no bloqueantes (es decir, anticuerpos que se fijan a RANK y no inhiben la fijación de ligando).

Ejemplo 4

Este ejemplo ilustra la inducción de la actividad de NF- κ B por RANK en células 296/EBNA (la línea de células se derivó por transfección de la línea de células 293 con un gen que codificaba el antígeno-1 nuclear del virus Epstein-Barr (EBNA-1) que expresan constitutivamente EBNA-1 impulsado por el intensificador/promotor inmediato-precoz de CMV humano). La activación de la actividad de NF- κ B se midió en las células 293/EBNA esencialmente como ha sido descrito por Yao *et al.*, (*Immunity* 3: 811, 1995). Se prepararon extractos nucleares y se analizaron respecto a la actividad de NF- κ B por un ensayo de retardación en gel utilizando un oligonucleótido de 25 pares de bases que abarcaba los sitios de fijación de NF- κ B. Se sembraron dos millones de células en cápsulas de 10 cm dos días antes de la transfección del DNA y se cultivaron en medio DMEM-F12 que contenía 2,5% de FBS (suero bovino fetal). Las transfecciones de DNA se realizaron como se describe en esta memoria para los ensayos del promotor/informador IL-8.

Se prepararon extractos nucleares por solubilización de núcleos aislados con NaCl 400 mM (Yao *et al.*, *supra*). Los oligonucleótidos que contenían un sitio de fijación de NF- κ B se reasociaron y marcaron terminalmente con ^{32} P utilizando polinucleótido-quinasa de DNA T4. Las reacciones de desplazamiento de movilidad contenían 10 μ g de extracto nuclear, 4 mg de poli(dI-dC) y 15.000 cpm de oligonucleótido bicatenario marcado y se incubaron a la temperatura ambiente durante 20 minutos. Los complejos proteína-DNA resultantes se resolvieron en un gel de poliacrilamida nativo al 6% en tampón 0,25 X Tris-borato-EDTA.

La sobreexpresión de RANK dio como resultado la inducción de la actividad de NF- κ B como se muestra por un desplazamiento apropiado en la movilidad de la sonda reactiva en el gel. Se observaron resultados similares cuando se excitó RANK por un ligando que fija y traduce una señal a las células que expresan el receptor (es decir, por co-transfección de células con DNA de RANK humano y RANKL murino; véase el Ejemplo 7 más adelante), y sería de esperar que ocurriera cuando la excitación se realiza con anticuerpos agonistas.

Ejemplo 5

Este ejemplo describe un sistema génico promotor/informador basado en el promotor humano de Interleuquina-8 (IL-8) utilizado para analizar la activación de la transcripción génica *in vivo*. Se sabe que la inducción de la transcripción del gen de IL-8 humano por las citoquinas Interleuquina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) depende de sitios de fijación de los factores de transcripción NF- κ B y NF-IL-6 intactos. La fusión del promotor con un cDNA que codifica el receptor IL-4 murino (mIL-4R) permite la medida de la activación del promotor por detección de la proteína informadora heteróloga (mIL-4R) en la superficie celular de las células transfectadas.

Se transfectan células epiteliales de riñón humano (293/EBNA) (por el método de DEAE/DEXTRANO) con plásmidos que codifican: 1) la construcción informador/promotor (a la que se hace referencia como pIL-8rep), y 2) el o los cDNAs de interés. Las concentraciones de DNA se mantienen siempre constantes por la adición de DNA de vector vacío. Las células 293/EBNA se extienden en placas a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/ml (3 ml/pocillo) en una placa de 6 pocillos y se incuban durante 2 días antes de la transfección. Dos días después de la transfección, se detecta el receptor mIL-4 por un radioinmunoensayo (RIA) descrito más adelante.

En un experimento de este tipo, las células 293/EBNA se co-transfectaron con DNA codificante de RANK y con DNA codificante de RANKL (véase el Ejemplo 7 más adelante). La co-expresión de este receptor y su contraestructura por las células da como resultado la activación del proceso de señalización de RANK. Para tales estudios de co-

transfección, la concentración de DNA/pocillo para la transcripción de DEAE era como sigue: 40 ng de pIL-8rep (pBluescript SK-vector (Stratagene)); 0,4 ng de CD40 (cDNA codificante de CD40, un receptor de control; vector pCDM8); 0,4 ng de RANK (DNA codificante de RANK; vector pDC409), y o bien 1-50 ng de CD40L (DNA que codifica el ligando para CD40, que actúa como control positivo cuando se somete a co-transfección con CD40 y como control negativo cuando se somete a co-transfección con RANK; en pDC304) o RANKL (DNA codificante de un ligando para RANK; en pDC406). Pueden realizarse experimentos similares utilizando RANKL soluble o anticuerpos agonistas para RANK a fin de excitar las células transfectadas con RANK.

Para el RIA específico de mIL-4R, se marca un anticuerpo monoclonal reactivo con mIL-4R con ^{125}I por un método de conjugación con cloramina T; la actividad específica resultante es típicamente $1,5 \times 10^{16}$ cpm/nmol. Después de 48 horas, las células transfectadas se lavan una sola vez con medio (DMEM/F12, 5% FBS). Los sitios de fijación inespecífica se bloquean por la adición de medio de fijación precalentado que contiene 5% de leche desnatada seca e incubación a $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ en una incubadora de cultivo de tejidos durante 1 hora. Se decanta el medio de bloqueo y se añade a las células tampón de fijación que contiene ^{125}I anti-mIL-4R (clon M1; IgG1 de rata) y se incuba con sacudidas a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación de las células con el anticuerpo radiomarcado, se lavan concienzudamente las células con tampón de fijación (2X) y dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se someten a lisis en 1 ml de NaOH 0,5M, y se mide la radiactividad total con un contador gamma.

Utilizando este ensayo, las células 293/EBNA co-transfectadas con DNAs que codificaban RANK demostraron activación transcripcional, como se muestra por la detección de mIL-4R en la superficie celular. La sobreexpresión de RANK dio como resultado la transcripción de mIL-4R, como lo hizo la excitación de RANK por RANKL. Se observaron resultados similares cuando se excita RANK por anticuerpos agonistas.

Ejemplo 6

Este ejemplo ilustra la asociación de RANK con proteínas TRAF. La interacción de RANK con proteínas citoplásmicas TRAF se demostró por ensayos de co-inmunoprecipitación esencialmente como ha sido descrito por Hsu *et al.* (*Cell* 84: 299; 1996). Resumidamente, se co-transfectaron células 293/EBNA con plásmidos que dirigen la síntesis de RANK y TRAF2 (FLAG[®]; SEQ ID NO: 7) marcado con epítipo, o TRAF3. Dos días después de la transfección, se marcaron las proteínas de la superficie con éster de biotina, y se lisaron las células en un tampón que contenía 0,5% de NP-40. RANK y las proteínas asociadas con este receptor se inmunoprecipitaron con anti-RANK, se lavaron concienzudamente, se resolvieron por separación electroforética en un gel de SDS-poliacrilamida al 6-10% y se transfirieron por electroforesis a una membrana de nitrocelulosa para transferencia Western. La asociación de las proteínas TRAF2 y TRAF3 con RANK se visualizó por sondeo de la membrana con un anticuerpo que reconoce específicamente el epítipo FLAG[®]. TRAFs 2 y 3 no producían inmunoprecipitado con anti-RANK en ausencia de la expresión de RANK.

Ejemplo 7

Este ejemplo describe el aislamiento de un ligando para RANK, al que se hace referencia como RANKL, por clonación de la expresión directa. El ligando se clonó esencialmente como se describe en USSN 08/249.189, presentado el 24 de mayo de 1994 (cuya descripción relevante se incorpora por referencia en esta memoria, para CD40L). Resumidamente, se preparó una genoteca a partir de un clon de una línea de células de timoma de ratón EL-4 (ATCC TIB 39), denominada EL-40.5, derivada por clasificación 5 veces con la proteína de fusión CD40/Fc biotinilada en un FACS (clasificador de células activado por fluorescencia). La genoteca de cDNA se preparó utilizando metodología estándar: el DNA plasmídico se aisló y se transfectó en células CV1-EBNA sub-confluentes utilizando un método de DEAE-dextrano. Se cribaron los transfectantes por autorradiografía de diapositivas en cuanto a la expresión de RANKL utilizando un método de fijación en dos pasos con proteína de fusión RANK/Fc como la preparada en el Ejemplo 2, seguido por anticuerpo anti-IgG humana de cabra radioyodado.

Se aisló y se secuenció un clon que codificaba una proteína que fijaba específicamente RANK; el clon se designó 11H. Un vector de expresión que contenía la secuencia RANKL murina, designado pDC406: muRANK-L (en *E. coli* DH10B), se depositó en la American Type Culture Collection, Rockville, MD (ATCC) el 20 de diciembre de 1996, de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, y recibió el número de acceso 98284. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos predicha de este clon se ilustran en SEQ ID NO: 10. Este clon no contenía una metionina iniciadora; se obtuvieron clones de longitud total adicionales a partir de una genoteca 7B9 (preparada sustancialmente como se describe en la Patente U.S. 5.599.905, expedida el 4 de febrero de 1997); se encontró que la región 5' era idéntica a la de RANKL humana como se muestra en SEQ ID no: 12, aminoácidos 1 a 22, excepto por la sustitución de un Gly en lugar de un Thr en el residuo 9.

Este ligando es útil para evaluar la capacidad de RANK para fijarse a RANKL por numerosos ensayos diferentes. Por ejemplo, pueden utilizarse células transfectadas que expresan RANKL en un ensayo FACS (o un ensayo similar) para evaluar la capacidad de RANK soluble en la fijación de RANKL. Además, pueden prepararse formas solubles de RANKL y utilizarse en ensayos que son conocidos en la técnica (a saber, los ensayos ELISA o BIAcore esencialmente como se describe en el documento USSN 08/249.189, presentado el 24 de mayo de 1994). RANKL es útil también en

la purificación de RANK por afinidad, y como reactivo en métodos para medir los niveles de RANK en una muestra. RANKL soluble es útil también en la inducción de la activación de NF- κ B y por tanto en la protección de las células que expresan RANK contra la apoptosis.

Ejemplo 8

Este ejemplo describe el aislamiento de un ligando humano de RANK (RANKL) utilizando una técnica basada en PCR. Se utilizaron iniciadores oligonucleotídicos específicos del ligando murino de RANK en reacciones PCR que utilizaban como moldes cDNAs de la primera cadena derivados de una línea de células humana. Los iniciadores correspondían a los nucleótidos 478-497 y al complemento de los nucleótidos 858-878 del ligando RANK murino (SEQ ID NO: 10). Una banda amplificada de aproximadamente 800 pb de longitud procedente de una reacción que utilizaba la línea de células epidermoides humanas KB (ATCC CCL-17) se purificó en gel, y se determinó su secuencia de nucleótidos; la secuencia tenía un 85% de identidad con la región correspondiente del ligando RANK murino, confirmando que el fragmento procedía de RANKL humana.

Para obtener cDNAs de RANKL humana de longitud total, se radiomarcaron dos oligonucleótidos específicos de RANKL humana derivados de la secuencia de nucleótidos del producto PCR KB, y se utilizaron como sondas de hibridación para cribar una genoteca de cDNA de PBL humano preparada en lambda gt10 (Stratagene, La Jolla, CA), sustancialmente como se describe en la Patente US 5.599.905, expedida el 4 de febrero de 1997. Se identificaron y purificaron varias placas de hibridación positivas, se subclonaron sus insertos en pBluescript SK⁻ (Stratagene, La Jolla, CA), y se determinó su secuencia de nucleótidos. Se encontró un aislado, PBL3 que codificaba la mayor parte de la RANKL humana predicha, pero se encontró que faltaban aproximadamente 200 pb de la región codificante 5'. Se encontró un segundo aislado, PDL5, que codificaba gran parte de la RANKL humana predicha, con inclusión del extremo 5' entero y 200 pb adicionales de secuencia 5' no traducida.

El extremo 5' de PBL5 y el extremo 3' de PBL3 se ligaron uno a otro para formar un cDNA de longitud total que codificaba RANKL humana. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos predichas del ligando RANK humano de longitud total se muestran en SEQ ID NO: 12. El ligando RANK humano comparte 83% de identidad de nucleótidos y 84% de identidad de aminoácidos con el ligando RANK murino. Un vector plasmídico que contenía la secuencia RANKL humana, designado pBluescript:huRANK-L (en *E. coli* DH10B), se depositó en la American Type Culture Collection, Rockville, MD (ATCC) el 11 de marzo de 1997 de acuerdo con los términos del Tratado de Budapest, y recibió el número de acceso 98354.

RANKL murina y humana son proteínas transmembranales de Tipo 2. RANKL murina contiene un dominio intracelular predicho de 48 aminoácidos, un dominio transmembranal de 21 aminoácidos y un dominio extracelular de 247 aminoácidos. RANKL humana contiene un dominio intracelular de 47 aminoácidos predicho, un dominio transmembranal de 21 aminoácidos y un dominio extracelular de 249 aminoácidos.

Ejemplo 9

Este ejemplo describe el mapeado cromosómico de RANK humana utilizando estrategias de mapeado basadas en PCR. Se realizaron las asignaciones cromosómicas humanas iniciales utilizando iniciadores PCR específicos de RANK y RANKL y un kit BIOS de DNA PCRable Híbrido de Células Somáticas procedente de Laboratories (New Haven, CT), siguiendo las instrucciones del fabricante. RANK mapeaba al cromosoma humano 18; el ligando de RANK mapeaba al cromosoma humano 13. Se analizó un mapeado más detallado utilizando un panel de mapeado híbrido de radiación Genebridge 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Huntsville, AL; descrito en Walter, MA *et al.*, *Nature Genetics* 7:22-28, 1994). Los datos procedentes de este análisis se sometieron luego electrónicamente al Mapeador Híbrido de Radiación MIT (URL: <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) siguiendo las instrucciones contenidas en dicho documento. Este análisis proporcionaba nombres de marcadores genéticos específicos que, cuando se sometieron electrónicamente al navegador NCBI Entrez (URL: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbinpost/Entrez/query?db=c&form=0>), proporcionaron las localizaciones específicas del mapa. RANK mapeaba al cromosoma 18q22.1, y RANKL mapeaba al cromosoma 13q14.

Ejemplo 10

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales contra RANKL. Se emplean preparaciones de RANKL purificado recombinante, por ejemplo, o células paralizadas que expresan niveles altos de RANKL, para generar anticuerpos monoclonales contra RANKL utilizando técnicas convencionales, tales como las descritas en la Patente US 4.411.993. DNA codificante de RANKL puede utilizarse también como inmunógeno, por ejemplo, como ha sido revisado por Pardoll y Beckerleg en *Immunity* 3:165, 1995. Tales anticuerpos serán probablemente útiles en interferencia con la señalización de RANKL (anticuerpos antagonistas o bloqueantes), como componentes de ensayos de diagnóstico o de investigación para RANKL o actividad de RANKL, o en purificación de RANKL por afinidad.

Para inmunizar roedores, se emulsiona el inmunógeno RANKL en un adyuvante (tal como adyuvante de Freund completo o incompleto, alumbre, u otro adyuvante, tal como el adyuvante Ribi R700 (Ribi, Hamilton, MT), y se

inyecta en cantidades comprendidas entre 10 y 100 μg subcutáneamente en un roedor seleccionado, por ejemplo, ratones BALB/c o ratas Lewis. Puede administrarse RNA intradérmicamente (Raz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9519, 1994) o por vía intramuscular (Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4156, 1993); se ha encontrado que la solución salina es un diluyente adecuado para antígenos basados en DNA. De 10 días a 3 semanas después, los ratones inmunizados se refuerzan con inmunógeno adicional y se refuerzan periódicamente después de ello de acuerdo con un protocolo de inmunización semanal, bisemanal o cada tercera semana.

Se toman periódicamente muestras de suero por hemorragia retro-orbital o escisión en el extremo de la cola para someter a test en cuanto al ensayo de transferencia de puntos (sándwich de anticuerpos), ELISA (ensayo de inmunosorbente unido a enzima), inmunoprecipitación, u otros ensayos adecuados, con inclusión de análisis FACS. A continuación de la detección de un título de anticuerpos apropiado, los animales positivos reciben una inyección intravenosa de antígeno en solución salina. Tres a cuatro días después, se sacrifican los animales, se recogen los esplenocitos, y se fusionan a una línea de células de mieloma murina (v.g., NS1 o preferiblemente Ag 8.653 [ATCC CRL 1580]). Las líneas de células de hibridoma generadas por este procedimiento se extienden en placas de microtitulación múltiples en un medio selectivo (por ejemplo, uno que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina, o HAT) para inhibir la purificación de las células no fusionadas, híbridos mieloma-mieloma, e híbridos esplenocito-esplenocito.

Los clones de hibridoma así generados pueden cribarse por ELISA respecto a reactividad con RANKL, por ejemplo, por adaptaciones de las técnicas descritas por Engvall *et al.*, *Immunochem.* 8:871 (1971) y en la Patente US 4.703.004. Una técnica de cribado preferida es la técnica de captura de anticuerpos descrita por Beckmam *et al.*, *J. Immunol.* 144:4212 (1990). Los clones positivos se inyectan luego en las cavidades peritoneales de roedores singénicos para producir ascitis que contiene concentraciones altas ($> 1 \text{ mg/ml}$) de anticuerpo monoclonal anti-RANK. El anticuerpo monoclonal resultante puede purificarse por precipitación con sulfato de amonio seguida por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede utilizarse también cromatografía de afinidad basada en la fijación del anticuerpo a proteína A o proteína G, al igual que la cromatografía de afinidad basada en la fijación a la proteína RANKL. Utilizando los métodos descritos en esta memoria para monitorizar la actividad de los mAbs, se aíslan anticuerpos tanto bloqueantes (es decir, anticuerpos que fijan RANKL e inhiben la fijación a RANK) como no bloqueantes (es decir, anticuerpos que fijan RANKL y no inhiben la fijación).

Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra que la expresión de RANK puede estar regulada en sentido creciente. Se purificaron células T de sangre periférica humana por clasificación mediante citometría de flujo o por selección negativa utilizando cuentas recubiertas de anticuerpo, y se activaron con placas recubiertas con anti-CD3 (OKT3, Dako) o fitohemaglutinina en presencia o ausencia de diversas citoquinas, con inclusión de interleuquina-4 (IL-4), Factor β del Crecimiento Transformante (TGF- β) y otras citoquinas disponibles comercialmente (IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- γ , TNF- α). La expresión de RANK se evaluó por FACS en un experimento de evolución temporal desde el día 2 al día 8, utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón mAb144 (preparado como se describe en el Ejemplo 3), como se muestra en la tabla siguiente. Los resultados se expresan como “+” a “++++” haciendo referencia al aumento relativo en la intensidad de tinción con anti-RANK. Se realizaron también experimento de doble marcación utilizando a la vez anticuerpos anti-RANK y anti-CD8 o anti-CD4.

TABLA 1

Regulación creciente de RANK por Citoquinas

Citoquina (concentración)	Resultados:
IL-4 (50 ng/ml)	+
TGF- β (5 ng/ml)	+ a ++
IL-4 (50 ng/ml) +TGF- β (5 ng/ml)	++++
IL1- α (10ng/ml)	-
IL-2 (20ng/ml)	-
IL-3 (25ng/ml)	-
IL-7 (20ng/ml)	-
IL-8 (10ng/ml)	-
IL-10 (50ng/ml)	-
IL-12 (10ng/ml)	-
IL-15 (10ng/ml)	-
IFN- γ (100U/ml)	-
TNF- α (10ng/ml)	-

De las citoquinas ensayadas, IL-4 y TGF- β aumentaban el nivel de expresión de RANK tanto en células CD8+ citotóxicas como en células DCD4+ adyuvantes, desde el día 4 al día 8. La combinación de IL-4 y TGF- β actuaba sinérgicamente para regular en sentido creciente la expresión de este receptor en las células T activadas. Esta combinación particular de citoquinas es secretada por las células T supresoras, y se cree que es importante en la generación de tolerancia (revisado en Mitchison y Sieper, *Z. Rheumatol.* 54:141, 1995), implicando la interacción de RANK en la regulación de una respuesta inmunológica frente a la tolerancia o la inducción de una respuesta inmunológica activa.

Ejemplo 12

Este ejemplo ilustra la influencia de RANK.Fc y hRANKL en el crecimiento de las células T activadas. La adición de TGF β a linfocitos T de sangre periférica humana activados con anti-CD3 induce parada de la proliferación y finalmente la muerte de la mayoría de los linfocitos dentro de los primeros pocos días de cultivo. Los autores de la invención ensayaron el efecto de las interacciones RANK:RANKL sobre las células T tratadas con TGF β por adición de RANK.Fc o RANKL soluble humana a cultivos de células T.

Se cultivaron células T de sangre periférica humana (7×10^5 PBT) durante 6 días en placas de 24 pocillos recubiertas con anti-CD3 (OKT3, 5 μ g/ml) y anti-Flag (M1, 5 μ g/ml) en presencia de TGF β (1 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml) con o sin hRANKL soluble recombinante marcada con FLAG (1 μ g/ml) o RANK.Fc (10 μ g/ml). La recuperación de células T viables se determinó por conteos triplicados con azul tripán.

La adición de RANK-Fc reducía significativamente el número de células T viables recuperadas al cabo de 6 días, mientras que RANKL aumentaba notablemente la recuperación de células T viables (Figura 1). Así pues, RANKL endógena o exógena aumenta el número de células T viables generadas en presencia de TGF β . TGF β , junto con IL-4 ha sido implicado en la regulación de la respuesta inmunológica cuando es secretado por el subconjunto T_H3/células reguladoras. Se cree que estas células T median la supresión circunstante de las células T efectoras. De acuerdo con ello, RANK y su ligando pueden actuar de una manera auto/paracrina para influir en la tolerancia a las células T. además, se sabe que TGF β juega un papel en la evasión del sistema inmunitario efectuada por ciertos organismos patógenos u oportunistas. Además de jugar un papel en el desarrollo de la tolerancia, RANK puede jugar también un papel en la evasión del sistema inmunitario por los patógenos.

Ejemplo 13

Este ejemplo ilustra la influencia de la interacción de RANK en las células dendríticas CD1a⁺ (DC). Se generaron células dendríticas (CD) funcionalmente maduras *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea (BM) CD34+. De modo resumido, células BM humanas procedentes de individuos voluntarios sanos normales se fraccionaron por densidad utilizando medio Ficoll y se aislaron por inmunoafinidad células CD34+ utilizando una columna matriz anti-CD34 (Ceptrate, CellPro). Las células BM CD34+ se cultivaron luego en GM-CSF humano (20 ng/ml), IL-4 humana (20 ng/ml), TNF- α humano (20 ng/ml), Flt3L humana derivada de CHO (FL; 100 ng/ml) en medio Super McCoy's suplementado con 10% de suero de ternero fetal en una incubadora totalmente humidificada a 37°C (5% de CO₂) durante 14 días. Se clasificaron luego DC CD1a⁺ y HLA-DR⁺ utilizando un equipo FACStar PlusTM, y se utilizaron para la evaluación biológica de RANK.

En DC CD1a⁺ humanas derivadas de células de la médula ósea CD34+, únicamente un subconjunto (20-30%) de CD1a⁺ DC expresaban RANK en la superficie celular como se evaluó por análisis citométrico de flujo. Sin embargo, la adición de CD40L a los cultivos de DC dio como resultado la expresión de RANK en la superficie de la mayoría de DC CD1a⁺. Se ha demostrado que CD40L activa DC por intensificación de la formación de aglomerados *in vitro*, inducción de cambios morfológicos en DC y regulación creciente de la expresión de HLA-DR, CD54, CD58, CD80 y CD86.

La adición de RANKL a los cultivos de DC aumentaba significativamente el grado de agregación de DC y la formación de aglomerados con respecto a los cultivos de control, análogamente a los efectos observados con CD40L (Figura 2). Se cultivaron DC CD1a⁺ humanas clasificadas en un cóctel de citoquinas (GM-CSF, IL-4, TNF- α y FL) (panel superior izquierdo), en cóctel más CD40L (1 μ g/ml) (superior derecho), en cóctel más RANKL (1 μ g/ml) (inferior izquierdo), o en cóctel más RANKL desactivada por calentamiento (Δ H) (1 μ g/ml) (inferior derecho) en placas de cultivo de 24 pocillos con fondo plano en 1 ml de medio de cultivo durante 48-72 horas y se fotografiaron luego utilizando un microscopio de inversión. Un aumento en la agregación de DC y la formación de aglomerados por encima de los cultivos de control no era evidente cuando se utilizó RANKL desactivada por calentamiento, lo que indicaba que este efecto era dependiente de la proteína biológicamente activa. Sin embargo, el análisis fenotípico inicial de la expresión de las moléculas de adhesión indicaba que la aglomeración inducida por RANKL no se debía a niveles incrementados de CD2, CD11a, CD54 o CD58.

La adición de RANKL a DC CD1a⁺ aumentaba su capacidad alo-estimuladora en una reacción de linfocitos mixtos (MLR) al menos de 3 a 18 veces, comparable a DC cultivadas con CD40L (Figura 3). Se incubaron células T alogénicas (1×10^5) con números variables de DC irradiadas (2000 rad) cultivadas como se ha indicado arriba para la Figura 2 en cápsulas de cultivo de 96 pocillos con fondo redondo en 0,2 ml de medio de cultivo durante 4 días. Los cultivos se pulsaron con 0,5 mCi de [³H]-timidina durante 8 horas y las células se recogieron sobre hojas de fibra de vidrio para conteo en un contador β de fase gaseosa. Los conteos de ruido de fondo para las células T o DC cultivadas solas eran <

100 cpm. Los valores representan la media $\pm$ la desviación estándar (SD) de cultivos triplicados. RANKL desactivada por calentamiento no tenía efecto alguno. La actividad alo-estimuladora de DC no aumentaba tampoco cuando se utilizaron RANKL y CD40L en combinación, debido posiblemente a que la capacidad funcional de DC había alcanzado un nivel máximo con cualquiera de las citoquinas sola. Ni RANKL y CD40L intensificaban el crecimiento *in vitro* de DC a lo largo del periodo de cultivo de 3 días. Al contrario que CD40L, RANKL no aumentaba significativamente los niveles de expresión de HLA-DR ni la expresión de CD80 o CD86.

RANKL puede aumentar la formación de aglomerados de DC y la capacidad funcional sin modular moléculas conocidas implicadas en la adhesión celular (CD18, CD54), presentación de antígeno (HLA-DR) o coestimulación (CD86), todas las cuales están reguladas por señalización mediante CD40/CD40L. La carencia de un efecto sobre la expresión de estas moléculas sugiere que RANKL puede regular la función de DC por uno o más caminos alternativos distintos de CD40/CD40L. Dado que CD40L regula la expresión superficial de RANK o DC generada *in vitro*, y que CD40L está regulado en el sentido creciente en las células T activadas durante las interacciones celulares DC-T, RANK y su ligando pueden formar una parte importante de la cascada de activación que se induce durante la expansión de las células T mediada por DC. Adicionalmente, el cultivo de DC en RANKL da como resultado niveles reducidos de la expresión de CD1b/c, y niveles incrementados de CD83. Estas dos moléculas están moduladas análogamente durante la maduración de DC por CD40L (Caux *et al. J. Exp. Med.* 180:1263; 1994), indicando que RANKL induce la maduración de DC.

Se hace referencia a las células dendríticas como células presentadoras de antígeno “profesionales”, y tienen una alta capacidad para sensibilizar las células T restringidas por el MHC. Existe un interés creciente en la utilización de células dendríticas *ex vivo* como adyuvantes de vacunas para enfermedades tumorales o infecciosas (véase, por ejemplo, Romani, *et al., J. Exp. Med.*, 180:83, 1994). Por consiguiente, un agente tal como RANKL que induce la maduración de DC e intensifica la capacidad de las células dendríticas para estimular una respuesta inmunológica será probablemente útil en inmunoterapia de diversas enfermedades.

Ejemplo 14

Este ejemplo describe el aislamiento del homólogo murino de RANK, al que se hace referencia como muRANK. Se aisló muRANK por una combinación de PCR de especies cruzadas e hibridación de colonias. La conservación de los residuos Cys en las pseudorrepeticiones ricas en Cys de los dominios extracelulares de las proteínas miembros de la superfamilia TNFR se aprovechó para diseñar iniciadores PCR basados en RANK humana a utilizar en cDNAs murinos de la primera cadena procedentes de diversas fuentes. Tanto el iniciador de sentido aguas arriba como el iniciador antisentido aguas abajo se diseñaron de modo que tuvieran sus extremos 3' terminados con residuos Cys.

El iniciador de sentido aguas arriba codificaba los nucleótidos 272-295 de SEQ ID NO: 5 (región codificante de los aminoácidos 79-86); el iniciador antisentido aguas abajo codificaba el complemento de los nucleótidos 409-427 (región codificante de los aminoácidos 124-130). Se establecieron reacciones PCR estándar y se ejecutaron utilizando estos iniciadores y cDNAs de la primera cadena procedentes de diversas líneas de células murinas o fuentes de tejidos. Se realizaron 30 ciclos de reacción de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, y 72°C durante 20 segundos. Los productos PCR se analizaron por electroforesis, y se observaron bandas específicas en varias muestras. La banda procedente de una muestra se purificó en gel y la secuenciación del DNA reveló que la secuencia entre los iniciadores era idéntica aproximadamente en un 85% a la secuencia de nucleótidos de RANK humana correspondiente.

Una genoteca de cDNA basada en plásmidos preparada a partir de la línea de epitelio hepático fetal murina FLE18 (una de las líneas de células identificada como positiva en el cribado por PCR) se cribó respecto a cDNAs de RANK de longitud total utilizando sondas oligonucleotídicas específicas de RANK murina derivadas de la secuencia RANK murina determinada por secuenciación del producto PCR. Dos cDNAs, uno de los cuales codificaba el extremo 5', en tanto que el otro codificaba el extremo 3' de RANK murina de longitud total (basado en la comparación de secuencias con el RANK humano de longitud total) se recombinaron para generar un cDNA de RANK murina de longitud total. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de muRANK se muestran en SEQ ID Núms.: 14 y 15.

El cDNA codifica una proteína transmembranal predicha de Tipo 1 que tiene 625 residuos de aminoácidos, con una secuencia señal predicha de 30 aminoácidos, un dominio extracelular de 184 aminoácidos, un dominio extramembranal de 21 aminoácidos, y una cola citoplásmica de 390 aminoácidos. La región extracelular de muRANK exhibía una homología significativa de aminoácidos (69,7% de identidad, 80,8% de semejanza) con huRANK. Las personas con experiencia en la técnica reconocerán que el sitio de escisión real puede ser diferente del predicho por ordenador; de acuerdo con ello, el terminal N de RANK puede estar comprendido entre el aminoácido 25 y el aminoácido 35.

Otros miembros de la superfamilia de receptores TNF tienen una región de aminoácidos entre el dominio transmembranal y el dominio de fijación de ligando al que se hace referencia como región “espaciadora”, que no es necesaria para la fijación de ligandos. En muRANK, se predice que los aminoácidos comprendidos entre 197 y 214 forman una región espaciadora de este tipo. De acuerdo con ello, se espera que una forma soluble de RANK que termina con un aminoácido en esta región retenga la aptitud para fijar un ligando de RANK de manera específica. Aminoácidos preferidos del terminal C para péptidos solubles RANK se seleccionan del grupo constituido por los aminoácidos 214 y 197 de SEQ ID NO: 14, aunque pueden utilizarse como término C otros aminoácidos comprendidos en la región espaciadora.

ES 2 144 386 T3

Ejemplo 15

Este ejemplo ilustra la preparación de varias formas solubles diferentes de RANK y RANKL. Se utilizaron técnicas estándar de corte y ligación con enzimas de restricción, en combinación con aislamiento basado en PCR de fragmentos para los cuales no existían sitios de restricción convenientes. Cuando se utilizó PCR, los productos PCR se secuenciaron para comprobar si se habían introducido mutaciones de cualquier tipo; no se encontró mutación alguna.

Además de la huRANK/Fc descrita en el Ejemplo 2, se preparó otra proteína de fusión RANK/Fc por ligación de DNA que codificaba los aminoácidos 1-213 de SEQ ID NO: 6, a DNA que codificaba los aminoácidos 3-232 de la muteína Fc descrita previamente (SEQ ID NO: 8). Se preparó una construcción similar para RANK murina, ligando el DNA codificante de los aminoácidos 1-213 de RANK murina de longitud total (SEQ ID NO: 15) a DNA codificante de los aminoácidos 3-232 de la muteína Fc (SEQ ID NO: 8).

Se preparó una versión poli-His soluble y marcada de huRANKL por ligación de DNA codificante del péptido conductor de la cadena kappa de inmunoglobulina (SEQ ID NO: 16) a DNA codificante de una versión corta del marcador FLAGTM (SEQ ID NO: 17), seguido por codones que codificaban Gly Ser, y a continuación un marcador poli-His (SEQ ID NO: 18), seguido por codones que codificaban Gly Thr Ser, y DNA que codificaba los aminoácidos 138-317 de SEQ ID NO: 13. Se preparó una versión soluble marcada poli-His de RANKL murina por ligación de DNA que codificaba el conductor CMV (SEQ ID NO: 9) a codones que codificaban Arg Thr Ser, seguido por DNA que codificaba poli-His (SEQ ID NO: 18) seguido por DNA que codificaba los aminoácidos 119-294 de SEQ ID NO: 11.

Se preparó una forma oligómera soluble de huRANKL por ligación de DNA que codificaba el conductor CMV (SEQ ID NO: 9) a un codón que codificaba Asp seguido por DNA que terminaba en una cremallera de "leucina" formadora de trímero (SEQ ID NO: 19), y luego por codones que codificaban Thr Arg Ser, seguido por los aminoácidos 138-317 de SEQ ID NO: 13.

Estas y otras construcciones se preparan por experimentación rutinaria. Los diversos DNAs se insertan luego en un vector de expresión adecuado, y se expresan. Vectores de expresión particularmente preferidos son aquellos que pueden utilizarse en células de mamífero. Por ejemplo, pDC409 y pDC304, descritos en esta memoria, son útiles para expresión transitoria. Para transfección estable, se prefiere el uso de células CHO; varios vectores útiles se describen en el documento USSN 08/785150, actualmente concedida, por ejemplo, uno de los vectores de expresión 2A5-3 derivados de λ descritos en dicho documento.

Ejemplo 16

Este ejemplo demuestra que la expresión de RANKL puede regularse en sentido creciente en células T murinas. Se obtuvieron las células de ganglios linfáticos mesentéricos de ratones C57BL/6, y se activaron con placas recubiertas con anti-CD3, Concanavalina A (ConA) o miristato-acetato de forbol en combinación con ionomicina (anti-CD3: 500A2; Immunex Corporation, Seattle, WA; ConA, PMA, ionomicina, Sigma, St. Louis, MO) sustancialmente como se describe en esta memoria, y se cultivaron durante aproximadamente 2 a 5 días. La expresión de RANKL se evaluó en un análisis de tres colores por FACS, utilizando anticuerpos para los marcadores de las células T CD4, CD8 y CD45RB, y RANK/Fc, preparados como se describe en esta memoria.

RANKL no se expresaba en las células T murinas no estimuladas. Las células T estimuladas con cualquiera de anti-CD3, ConA, o PMA/ionomicina, exhibían una expresión diferencial de RANKL: Las células CD4⁺/CD45R^{Lo} y CD4⁺/CD45RB^{Hi} eran positivas para RANKL, pero las células CD8⁺ no lo eran. No se observaba RANKL en las células B, análogamente a los resultados observados con las células humanas.

Ejemplo 17

Este ejemplo ilustra los efectos de RANKL murina sobre la proliferación y activación celulares. Diversas células o líneas representativas de células que juegan un papel en una respuesta inmunológica (bazo, timo y ganglios linfáticos murinos) se evaluaron por cultivo de las mismas en condiciones que promovían su viabilidad, en presencia o ausencia de RANKL. RANKL no estimulaba la proliferación de ninguna de las células ensayadas. Una sola línea de células, una línea de células de macrófagos a la que se hace referencia como RAW 264.7 (número de acceso a ATCC, TIB 71) exhibía algunos signos de activación.

Las células RAW producen constitutivamente pequeñas cantidades de TNF- α . La incubación con RANKL humana o murina aumentaba la producción de TNF- α por estas células de una manera dependiente de la dosis. Los resultados no se debían a contaminación de las preparaciones de RANKL con endotoxina, dado que la ebullición de RANKL durante 10 minutos anulaba la producción de TNF- α , mientras que un tratamiento similar de la endotoxina purificada (LPS) no afectaba a la aptitud de la LPS para estimular la producción de TNF- α . A pesar del hecho de que RANKL activaba la línea de células de macrófagos RAW T64.7 para la producción de TNF- α , ni RANKL humana ni RANKL murina estimulaban la producción de óxido nítrico por estas células.

Ejemplo 18

Este ejemplo ilustra los efectos de RANKL murina sobre el crecimiento y desarrollo del timo en ratones fetales. Se inyectaron ratones preñados con 1 mg de RANK/Fc o proteína de control de vehículo (seroalbúmina murina; MSA) los días 13, 16 y 19 de gestación. Después del nacimiento, los neonatos continuaron siendo inyectados con RANK/Fc por vía intraperitoneal (IP) sobre una base diaria, comenzando a una dosis de 1 μ g, y duplicando la dosis aproximadamente cada 4 días, para una dosis final de 4 μ g. Los neonatos se tomaron los días 1, 8 y 15 después del nacimiento, se extirparon sus timos y sus bazo, y se examinaron respecto a tamaño, celularidad y composición fenotípica.

Se observó una ligera reducción en el tamaño del timo el día 1 en los neonatos nacidos de la hembra inyectada con RANK/Fc; no se observó una disminución similar en tamaño en los neonatos de control. El día 8, se redujeron el tamaño del timo y la celularidad en aproximadamente 50% de los animales tratados con RANK/Fc en comparación con los ratones tratados con MSA. El análisis fenotípico demostró que las proporciones relativas de poblaciones diferentes de células T en el timo eran las mismas en los ratones RANK/Fc que en el grupo de control, lo que indicaba que la celularidad disminuida era debida a una depresión global en el número de células T tímicas, en oposición a una disminución en una o más poblaciones específicas. Los neonatos tratados con RANK/Fc no eran significativamente diferentes de los neonatos de control el día 15 con respecto a tamaño, celularidad o fenotipo de las células tímicas. No se observó diferencia significativa alguna en el tamaño del bazo, la celularidad o la composición en ninguno de los momentos evaluados. La diferencia en celularidad el día 8 y no el día 15, puede sugerir que RANK/Fc pueda hacer valer su efecto al principio del desarrollo del timo.

Ejemplo 19

Este ejemplo demuestra que la región C-terminal del dominio citoplásmico de RANK es importante para la fijación de varias proteínas TRAF diferentes. RANK contiene al menos dos motivos PXQX(X)T reconocibles que son probablemente sitios de acoplamiento de TRAF. Por esta razón, se evaluó la importancia de diversas regiones del dominio citoplásmico de RANK para fijación de TRAF. Se preparó una proteína de fusión RANK/GST sustancialmente como se describe en Smith y Johnson, *Gene* 67:31 (1988), y se utilizó en la preparación de diversas truncaciones como se describe a continuación.

La comparación de la secuencia de nucleótidos de RANK murina y humana indicó que existían varias regiones conservadas que podrían ser importantes para la fijación de TRAF. En consecuencia, se desarrolló una técnica basada en PCR para facilitar la preparación de diversas truncaciones C-terminales que podrían retener las regiones conservadas. Se diseñaron iniciadores PCR para introducir un codón de parada y un sitio de enzima de restricción en los puntos seleccionados, produciendo las truncaciones descritas a continuación en la Tabla 1. La secuenciación confirmó que no se había introducido mutación indeseable alguna en las construcciones.

Se prepararon proteínas TRAF radiomarcadas (^{35} S-Met, Cys) por traducción *in vitro* utilizando un kit de lisado de reticulocitos disponible comercialmente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Las proteínas de fusión GST truncadas se purificaron sustancialmente como se describe en Smith y Johnson (supra). Resumidamente, se transfectoron *E. coli* con un vector de expresión que codificaba una proteína de fusión, y se indujeron para expresar la proteína. Se lisaron las bacterias, se retiró el material insoluble, y la proteína de fusión se aisló por precipitación con cuentas recubiertas de glutatión (Sepharose 4B, Pharmacia, Uppsala, Suecia).

Se lavaron las cuentas y se incubaron con diversas proteínas TRAF radiomarcadas. Después de los pasos de incubación y lavado, los complejos proteína de fusión/TRAF se separaron de las cuentas por ebullición en SDS al 0,1% + β -mercaptoetanol, y se cargaron en geles de SDS al 12% (Novex). Los geles se sometieron a autorradiografía, y se registró la presencia o ausencia del material radiomarcado. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 2.

TABLA 2

Fijación de Diversas Proteínas TRAF al Dominio Citoplásmico de RANK

Truncaciones C-terminales	E206-S339	E206-Y421	E206-M476	E206-G544	Longitud total
TRAF1	-	-	-	-	++
TRAF2	-	-	-	-	++
TRAF3	-	-	-	-	++
TRAF4	-	-	-	-	-
TRAF5	-	-	-	-	+
TRAF6	-	+	+	+	++

ES 2 144 386 T3

Estos resultados indican que TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6 se fijan a la porción más distal del dominio citoplásmico de RANK (entre los aminoácidos G544 y A616). TRAF6 tiene también un sitio de fijación entre S339 e Y421. En este experimento, TRAF5 se fijaba también al dominio citoplásmico de RANK.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un DNA aislado seleccionado del grupo constituido por:

(a) un DNA que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 13, en donde la proteína tiene un término amino seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 162, inclusive, y un término carboxi seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 313 y el aminoácido 317, inclusive;

(b) moléculas de DNA que codifican fragmentos de proteínas codificadas por el DNA de (a) que son capaces de fijación del polipéptido RANK;

(c) un DNA que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en los nucleótidos 1-951 de SEQ ID NO: 12;

(d) un DNA que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en los nucleótidos 484 a 951 de SEQ ID NO: 12; y

(e) un DNA que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos entre el aminoácido 1 y el aminoácido 317 de SEQ ID NO: 13.

2. El DNA aislado de la reivindicación 1, que codifica un polipéptido RANKL que es idéntico al menos aproximadamente en un 90% en secuencia de aminoácidos a RANKL como está codificado por el DNA de la reivindicación 1 (c) o la reivindicación 1 (e).

3. El DNA aislado de la reivindicación 1 (a), (b) o (d) que codifica un polipéptido RANKL soluble.

4. Un DNA aislado que codifica un RANKL soluble, seleccionado del grupo constituido por:

(a) un DNA que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 13, en donde la proteína tiene un término amino seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 69 y el aminoácido 162, inclusive, y un término carboxi seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 313 y el aminoácido 317, inclusive; y

(b) moléculas de DNA que codifican fragmentos de proteínas codificadas por el DNA de (a) que son capaces de fijación del polipéptido RANK.

5. El DNA aislado de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un DNA que codifica un polipéptido seleccionado del grupo constituido por un dominio de inmunoglobulina Fc, una mutéina de inmunoglobulina Fc, un marcador FLAGTM, un péptido que comprende al menos aproximadamente 6 residuos His, una cremallera de leucina, y combinaciones de los mismos.

6. Un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de DNA de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.

8. Un proceso para preparar una proteína RANKL, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 7 en condiciones que promueven la expresión y recuperación de la RANKL.

9. Un polipéptido RANKL aislado seleccionado del grupo constituido por:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 13, en donde el polipéptido tiene un término amino seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 162, inclusive, y un término carboxi seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 313 y 317, inclusive;

(b) fragmentos del polipéptido de (a) que son capaces de fijar el polipéptido RANK; y

(c) un polipéptido RANKL codificado por un DNA que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en los nucleótidos 1 a 951 de SEQ ID NO: 12;

(d) un polipéptido RANKL codificado por un DNA que comprende una secuencia de nucleótidos como se indica en los nucleótidos 484 a 951 de SEQ ID NO: 12;

ES 2 144 386 T3

(e) un polipéptido RANKL que tiene una secuencia de aminoácidos entre el aminoácido 1 y el aminoácido 317 de SEQ ID NO: 13.

10. La proteína de acuerdo con la reivindicación 9, que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente en un 90% al polipéptido de la reivindicación 9 (c) o la reivindicación 9 (e).

11. La proteína de acuerdo con la reivindicación 9 (a), (b) o (d), que es una RANKL soluble.

12. Una proteína de acuerdo con la reivindicación 9, 10 ó 11 que tiene una secuencia de aminoácidos diferente por tener una delección, inserción o sustitución.

13. Una proteína RANKL soluble de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende adicionalmente un péptido seleccionado del grupo constituido por un dominio de inmunoglobulina Fc, una muteína de inmunoglobulina Fc, un marcador FLAGTM, un péptido que comprende al menos aproximadamente 6 residuos His, una cremallera de leucina, y combinaciones de los mismos.

14. Un anticuerpo inmunorreactivo con el polipéptido RANKL de acuerdo con la reivindicación 9, que no es inmunorreactivo con el polipéptido que tiene la secuencia siguiente:

```

Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Gly Lys Tyr Leu Arg Ser Ser Glu
 1           5           10           15

Glu Met Gly Ser Gly Pro Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro
          20           25           30

Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser
          35           40           45

Met Phe Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser
 50           55           60

Ile Ala Leu Phe Leu Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile
65           70           75           80

Ser Glu Asp Ser Thr His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu
          85           90           95

Asn Ala Gly Leu Gln Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro
          100          105          110

Asp Ser Cys Arg Arg Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys
          115          120          125

Glu Leu Gln His Ile Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala
          130          135          140

Met Met Glu Gly Ser Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu
          145          150          155          160

Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser
          165          170          175

```

Gly Ser His Lys Val Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp
 180 185 190

Ala Lys Ile Ser Asn Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn
 195 200 205

Gln Asp Gly Phe Tyr Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His
 210 215 220

Glu Thr Ser Gly Ser Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr
 225 230 235 240

Val Val Lys Thr Ser Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys
 245 250 255

Gly Gly Ser Thr Lys Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr
 260 265 270

Ser Ile Asn Val Gly Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile
 275 280 285

Ser Ile Gln Val Ser Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala
 290 295 300

Thr Tyr Phe Gly Ala Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
 305 310 315

15. Un método *in vitro* de inducción de la maduración de células dendríticas (DC), que comprende poner en contacto DC CD1a+ con una cantidad de un polipéptido RANKL seleccionado de:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 13, en donde el polipéptido tiene un término amino seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 162, inclusive, y un término carboxi seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 313 y 317, inclusive; y

(b) fragmentos del polipéptido de (a) que son capaces de fijar el polipéptido RANK, suficiente para dar como resultado niveles reducidos de CD1b/c, y niveles incrementados de CD83, expresión en las DC, en condiciones que promueven la viabilidad de las DC.

16. Un método de intensificación de la capacidad alo-estimuladora *in vitro* en células dendríticas (DC), que comprende poner en contacto DC CD1a+ con una cantidad de un polipéptido RANKL seleccionado de:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 13, en donde el polipéptido tiene un término amino seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 162, inclusive, y un término carboxi seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 313 y 317, inclusive; y

(b) fragmentos del polipéptido de (a) que son capaces de fijar el polipéptido RANK, suficiente para aumentar la capacidad alo-estimuladora de las DC en una reacción de linfocitos mixtos (MLR), en condiciones que promueven la viabilidad de las DC.

17. Un método *in vitro* de promoción de la viabilidad de las células T en presencia de TGF β , que comprende poner en contacto células T que han estado expuestas a TGF β con una cantidad de un polipéptido RANKL seleccionado de:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 13, en donde el polipéptido tiene un término amino seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 162, inclusive, y un término carboxi seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 313 y 317, inclusive; y

(b) fragmentos del polipéptido de (a) que son capaces de fijar el polipéptido RANK,

suficiente para aumentar el número de células T que permanecen viables en presencia de $TGF\beta$, en condiciones que promoverían la viabilidad de las células T en ausencia de $TGF\beta$.

18. Un adyuvante para una vacuna contra tumores o una vacuna contra una enfermedad infecciosa que comprende células dendríticas $CD1a^+$ que se han incubado con un polipéptido RANKL de acuerdo con el método de la reivindicación 15.

19. Uso de un polipéptido RANKL seleccionado de:

(a) un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO: 13, en donde el polipéptido tiene un término amino seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 162, inclusive, y un término carboxi seleccionado del grupo constituido por un aminoácido entre el aminoácido 313 y 317, inclusive; y

(b) fragmentos del polipéptido de (a) que son capaces de fijar el polipéptido RANK, para efectuar un cribado respecto a un inhibidor de la activación de NF-kappa B.

20. Una composición que comprende el polipéptido RANKL como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, y un vehículo, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable.

21. Un kit para detectar RANK o RANKL solubles, o monitorizar la actividad relacionada con RANK, que comprende un polipéptido RANKL como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-13.

22. Un polipéptido RANKL como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, para uso en el cribado respecto a un inhibidor de RANK.

23. Un polipéptido RANKL como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, para uso en el diseño basado en estructura de inhibidores de RANKL.

24. Un polipéptido RANKL como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, para uso en el aumento de una respuesta inmunológica.

25. Una composición que comprende un polipéptido RANKL como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-13, para uso en el aumento de una respuesta inmunológica.

26. Una composición, de acuerdo con la reivindicación 25, en asociación con un receptor soluble de citoquinas o una citoquina u otra molécula inmunoreguladora.

27. Un adyuvante de vacuna que comprende un polipéptido RANKL como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-13.

28. Uso de un polipéptido RANKL como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 9-13 en el desarrollo de anticuerpos para RANKL.

29. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14 para uso en la inhibición de la fijación a RANK.

30. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14 para uso en la interferencia con la señalización de RANKL.

31. Una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14 para uso en la inhibición de la fijación a RANK.

32. Un polipéptido RANKL soluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 ó 13 para uso como agonista de RANK.

33. El uso de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el polipéptido induce la actividad de NF-kappa B.

34. Una composición que comprende un polipéptido RANKL soluble de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 ó 13 para uso como un agonista de RANK.

35. Una composición de acuerdo con la reivindicación 33 para inducir la actividad de NF-kappa B.

36. Un método de preparación de un anticuerpo que comprende utilizar un polipéptido RANKL de acuerdo con la reivindicación 9 como inmunógeno.

37. Un método de preparación en un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende utilizar un polipéptido RANKL de acuerdo con la reivindicación 9 como inmunógeno.

38. Una composición que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14.

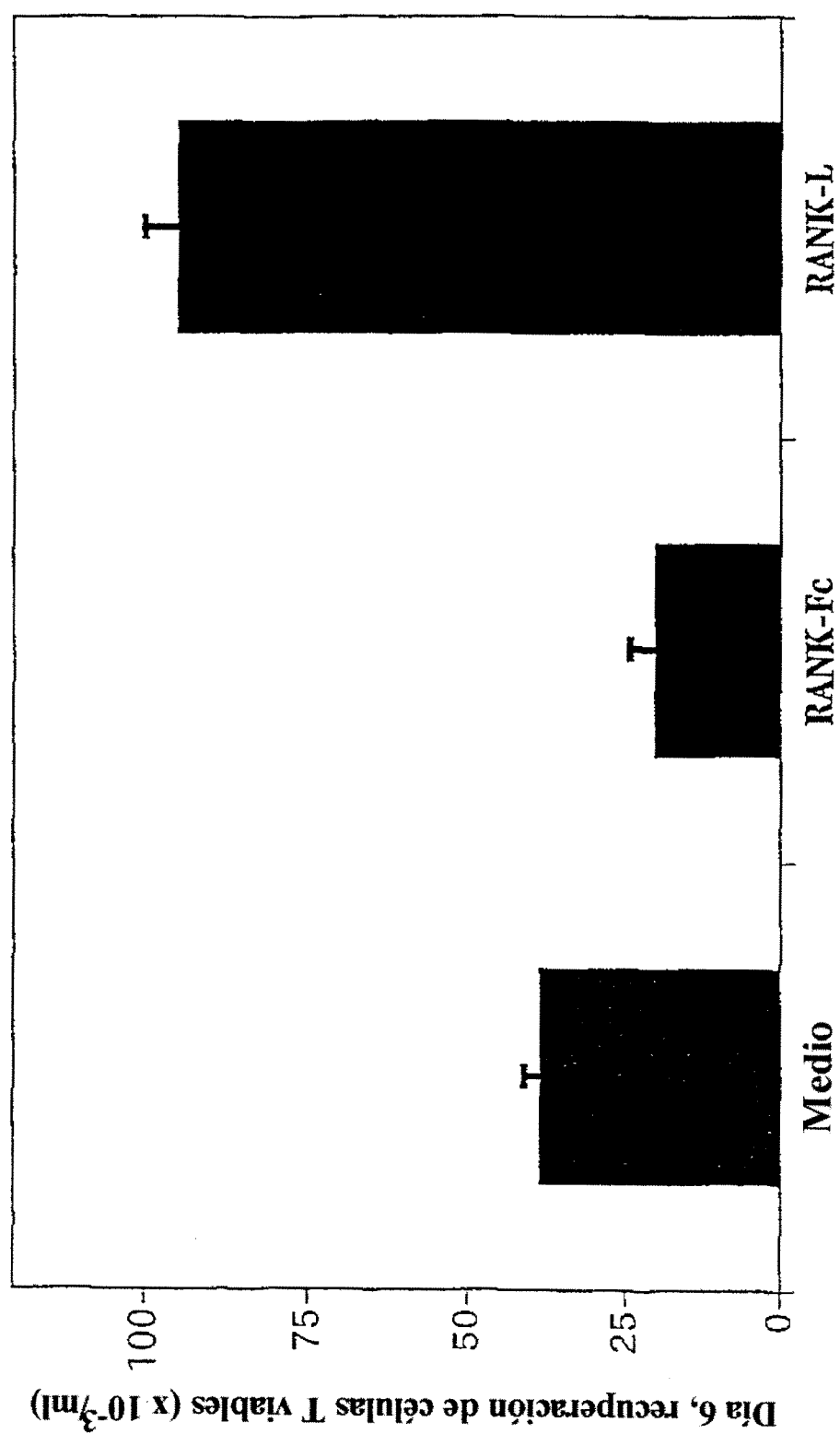


Figura 1

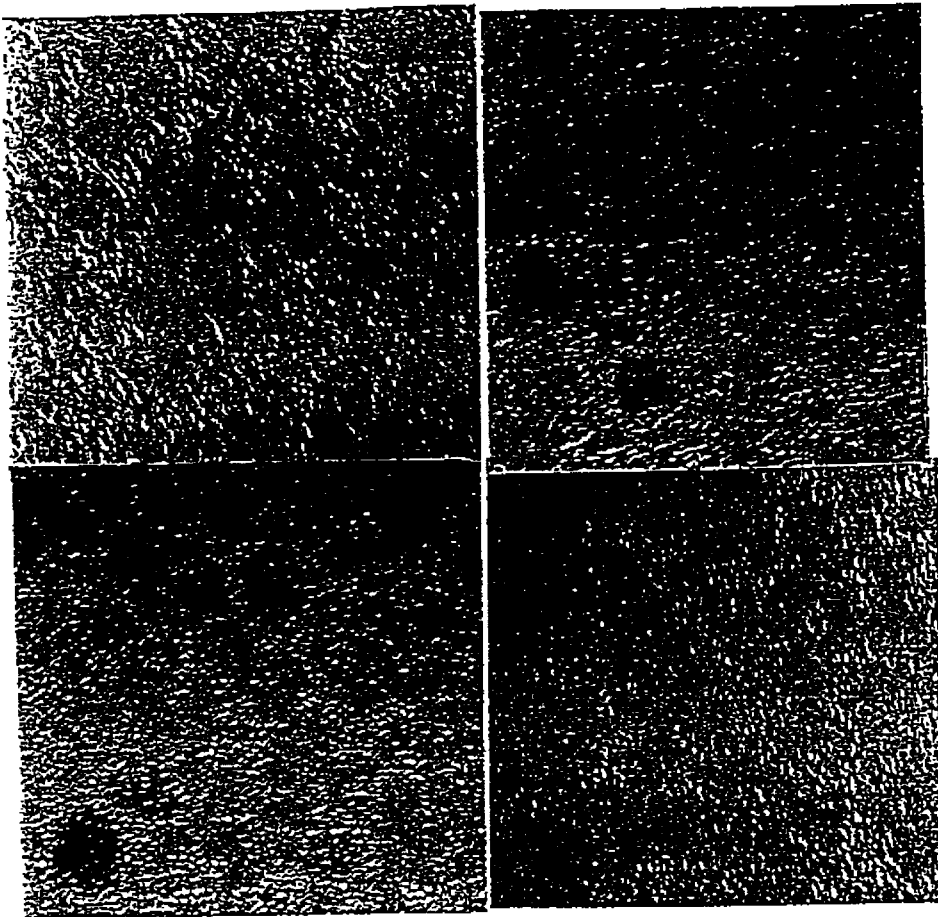


Figura 2

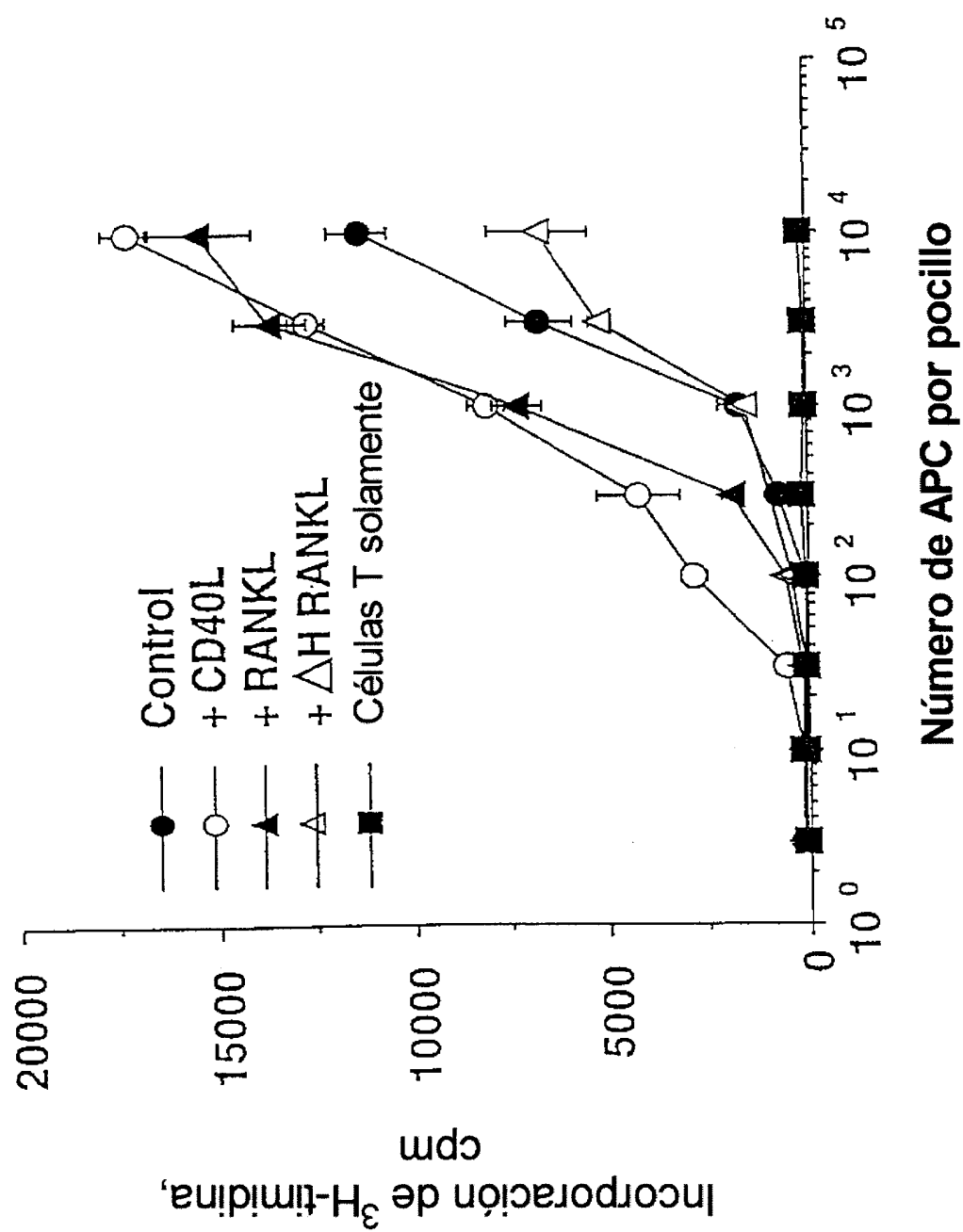


Figura 3



Figura 4

[illegible]

Figura 5

Htnfa	..	STHV	LL	LA	T	HTI	SR	IA	VS	Y	QT	KV	NP	LL	LS	AI	KSP	CC	QR	ET	PE	GA	EA	K
Htnfb	KA	TS	SP	LP	LS	HEV	Q	LR	SS	QY	PF	HL	VP	LM	SS	Q	KM	VY	CT	GG	PM	PG	LQ	E
Hfasl	GQ	SC	NN	DK	QM	HQY	I	Y	TS	Y	PQ	DL	V	M	Q	K	M	S	Y	CT	AE	WA	..	..
Htrairl	EN	TK	ND	KQ	LM	VY	I	Y	TS	Y	PQ	DL	V	M	Q	K	M	S	Y	CT	AE	WA	..	..
Htrankl	DL	AT	EX	Y	LM	Q	Y	I	Y	TS	Y	PQ	DL	V	M	Q	M	S	Y	CT	AE	WA	..	..
Hcd271	TT	AS	RR	HH	PT	LA	V	G	IC	SP	PS	SH	TL	MM	KG	..	ST	KY	WS	GG	SE	YF	..	..
Hcd401	RE	AS	SS	QA	PA	LA	AS	CL	CK	SP	FE	RI	LL	RR	AA	..	TH	SA	KP	CG	Q	FG	..	..
H41bb1	GS	GS	VS	SL	AL	HL	LQ	PL	RS	AA	AA	LE	LL	TV	DL	..	PA	SS	EA	RN	SA	FG	..	..
Hcd301	..	..	..	..	..	..	VQ	CP	NN	EV	K	LE	LL	IN	KH	I	KK	QA	LV	TV	CE	SG	MQ	T
Htnfa	PW	YH	SS	II	YQ	GG	V	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Htnfb	PW	YH	SS	II	YQ	GG	A	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Hfasl	..	..	..	..	..	..	GA	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Htrairl	..	..	..	..	..	..	GA	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Htrankl	..	..	..	..	..	..	GG	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Hcd271	..	..	..	..	..	..	GG	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Hcd401	..	..	..	..	..	..	GG	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
H41bb1	..	..	..	..	..	..	GG	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Hcd301	..	..	..	..	..	..	GG	F	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Htnfa	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Htnfb	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Hfasl	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Htrairl	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Htrankl	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Hcd271	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Hcd401	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
H41bb1	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	
Hcd301	IA	AL	..	..	..	..	G	V	Q	..	L	SA	EH	TD	SE	LD	FA	..	..	ES	..	..	..	

Figura 5 (cont.)

ES 2 144 386 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: Immunex Corporation
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Ligando para el Activador del Receptor de NF-kappa B
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 19
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Immunex Corporation, Law Department
- (B) CALLE: 51 University Street
- 15 (C) CIUDAD: Seattle
- (D) ESTADO: WA
- (E) PAÍS: EE.UU.
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 98101
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: disco flexible
- (B) ORDENADOR: Apple Power Macintosh
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: Apple Operating System 7.5.5
- (D) SOFTWARE: Microsoft Word para Power Macintosh 6.0.1
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 22 de diciembre de 1997
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 60/064.671
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 14 de octubre de 1997
- 40 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 08/813.509
- 45 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 7 de marzo de 1997
- (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:
- 50 (A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 08/772.330 (60/064.671)
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23 de diciembre de 1996
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 55 (viii) INFORMACIÓN DE PROCURADOR/AGENTE:
- (A) NOMBRE: Perkins, Patricia Anne
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 34693
- (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: 2852-WO
- 60 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: (206)587-0430
- (B) TELEFAX: (206)233-0644

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

ES 2 144 386 T3

(A) LONGITUD: 3115 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *HOMO SAPIENS*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) GENOTECA: CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA

(B) CLON: 9D-8A

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 93..1868

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

	GCTGCTGCTG CTCTGCGCGC TGCTCGCCCG GCTGCAGTTT TATCCAGAAA GAGCTGTGTG	6C
30	GACTCTCTGC CTGACCTCAG TGTTCCTTTC AG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro 1 5	113
35	CCA TGT ACC AGT GAG AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC Pro Cys Thr Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn 10 15 20	161
40	AAA TGT GAA CCA GGA AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser 25 30 35	209
	GAC AGT GTA TGT CTG CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp 40 45 50 55	257
45	AAT GAA GAA GAT AAA TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys 60 65 70	305
50	GCC CTG GTG GCC GTG GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys 75 80 85	353
	GCG TGC ACG GCT GGG TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg 90 95 100	401
55	CGC AAC ACC GAG TGC GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln 105 110 115	449
60	CTC AAC AAG GAC ACA GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser 120 125 130 135	497

ES 2 144 386 T3

	GAT GCC TTT TCC TCC ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC	545
	Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr	
	140 145 150	
5	TTC CTT GGA AAG AGA GTA GAA CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAT GCG	593
	Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala	
	155 160 165	
10	GTT TGC AGT TCT TCT CTG CCA GCT AGA AAA CCA CCA AAT GAA CCC CAT	641
	Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His	
	170 175 180	
15	GTT TAC TTG CCC GGT TTA ATA ATT CTG CTT CTC TTC GCG TCT GTG GCC	689
	Val Tyr Leu Pro Gly Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala	
	185 190 195	
	CTG GTG GCT GCC ATC ATC TTT GGC GTT TGC TAT AGG AAA AAA GGG AAA	737
	Leu Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys	
	200 205 210 215	
20	GCA CTC ACA GCT AAT TTG TGG CAC TGG ATC AAT GAG GCT TGT GGC CGC	785
	Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp His Trp Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg	
	220 225 230	
25	CTA AGT GGA GAT AAG GAG TCC TCA GGT GAC AGT TGT GTC AGT ACA CAC	833
	Leu Ser Gly Asp Lys Glu Ser Ser Gly Asp Ser Cys Val Ser Thr His	
	235 240 245	
	ACG GCA AAC TTT GGT CAG CAG GGA GCA TGT GAA GGT GTC TTA CTG CTG	881
	Thr Ala Asn Phe Gly Gln Gln Gly Ala Cys Glu Gly Val Leu Leu Leu	
	250 255 260	
30	ACT CTG GAG GAG AAG ACA TTT CCA GAA GAT ATG TGC TAC CCA GAT CAA	929
	Thr Leu Glu Glu Lys Thr Phe Pro Glu Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln	
	265 270 275	
35	GGT GGT GTC TGT CAG GGC ACG TGT GTA GGA GGT GGT CCC TAC GCA CAA	977
	Gly Gly Val Cys Gln Gly Thr Cys Val Gly Gly Gly Pro Tyr Ala Gln	
	280 285 290 295	
	GGC GAA GAT GCC AGG ATG CTC TCA TTG GTC AGC AAG ACC GAG ATA GAG	1025
	Gly Glu Asp Ala Arg Met Leu Ser Leu Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu	
	300 305 310	
40	GAA GAC AGC TTC AGA CAG ATG CCC ACA GAA GAT GAA TAC ATG GAC AGG	1073
	Glu Asp Ser Phe Arg Gln Met Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg	
	315 320 325	
45	CCC TCC CAG CCC ACA GAC CAG TTA CTG TTC CTC ACT GAG CCT GGA AGC	1121
	Pro Ser Gln Pro Thr Asp Gln Leu Leu Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser	
	330 335 340	
50	AAA TCC ACA CCT CCT TTC TCT GAA CCC CTG GAG GTG GGG GAG AAT GAC	1169
	Lys Ser Thr Pro Pro Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp	
	345 350 355	
55	AGT TTA AGC CAG TGC TTC ACG GGG ACA CAG AGC ACA GTG GGT TCA GAA	1217
	Ser Leu Ser Gln Cys Phe Thr Gly Thr Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu	
	360 365 370 375	
60		
65		

ES 2 144 386 T3

	AGC	TGC	AAC	TGC	ACT	GAG	CCC	CTG	TGC	AGG	ACT	GAT	TGG	ACT	CCC	ATG	1265
	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	
					380					385					390		
5	TCC	TCT	GAA	AAC	TAC	TTG	CAA	AAA	GAG	GTG	GAC	AGT	GGC	CAT	TGC	CCG	1313
	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	
				395					400					405			
10	CAC	TGG	GCA	GCC	AGC	CCC	AGC	CCC	AAC	TGG	GCA	GAT	GTC	TGC	ACA	GGC	1361
	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	
			410					415					420				
15	TGC	CGG	AAC	CCT	CCT	GGG	GAG	GAC	TGT	GAA	CCC	CTC	GTG	GGT	TCC	CCA	1409
	Cys	Arg	Asn	Pro	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys	Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Ser	Pro	
		425				430						435					
20	AAA	CGT	GGA	CCC	TTG	CCC	CAG	TGC	GCC	TAT	GGC	ATG	GGC	CTT	CCC	CCT	1457
	Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	Pro	Gln	Cys	Ala	Tyr	Gly	Met	Gly	Leu	Pro	Pro	
	440					445					450					455	
25	GAA	GAA	GAA	GCC	AGC	AGG	ACG	GAG	GCC	AGA	GAC	CAG	CCC	GAG	GAT	GGG	1505
	Glu	Glu	Glu	Ala	Ser	Arg	Thr	Glu	Ala	Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Asp	Gly	
					460					465					470		
30	GCT	GAT	GGG	AGG	CTC	CCA	AGC	TCA	GCG	AGG	GCA	GGT	GCC	GGG	TCT	GGA	1553
	Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser	Ala	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	
				475					480					485			
35	AGC	TCC	CCT	GGT	GGC	CAG	TCC	CCT	GCA	TCT	GGA	AAT	GTG	ACT	GGA	AAC	1601
	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Gly	Asn	Val	Thr	Gly	Asn	
			490					495					500				
40	AGT	AAC	TCC	ACG	TTC	ATC	TCC	AGC	GGG	CAG	GTG	ATG	AAC	TTC	AAG	GGC	1649
	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Met	Asn	Phe	Lys	Gly	
		505					510					515					
45	GAC	ATC	ATC	GTG	GTC	TAC	GTC	AGC	CAG	ACC	TCG	CAG	GAG	GGC	GCG	GCG	1697
	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Ala	
	520					525					530					535	
50	GCG	GCT	GCG	GAG	CCC	ATG	GGC	CGC	CCG	GTG	CAG	GAG	GAG	ACC	CTG	GCG	1745
	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Met	Gly	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	
					540					545					550		
55	CGC	CGA	GAC	TCC	TTC	GCG	GGG	AAC	GGC	CCG	CGC	TTC	CCG	GAC	CCG	TGC	1793
	Arg	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Asn	Gly	Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Pro	Cys	
				555					560					565			
60	GGC	GGC	CCC	GAG	GGG	CTG	CGG	GAG	CCG	GAG	AAG	GCC	TCG	AGG	CCG	GTG	1841
	Gly	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg	Glu	Pro	Glu	Lys	Ala	Ser	Arg	Pro	Val	
			570				575					580					
65	CAG	GAG	CAA	GGC	GGG	GCC	AAG	GCT	TGA	GCGCCCCCA	TGGCTGGGAG						1888
	Gln	Glu	Gln	Gly	Gly	Ala	Lys	Ala									
		585				590											
	CCCGAAGCTC	GGAGCCAGGG	CTCGCGAGGG	CAGCACC	GCA	GCCTCTGCCC	CAGCCCCGGC										1948
	CACCCAGGGA	TCGATCGGTA	CAGTCGAGGA	AGACCACCCG	GCATTCTCTG	CCCACTTTGC											2008
	CTTCCAGGAA	ATGGGCTTTT	CAGGAAGTGA	ATTGATGAGG	ACTGTCCCCA	TGCCACGGA											2068

ES 2 144 386 T3

```

5  TGCTCAGCAG CCCGCCGCAC TGGGGCAGAT GTCTCCCCTG CCACTCCTCA AACTCGCAGC 2128
   AGTAATTTGT GGCACCTATGA CAGCTATTTT TATGACTATC CTGTTCTGTG GGGGGGGGGT 2188
10 CTATGTTTTTC CCCCATATT TGTATTCCTT TTCATAACTT TTCTTGATAT CTTTCCTCCC 2248
   TCTTTTTTAA TGTAAGGTT TTCTCAAAAA TTCTCCTAAA GGTGAGGGTC TCTTTCTTTT 2308
   CTCTTTTCCT TTTTTTTTTC TTTTTTTGGC AACCTGGCTC TGGCCCAGGC TAGAGTGACG 2368
15 TGGTGCGATT ATAGCCCGGT GCAGCCTCTA ACTCCTGGGC TCAAGCAATC CAAGTGATCC 2428
   TCCCACCTCA ACCTTCGGAG TAGCTGGGAT CACAGCTGCA GGCCACGCCC AGCTTCCTCC 2488
   CCCCAGACTCC CCCCCCCCAG AGACACGGTC CCACCATGTT ACCCAGCCTG GTCTCAAAC T 2548
   CCCCAGCTAA AGCAGTCCTC CAGCCTCGGC CTCCCAAAGT ACTGGGATTA CAGGCGTGAG 2608
   CCCCCACGCT GGCCTGCTTT ACGTATTTTC TTTTGTGCCC CTGCTCACAG TGTTTTAGAG 2668
20 ATGGCTTTCC CAGTGTGTGT TCATTGTAAA CACTTTTGGG AAAGGGCTAA ACATGTGAGG 2728
   CCTGGAGATA GTTGCTAAGT TGCTAGGAAC ATGTGGTGGG ACTTTCATAT TCTGAAAAAT 2788
   GTTCTATATT CTCATTTTTC TAAAAGAAAG AAAAAAGGAA ACCCGATTTA TTTCTCCTGA 2848
25 ATCTTTTTAA GTTTGTGTCG TTCCTTAAGC AGAACTAAGC TCAGTATGTG ACCTTACCCG 2908
   CTAGGTGGTT AATTTATCCA TGCTGGCAGA GGCACCTCAGG TACTTGGTAA GCAAATTTCT 2968
   AAAACTCCAA GTTGCTGCAG CTTGGCATTC TTCTTATTCT AGAGGTCTCT CTGGAAAAGA 3028
30 TGGAGAAAAT GAACAGGACA TGGGGCTCCT GGAAAGAAAG GGCCCGGGAA GTTCAAGGAA 3088
   GAATAAAGTT GAAATTTTAA AAAAAAA 3115

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 591 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

```

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

```

ES 2 144 386 T3

	Lys	Val	Cys	Asp	Thr	Gly	Lys	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Val	Ala	Gly	Asn	65	70	75	80
5	Ser	Thr	Thr	Pro	Arg	Arg	Cys	Ala	Cys	Thr	Ala	Gly	Tyr	His	Trp	Ser	85	90	95	
	Gln	Asp	Cys	Glu	Cys	Cys	Arg	Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	Ala	Pro	Gly	Leu	100	105	110	
10	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Leu	Gln	Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Cys	Lys	Pro	115	120	125	
15	Cys	Leu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Ser	Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Lys	Cys	130	135	140	
	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Thr	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Val	Glu	His	His	145	150	155	160
20	Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Arg	165	170	175	
	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Ile	Leu	180	185	190	
25	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	195	200	205	
30	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	His	Trp	210	215	220	
	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	225	230	235	240
35	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	245	250	255	
	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Pro	Glu	260	265	270	
40	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Cys	Val	275	280	285	
45	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu	Ser	Leu	290	295	300	
	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Thr	305	310	315	320
50	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln	Leu	Leu	325	330	335	
	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Glu	Pro	340	345	350	
55	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	355	360	365	
60	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys	370	375	380	

ES 2 144 386 T3

	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu	
	385					390					395					400	
5	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Asn	
					405					410					415		
	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	Cys	Arg	Asn	Pro	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys	
				420					425					430			
10	Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Ser	Pro	Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	Pro	Gln	Cys	Ala	
			435					440					445				
	Tyr	Gly	Met	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Ser	Arg	Thr	Glu	Ala	
15		450					455						460				
	Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser	Ala	
	465					470					475					480	
20	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Ser	Pro	Ala	
					485					490					495		
	Ser	Gly	Asn	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	
25				500					505					510			
	Gln	Val	Met	Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln	
			515					520					525				
	Thr	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Met	Gly	Arg	Pro	
30			530				535					540					
	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Asn	Gly	
	545					550				555						560	
35	Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Pro	Cys	Gly	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg	Glu	Pro	
					565					570					575		
	Glu	Lys	Ala	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Gln	Gly	Gly	Ala	Lys	Ala		
40				580					585					590			

(2) INFORMACIÓN: PARA SEQ ID NO:3:

- 45
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 - (A) LONGITUD: 1391 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) CLASE DE CADENA: simple
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 50
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA
- 55
(iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTI-SENTIDO: NO
- (vi) FUENTE ORIGINAL:

 - (A) ORGANISMO: *HOMO SAPIENS*
- 60
(vii) FUENTE INMEDIATA:

 - (A) GENOTECA: CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA
 - (B) CLON: 9D-15C
- 65
(ix) CARACTERÍSTICA:

 - (A) NOMBRE/CLAVE: CDS

ES 2 144 386 T3

(B) LOCALIZACIÓN: 39..1391

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

```

5      CCGCTGAGGC CGCGGCGCCC GCCAGCCTGT CCCGCGCC ATG GCC CCG CGC GCC      53
                                         Met Ala Pro Arg Ala
                                         1           5

10     CGG CGG CGC CGC CCG CTG TTC GCG CTG CTG CTG CTC TGC GCG CTG CTC      101
      Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu
                               10           15           20

15     GCC CGG CTG CAG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT ACC AGT GAG      149
      Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu
                               25           30           35

20     AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC AAA TGT GAA CCA GGA      197
      Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly
                               40           45           50

25     AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT GAC AGT GTA TGT CTG      245
      Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu
                               55           60           65

30     CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG AAT GAA GAA GAT AAA      293
      Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys
                               70           75           80           85

35     TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG GCC CTG GTG GCC GTG      341
      Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val
                               90           95           100

40     GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC GCG TGC ACG GCT GGG      389
      Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly
                               105           110           115

45     TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC CGC AAC ACC GAG TGC      437
      Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys
                               120           125           130

50     GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG CTC AAC AAG GAC ACA      485
      Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr
                               135           140           145

55     GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT GAT GCC TTT TCC TCC      533
      Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser
      150           155           160           165

60     ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC TTC CTT GGA AAG AGA      581
      Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg
                               170           175           180

65     GTA GAA CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAT GCG GTT TGC AGT TCT TCT      629
      Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser
                               185           190           195

```

ES 2 144 386 T3

	CTG	CCA	GCT	AGA	AAA	CCA	CCA	AAT	GAA	CCC	CAT	GTT	TAC	TTG	CCC	GGT	677
	Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	
			200					205					210				
5	TTA	ATA	ATT	CTG	CTT	CTC	TTC	GCG	TCT	GTG	GCC	CTG	GTG	GCT	GCC	ATC	725
	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	
		215					220					225					
10	ATC	TTT	GGC	GTT	TGC	TAT	AGG	AAA	AAA	GGG	AAA	GCA	CTC	ACA	GCT	AAT	773
	Ile	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	
	230					235					240					245	
15	TTG	TGG	CAC	TGG	ATC	AAT	GAG	GCT	TGT	GGC	CGC	CTA	AGT	GGA	GAT	AAG	821
	Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	
					250					255					260		
	GAG	TCC	TCA	GGT	GAC	AGT	TGT	GTC	AGT	ACA	CAC	ACG	GCA	AAC	TTT	GGT	869
	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	
				265					270					275			
20	CAG	CAG	GGA	GCA	TGT	GAA	GGT	GTC	TTA	CTG	CTG	ACT	CTG	GAG	GAG	AAG	917
	Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	
			280					285					290				
25	ACA	TTT	CCA	GAA	GAT	ATG	TGC	TAC	CCA	GAT	CAA	GGT	GGT	GTC	TGT	CAG	965
	Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	
		295					300					305					
30	GGC	ACG	TGT	GTA	GGA	GGT	GGT	CCC	TAC	GCA	CAA	GGC	GAA	GAT	GCC	AGG	013
	Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	
	310					315					320					325	
	ATG	CTC	TCA	TTG	GTC	AGC	AAG	ACC	GAG	ATA	GAG	GAA	GAC	AGC	TTC	AGA	061
	Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	
					330					335					340		
35	CAG	ATG	CCC	ACA	GAA	GAT	GAA	TAC	ATG	GAC	AGG	CCC	TCC	CAG	CCC	ACA	109
	Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	
				345					350					355			
40	GAC	CAG	TTA	CTG	TTC	CTC	ACT	GAG	CCT	GGA	AGC	AAA	TCC	ACA	CCT	CCT	157
	Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	
			360					365					370				
45	TTC	TCT	GAA	CCC	CTG	GAG	GTG	GGG	GAG	AAT	GAC	AGT	TTA	AGC	CAG	TGC	205
	Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	
		375					380					385					
	TTC	ACG	GGG	ACA	CAG	AGC	ACA	GTG	GGT	TCA	GAA	AGC	TGC	AAC	TGC	ACT	253
	Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	
	390					395					400				405		
50	GAG	CCC	CTG	TGC	AGG	ACT	GAT	TGG	ACT	CCC	ATG	TCC	TCT	GAA	AAC	TAC	301
	Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	
					410					415					420		
55	TTG	CAA	AAA	GAG	GTG	GAC	AGT	GGC	CAT	TGC	CCG	CAC	TGG	GCA	GCC	AGC	349
	Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Ser	
				425					430					435			
60	CCC	AGC	CCC	AAC	TGG	GCA	GAT	GTC	TGC	ACA	GGC	TGC	CGG	AAC			391
	Pro	Ser	Pro	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	Cys	Arg	Asn			
			440					445					450				

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 451 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

ES 2 144 386 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

5

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

10 Leu Cys Ala Leu Leu Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro
20 25 30

Pro Cys Thr Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn
35 40 45

15 Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser
50 55 60

20 Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp
65 70 75 80

Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys
85 90 95

25 Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys
100 105 110

Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg
115 120 125

30 Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln
130 135 140

35 Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser
145 150 155 160

Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr
165 170 175

40 Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala
180 185 190

Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His
195 200 205

45 Val Tyr Leu Pro Gly Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala
210 215 220

50 Leu Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys
225 230 235 240

55

60

65

ES 2 144 386 T3

	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg
					245					250					255	
5	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His
				260					265					270		
	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu
			275					280					285			
10	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln
		290					295					300				
	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln
15		305				310					315					320
	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu
				325						330					335	
20	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg
				340					345					350		
	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser
			355					360					365			
25	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp
		370					375					380				
	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu
30		385				390					395					400
	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met
				405						410					415	
35	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro
				420					425					430		
	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly
			435					440					445			
40	Cys	Arg	Asn													
		450														

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 3136 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: *HOMO SAPIENS*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (A) GENOTECA: CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA
- (B) CLON: RANGO DE LONGITUD TOTAL

ES 2 144 386 T3

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 39..1886

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

5	CCGCTGAGGC CGCGGCGCCC GCCAGCCTGT CCCGCGCC ATG GCC CCG CGC GCC	53
10	Met Ala Pro Arg Ala 1 5	
15	CGG CGG CGC CGC CCG CTG TTC GCG CTG CTG CTG CTC TGC GCG CTG CTC Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu	101
20	10 15 20	
25	GCC CGG CTG CAG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT ACC AGT GAG Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu	149
30	25 30 35	
35	AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC AAA TGT GAA CCA GGA Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly	197
40	40 45 50	
45	AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT GAC AGT GTA TGT CTG Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu	245
50	55 60 65	
55	CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG AAT GAA GAA GAT AAA Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys	293
60	70 75 80 85	
65	TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG GCC CTG GTG GCC GTG Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val	341
70	90 95 100	
75	GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC GCG TGC ACG GCT GGG Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly	389
80	105 110 115	
85	TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC CGC AAC ACC GAG TGC Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys	437
90	120 125 130	
95	GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG CTC AAC AAG GAC ACA Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr	485
100	135 140 145	
105	GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT GAT GCC TTT TCC TCC Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser	533
110	150 155 160 165	
115	ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC TTC CTT GGA AAG AGA Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg	581
120	170 175 180	
125	GTA GAA CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAT GCG GTT TGC AGT TCT TCT Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser	629
130	185 190 195	

ES 2 144 386 T3

	CTG CCA GCT AGA AAA CCA CCA AAT GAA CCC CAT GTT TAC TTG CCC GGT	677
	Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His Val Tyr Leu Pro Gly	
	200 205 210	
5	TTA ATA ACT CTG CTT CTC TTC GCG TCT GTG GCC CTG GTG GCT GCC ATC	725
	Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala Leu Val Ala Ala Ile	
	215 220 225	
10	ATC TTT GGC GTT TGC TAT AGG AAA AAA GGG AAA GCA CTC ACA GCT AAT	773
	Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys Ala Leu Thr Ala Asn	
	230 235 240 245	
15	TTG TGG CAC TGG ATC AAT GAG GCT TGT GGC CGC CTA AGT GGA GAT AAG	821
	Leu Trp His Trp Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg Leu Ser Gly Asp Lys	
	250 255 260	
	GAG TCC TCA GGT GAC AGT TGT GTC AGT ACA CAC ACG GCA AAC TTT GGT	869
	Glu Ser Ser Gly Asp Ser Cys Val Ser Thr His Thr Ala Asn Phe Gly	
	265 270 275	
20	CAG CAG GGA GCA TGT GAA GGT GTC TTA CTG CTG ACT CTG GAG GAG AAG	917
	Gln Gln Gly Ala Cys Glu Gly Val Leu Leu Leu Thr Leu Glu Glu Lys	
	280 285 290	
25	ACA TTT CCA GAA GAT ATG TGC TAC CCA GAT CAA GGT GGT GTC TGT CAG	965
	Thr Phe Pro Glu Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln Gly Gly Val Cys Gln	
	295 300 305	
30	GGC ACG TGT GTA GGA GGT GGT CCC TAC GCA CAA GGC GAA GAT GCC AGG	1013
	Gly Thr Cys Val Gly Gly Gly Pro Tyr Ala Gln Gly Glu Asp Ala Arg	
	310 315 320 325	
	ATG CTC TCA TTG GTC AGC AAG ACC GAG ATA GAG GAA GAC AGC TTC AGA	1061
	Met Leu Ser Leu Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu Glu Asp Ser Phe Arg	
	330 335 340	
35	CAG ATG CCC ACA GAA GAT GAA TAC ATG GAC AGG CCC TCC CAG CCC ACA	1109
	Gln Met Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg Pro Ser Gln Pro Thr	
	345 350 355	
40	GAC CAG TTA CTG TTC CTC ACT GAG CCT GGA AGC AAA TCC ACA CCT CCT	1157
	Asp Gln Leu Leu Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser Lys Ser Thr Pro Pro	
	360 365 370	
	TTC TCT GAA CCC CTG GAG GTG GGG GAG AAT GAC AGT TTA AGC CAG TGC	1205
	Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln Cys	
	375 380 385	
45	TTC ACG GGG ACA CAG AGC ACA GTG GGT TCA GAA AGC TGC AAC TGC ACT	1253
	Phe Thr Gly Thr Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu Ser Cys Asn Cys Thr	
	390 395 400 405	
50	GAG CCC CTG TGC AGG ACT GAT TGG ACT CCC ATG TCC TCT GAA AAC TAC	1301
	Glu Pro Leu Cys Arg Thr Asp Trp Thr Pro Met Ser Ser Glu Asn Tyr	
	410 415 420	
55	TTG CAA AAA GAG GTG GAC AGT GGC CAT TGC CCG CAC TGG GCA GCC AGC	1349
	Leu Gln Lys Glu Val Asp Ser Gly His Cys Pro His Trp Ala Ala Ser	
	425 430 435	

ES 2 144 386 T3

	CCC AGC CCC AAC TGG GCA GAT GTC TGC ACA GGC TGC CGG AAC CCT CCT	1397
	Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly Cys Arg Asn Pro Pro	
	440 445 450	
5	GGG GAG GAC TGT GAA CCC CTC GTG GGT TCC CCA AAA CGT GGA CCC TTG	1445
	Gly Glu Asp Cys Glu Pro Leu Val Gly Ser Pro Lys Arg Gly Pro Leu	
	455 460 465	
10	CCC CAG TGC GCC TAT GGC ATG GGC CTT CCC CCT GAA GAA GAA GCC AGC	1493
	Pro Gln Cys Ala Tyr Gly Met Gly Leu Pro Pro Glu Glu Glu Ala Ser	
	470 475 480 485	
15	AGG ACG GAG GCC AGA GAC CAG CCC GAG GAT GGG GCT GAT GGG AGG CTC	1541
	Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly Ala Asp Gly Arg Leu	
	490 495 500	
	CCA AGC TCA GCG AGG GCA GGT GCC GGG TCT GGA AGC TCC CCT GGT GGC	1589
	Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ser Ser Pro Gly Gly	
	505 510 515	
20	CAG TCC CCT GCA TCT GGA AAT GTG ACT GGA AAC AGT AAC TCC ACG TTC	1637
	Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe	
	520 525 530	
25	ATC TCC AGC GGG CAG GTG ATG AAC TTC AAG GGC GAC ATC ATC GTG GTC	1685
	Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val	
	535 540 545	
30	TAC GTC AGC CAG ACC TCG CAG GAG GGC GCG GCG GCG GCT GCG GAG CCC	1733
	Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala Ala Ala Ala Glu Pro	
	550 555 560 565	
	ATG GGC CGC CCG GTG CAG GAG GAG ACC CTG GCG CGC CGA GAC TCC TTC	1781
	Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala Arg Arg Asp Ser Phe	
	570 575 580	
35	GCG GGG AAC GGC CCG CGC TTC CCG GAC CCG TGC GGC GGC CCC GAG GGG	1829
	Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys Gly Gly Pro Glu Gly	
	585 590 595	
40	CTG CGG GAG CCG GAG AAG GCC TCG AGG CCG GTG CAG GAG CAA GGC GGG	1877
	Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln Gly Gly	
	600 605 610	
	GCC AAG GCT TGAGCGCCCC CCATGGCTGG GAGCCCGAAG CTCGGAGCCA	1926
	Ala Lys Ala	
	615	
45	GGGCTCGCGA GGGCAGCACC GCAGCCTCTG CCCCAGCCCC GGCCACCCAG GGATCGATCG	1986
	GTACAGTCGA GGAAGACCAC CCGGCATTCT CTGCCCCACTT TGCCTTCCAG GAAATGGGCT	2046
50	TTTCAGGAAG TGAATTGATG AGGACTGTCC CCATGCCCCAC GGATGCTCAG CAGCCCGCCG	2106
	CACTGGGGCA GATGTCTCCC CTGCCACTCC TCAAACCTCGC AGCAGTAATT TGTGGCACTA	2166
	TGACAGCTAT TTTTATGACT ATCCTGTTCT GTGGGGGGGG GGTCTATGTT TTCCCCCAT	2226
55	ATTTGTATTC CTTTTCATAA CTTTCTTGA TATCTTTCCT CCCTCTTTTT TAATGTAAAG	2286
	GTTTTCTCAA AAATTCTCCT AAAGGTGAGG GTCTCTTCT TTTCTCTTTT CCTTTTTTTT	2346

ES 2 144 386 T3

```

TTCTTTTTTTT GGCAACCTGG CTCTGGCCCA GGCTAGAGTG CAGTGGTGCG ATTATAGCCC 2406
GGTGCAGCCT CTAACCTCTG GGCTCAAGCA ATCCAAGTGA TCCTCCCACC TCAACCTTCG 2466
5 GAGTAGCTGG GATCACAGCT GCAGGCCACG CCCAGCTTCC TCCCCCGAC TCCCCCCCCC 2526
CAGAGACACG GTCCCACCAT GTTACCCAGC CTGGTCTCAA ACTCCCCAGC TAAAGCAGTC 2586
CTCCAGCCTC GGCCTCCCAA AGTACTGGGA TTACAGGCGT GAGCCCCCAC GCTGGCCTGC 2646
10 TTTACGTATT TTCTTTTGTG CCCCTGCTCA CAGTGTTTTA GAGATGGCTT TCCCAGTGTG 2706
TGTTCAATTGT AAACACTTTT GGGAAAGGGC TAAACATGTG AGGCCTGGAG ATAGTTGCTA 2766
15 AGTTGCTAGG AACATGTGGT GGGACTTTCA TATTCTGAAA AATGTTCTAT ATTCTCATTT 2826
TTCTAAAAGA AAGAAAAAAG GAAACCCGAT TTATTTCTCC TGAATCTTTT TAAGTTTGTG 2886
TCGTTCCCTTA AGCAGAACTA AGCTCAGTAT GTGACCTTAC CCGCTAGGTG GTTAATTTAT 2946
20 CCATGCTGGC AGAGGCACTC AGGTACTTGG TAAGCAAATT TCTAAACTC CAAGTTGCTG 3006
CAGCTTGGCA TTCTTCTTAT TCTAGAGGTC TCTCTGAAA AGATGGAGAA AATGAACAGG 3066
ACATGGGGCT CCTGGAAAGA AAGGGCCCGG GAAGTTCAAG GAAGAATAAA GTTGAAATTT 3126
25 TAAAAAAA 3136

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 616 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

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

```

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

```

ES 2 144 386 T3

	Ala	Cys	Thr	Ala	Gly	Tyr	His	Trp	Ser	Gln	Asp	Cys	Glu	Cys	Cys	Arg	
				115				120					125				
5	Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	Ala	Pro	Gly	Leu	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Leu	Gln	
		130					135					140					
	Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Cys	Lys	Pro	Cys	Leu	Ala	Gly	Tyr	Phe	Ser	
	145					150					155					160	
10	Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Lys	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Thr	
					165					170					175		
	Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Val	Glu	His	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala	
15				180					185					190			
	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	
			195					200					205				
20	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	
		210					215					220					
	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	
	225				230						235					240	
25	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	
					245					250					255		
	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	
30				260					265					270			
	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	
			275					280					285				
35	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	
		290					295					300					
	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	
	305				310						315					320	
40	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	
					325					330					335		
	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	
45				340					345					350			
	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	
			355				360						365				
50	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	
		370					375					380					
	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	
55		385			390						395					400	
	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	
					405					410					415		
60	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	
				420					425					430			

ES 2 144 386 T3

	His Trp	Ala Ala	Ser Pro	Ser Pro	Asn Trp	Ala Asp	Val Cys	Thr Gly	
		435			440		445		
5	Cys Arg	Asn Pro	Pro Gly	Glu Asp	Cys Glu	Pro Leu	Val Gly	Ser Pro	
	450			455		460			
	Lys Arg	Gly Pro	Leu Pro	Gln Cys	Ala Tyr	Gly Met	Gly Leu	Pro Pro	
	465		470			475		480	
10	Glu Glu	Glu Ala	Ser Arg	Thr Glu	Ala Arg	Asp Gln	Pro Glu	Asp Gly	
			485			490		495	
	Ala Asp	Gly Arg	Leu Pro	Ser Ser	Ala Arg	Ala Gly	Ala Gly	Ser Gly	
15		500			505		510		
	Ser Ser	Pro Gly	Gly Gln	Ser Pro	Ala Ser	Gly Asn	Val Thr	Gly Asn	
		515		520		525			
20	Ser Asn	Ser Thr	Phe Ile	Ser Ser	Gly Gln	Val Met	Asn Phe	Lys Gly	
	530		535			540			
	Asp Ile	Ile Val	Val Tyr	Val Ser	Gln Thr	Ser Gln	Glu Gly	Ala Ala	
25	545		550			555		560	
	Ala Ala	Ala Glu	Pro Met	Gly Arg	Pro Val	Gln Glu	Glu Thr	Leu Ala	
			565		570			575	
	Arg Arg	Asp Ser	Phe Ala	Gly Asn	Gly Pro	Arg Phe	Pro Asp	Pro Cys	
30		580		585		590			
	Gly Gly	Pro Glu	Gly Leu	Arg Glu	Pro Glu	Lys Ala	Ser Arg	Pro Val	
		595		600		605			
35	Gln Glu	Gln Gly	Gly Ala	Lys Ala					
	610		615						

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
 - (B) TIPO: Aminoácido
 - (C) CLASE DE CADENA: no relevante
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (vii) FUENTE INMEDIATA:
- (B) CLON: Péptido FLAG®
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

Asp Tyr	Lys Asp	Asp Asp	Asp Lys
1		5	

60 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 232 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoácido
 - (C) CLASE DE CADENA: no relevante

ES 2 144 386 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Humano

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: Muteína IgG1 Fc

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 31 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA: no relevante

ES 2 144 386 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: CMV (Conductor R2780)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(D) OTRA INFORMACIÓN: Met1-Arg28 es el péptido conductor real; Arg29 refuerza el sitio de escisión de furina; los nucleótidos codificantes Thr30 y Ser31 añaden un sitio Spe1.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

Met	Ala	Arg	Arg	Leu	Trp	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Thr
1				5					10					15	
Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Lys	Ser	Lys	Arg	Arg	Thr	Ser	
			20					25					30		

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1630 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: *Mus musculus*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) GENOTECA:

(B) CLON: RANKL

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 3..884

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

ES 2 144 386 T3

	CC GGC GTC CCA CAC GAG GGT CCG CTG CAC CCC GCG CCT TCT GCA CCG	47
	Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser Ala Pro	
	1 5 10 15	
5	GCT CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG TTC CTG GCC CTC	95
	Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu	
	20 25 30	
10	CTG GGG CTG GGA CTG GGC CAG GTG GTC TGC AGC ATC GCT CTG TTC CTG	143
	Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu	
	35 40 45	
15	TAC TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA ATA TCA GAA GAC AGC ACT	191
	Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr	
	50 55 60	
20	CAC TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT GAA AAC GCA GAT TTG CAG	239
	His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Asp Leu Gln	
	65 70 75	
25	GAC TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA CCT GAC TCC TGC AGG AGG	287
	Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg	
	80 85 90 95	
30	ATG AAA CAA GCC TTT CAG GGG GCC GTG CAG AAG GAA CTG CAA CAC ATT	335
	Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile	
	100 105 110	
35	GTG GGG CCA CAG CGC TTC TCA GGA GCT CCA GCT ATG ATG GAA GGC TCA	383
	Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser	
	115 120 125	
40	TGG TTG GAT GTG GCC CAG CGA GGC AAG CCT GAG GCC CAG CCA TTT GCA	431
	Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala	
	130 135 140	
45	CAC CTC ACC ATC AAT GCT GCC AGC ATC CCA TCG GGT TCC CAT AAA GTC	479
	His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val	
	145 150 155	
50	ACT CTG TCC TCT TGG TAC CAC GAT CGA GGC TGG GCC AAG ATC TCT AAC	527
	Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn	
	160 165 170 175	
55	ATG ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT AAC CAA GAT GGC TTC TAT	575
	Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr	
	180 185 190	
60	TAC CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT CAT GAA ACA TCG GGA AGC	623
	Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser	
	195 200 205	
65	GTA CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG TAT GTC GTT AAA ACC AGC	671
	Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser	
	210 215 220	
70	ATC AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG AAA GGA GGG AGC ACG AAA	719
	Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys	
	225 230 235	

ES 2 144 386 T3

```

AAC TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT TAT TCC ATA AAT GTT GGG      767
Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly
240                               245                               250                               255

5  GGA TTT TTC AAG CTC CGA GCT GGT GAA GAA ATT AGC ATT CAG GTG TCC      815
   Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser
                               260                               265                               270

10 AAC CCT TCC CTG CTG GAT CCG GAT CAA GAT GCG ACG TAC TTT GGG GCT      863
   Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala
                               275                               280                               285

TTC AAA GTT CAG GAC ATA GAC TGAGACTCAT TTCGTGGAAC ATTAGCATGG      914
Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp
290

15 ATGTCCTAGA TGTTTGGAAA CTTCTTAAAA AATGGATGAT GTCTATACAT GTGTAAGACT      974

ACTAAGAGAC ATGGCCACACG GTGTATGAAA CTCACAGCCC TCTCTCTTGA GCCTGTACAG 1034

20 GTTGTGTATA TGTAAGTCC ATAGGTGATG TTAGATTCAT GGTGATTACA CAACGGTTTT 1094

ACAATTTTGT AATGATTTCC TAGAATTGAA CCAGATTGGG AGAGGTATTC CGATGCTTAT 1154

GAAAAACTTA CACGTGAGCT ATGGAAGGGG GTCACAGTCT CTGGGTCTAA CCCCTGGACA 1214

25 TGTGCCACTG AGAACCTTGA AATTAAGAGG ATGCCATGTC ATTGCAAAGA AATGATAGTG 1274

TGAAGGGTTA AGTTCTTTTG AATTGTTACA TTGCGCTGGG ACCTGCAAAT AAGTTCTTTT 1334

TTTCTAATGA GGAGAGAAAA ATATATGTAT TTTTATATAA TGTCTAAAGT TATATTTTCA 1394

30 GTGTAATGTT TTCTGTGCAA AGTTTGTAA ATTATATTTG TGCTATAGTA TTTGATTCAA 1454

AATATTTTAA AATGTCTCAC TGTGACATA TTTAATGTTT TAAATGTACA GATGTATTTA 1514

35 ACTGGTGCAC TTTGTAATTC CCCTGAAGGT ACTCGTAGCT AAGGGGGCAG AATACTGTTT 1574

CTGGTGACCA CATGTAGTTT ATTTCTTTAT TCTTTTAAAC TTAATAGAGT CTTCAG      1630

```

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 294 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

```

Gly Val Pro His Glu Gly Pro Leu His Pro Ala Pro Ser Ala Pro Ala
 1              5              10              15

55 Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu Leu
    20              25              30

Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu Tyr
60 35              40              45

```

65

ES 2 144 386 T3

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

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

55

(A) LONGITUD: 954 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CLASE DE CADENA: simple

60

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

65

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

ES 2 144 386 T3

(A) ORGANISMO: *Homo sapiens*

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) GENOTECA:

(B) CLON: huRANKL (longitud total)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..951

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

15	ATG CGC CGC GCC AGC AGA GAC TAC ACC AAG TAC CTG CGT GGC TCG GAG	48
	Met Arg Arg Ala Ser Arg Asp Tyr Thr Lys Tyr Leu Arg Gly Ser Glu	
	1 5 10 15	
20	GAG ATG GGC GGC GGC CCC GGA GCC CCG CAC GAG GGC CCC CTG CAC GCC	96
	Glu Met Gly Gly Gly Pro Gly Ala Pro His Glu Gly Pro Leu His Ala	
	20 25 30	
25	CCG CCG CCG CCT GCG CCG CAC CAG CCC CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG	144
	Pro Pro Pro Pro Ala Pro His Gln Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met	
	35 40 45	
30	TTC GTG GCC CTC CTG GGG CTG GGG CTG GGC CAG GTT GTC TGC AGC GTC	192
	Phe Val Ala Leu Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Val	
	50 55 60	
35	GCC CTG TTC TTC TAT TTC AGA GCG CAG ATG GAT CCT AAT AGA ATA TCA	240
	Ala Leu Phe Phe Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser	
	65 70 75 80	
40	GAA GAT GGC ACT CAC TGC ATT TAT AGA ATT TTG AGA CTC CAT GAA AAT	288
	Glu Asp Gly Thr His Cys Ile Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn	
	85 90 95	
45	GCA GAT TTT CAA GAC ACA ACT CTG GAG AGT CAA GAT ACA AAA TTA ATA	336
	Ala Asp Phe Gln Asp Thr Thr Leu Glu Ser Gln Asp Thr Lys Leu Ile	
	100 105 110	
50	CCT GAT TCA TGT AGG AGA ATT AAA CAG GCC TTT CAA GGA GCT GTG CAA	384
	Pro Asp Ser Cys Arg Arg Ile Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln	
	115 120 125	
55	AAG GAA TTA CAA CAT ATC GTT GGA TCA CAG CAC ATC AGA GCA GAG AAA	432
	Lys Glu Leu Gln His Ile Val Gly Ser Gln His Ile Arg Ala Glu Lys	
	130 135 140	
60	GCG ATG GTG GAT GGC TCA TGG TTA GAT CTG GCC AAG AGG AGC AAG CTT	480
	Ala Met Val Asp Gly Ser Trp Leu Asp Leu Ala Lys Arg Ser Lys Leu	
	145 150 155 160	
65	GAA GCT CAG CCT TTT GCT CAT CTC ACT ATT AAT GCC ACC GAC ATC CCA	528
	Glu Ala Gln Pro Phe Ala His Leu Thr Ile Asn Ala Thr Asp Ile Pro	
	165 170 175	

ES 2 144 386 T3

	TCT	GGT	TCC	CAT	AAA	GTG	AGT	CTG	TCC	TCT	TGG	TAC	CAT	GAT	CGG	GGT	576
	Ser	Gly	Ser	His	Lys	Val	Ser	Leu	Ser	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Arg	Gly	
				180					185					190			
5	TGG	GCC	AAG	ATC	TCC	AAC	ATG	ACT	TTT	AGC	AAT	GGA	AAA	CTA	ATA	GTT	624
	Trp	Ala	Lys	Ile	Ser	Asn	Met	Thr	Phe	Ser	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Val	
			195					200					205				
10	AAT	CAG	GAT	GGC	TTT	TAT	TAC	CTG	TAT	GCC	AAC	ATT	TGC	TTT	CGA	CAT	672
	Asn	Gln	Asp	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ile	Cys	Phe	Arg	His	
			210				215					220					
15	CAT	GAA	ACT	TCA	GGA	GAC	CTA	GCT	ACA	GAG	TAT	CTT	CAA	CTA	ATG	GTG	720
	His	Glu	Thr	Ser	Gly	Asp	Leu	Ala	Thr	Glu	Tyr	Leu	Gln	Leu	Met	Val	
						230					235					240	
20	TAC	GTC	ACT	AAA	ACC	AGC	ATC	AAA	ATC	CCA	AGT	TCT	CAT	ACC	CTG	ATG	768
	Tyr	Val	Thr	Lys	Thr	Ser	Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Ser	His	Thr	Leu	Met	
					245					250					255		
25	AAA	GGA	GGA	AGC	ACC	AAG	TAT	TGG	TCA	GGG	AAT	TCT	GAA	TTC	CAT	TTT	816
	Lys	Gly	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Trp	Ser	Gly	Asn	Ser	Glu	Phe	His	Phe	
				260					265					270			
30	TAT	TCC	ATA	AAC	GTT	GGT	GGA	TTT	TTT	AAG	TTA	CGG	TCT	GGA	GAG	GAA	864
	Tyr	Ser	Ile	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Leu	Arg	Ser	Gly	Glu	Glu	
				275				280					285				
35	ATC	AGC	ATC	GAG	GTC	TCC	AAC	CCC	TCC	TTA	CTG	GAT	CCG	GAT	CAG	GAT	912
	Ile	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Gln	Asp	
				290			295					300					
40	GCA	ACA	TAC	TTT	GGG	GCT	TTT	AAA	GTT	CGA	GAT	ATA	GAT	TGA			954
	Ala	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Val	Arg	Asp	Ile	Asp				
				305			310				315						

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 317 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

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

65

ES 2 144 386 T3

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

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1878 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CLASE DE CADENA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cDNA

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTI-SENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- (A) ORGANISMO: Murino

ES 2 144 386 T3

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) GENOTECA: Epitelio de Hígado Fetal Murino

(B) CLON: muRANK

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..1875

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

ATG GCC CCG CGC GCC CGG CGG CGC CGC CAG CTG CCC GCG CCG CTG CTG	48
Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu	
1 5 10 15	
GCG CTC TGC GTG CTG CTC GTT CCA CTG CAG GTG ACT CTC CAG GTC ACT	96
Ala Leu Cys Val Leu Leu Val Pro Leu Gln Val Thr Leu Gln Val Thr	
20 25 30	
CCT CCA TGC ACC CAG GAG AGG CAT TAT GAG CAT CTC GGA CGG TGT TGC	144
Pro Pro Cys Thr Gln Glu Arg His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys	
35 40 45	
AGC AGA TGC GAA CCA GGA AAG TAC CTG TCC TCT AAG TGC ACT CCT ACC	192
Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr	
50 55 60	
TCC GAC AGT GTG TGT CTG CCC TGT GGC CCC GAT GAG TAC TTG GAC ACC	240
Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr	
65 70 75 80	
TGG AAT GAA GAA GAT AAA TGC TTG CTG CAT AAA GTC TGT GAT GCA GGC	288
Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly	
85 90 95	
AAG GCC CTG GTG GCG GTG GAT CCT GGC AAC CAC ACG GCC CCG CGT CGC	336
Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro Arg Arg	
100 105 110	
TGT GCT TGC ACG GCT GGC TAC CAC TGG AAC TCA GAC TGC GAG TGC TGC	384
Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Asn Ser Asp Cys Glu Cys Cys	
115 120 125	
CGC AGG AAC ACG GAG TGT GCA CCT GGC TTC GGA GCT CAG CAT CCC TTG	432
Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Phe Gly Ala Gln His Pro Leu	
130 135 140	
CAG CTC AAC AAG GAT ACG GTG TGC ACA CCC TGC CTC CTG GGC TTC TTC	480
Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Thr Pro Cys Leu Leu Gly Phe Phe	
145 150 155 160	
TCA GAT GTC TTT TCG TCC ACA GAC AAA TGC AAA CCT TGG ACC AAC TGC	528
Ser Asp Val Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys	
165 170 175	

ES 2 144 386 T3

	ACC CTC CTT GGA AAG CTA GAA GCA CAC CAG GGG ACA ACG GAA TCA GAT 576
	Thr Leu Leu Gly Lys Leu Glu Ala His Gln Gly Thr Thr Glu Ser Asp
	180 185 190
5	GTG GTC TGC AGC TCT TCC ATG ACA CTG AGG AGA CCA CCC AAG GAG GCC 624
	Val Val Cys Ser Ser Ser Met Thr Leu Arg Arg Pro Pro Lys Glu Ala
	195 200 205
10	CAG GCT TAC CTG CCC AGT CTC ATC GTT CTG CTC CTC TTC ATC TCT GTG 672
	Gln Ala Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Val Leu Leu Leu Phe Ile Ser Val
	210 215 220
15	GTA GTA GTG GCT GCC ATC ATC TTC GGC GTT TAC TAC AGG AAG GGA GGG 720
	Val Val Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly
	225 230 235 240
20	AAA GCG CTG ACA GCT AAT TTG TGG AAT TGG GTC AAT GAT GCT TGC AGT 768
	Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp Asn Trp Val Asn Asp Ala Cys Ser
	245 250 255
25	AGT CTA AGT GGA AAT AAG GAG TCC TCA GGG GAC CGT TGT GCT GGT TCC 816
	Ser Leu Ser Gly Asn Lys Glu Ser Ser Gly Asp Arg Cys Ala Gly Ser
	260 265 270
30	CAC TCG GCA ACC TCC AGT CAG CAA GAA GTG TGT GAA GGT ATC TTA CTA 864
	His Ser Ala Thr Ser Ser Gln Gln Glu Val Cys Glu Gly Ile Leu Leu
	275 280 285
35	ATG ACT CGG GAG GAG AAG ATG GTT CCA GAA GAC GGT GCT GGA GTC TGT 912
	Met Thr Arg Glu Glu Lys Met Val Pro Glu Asp Gly Ala Gly Val Cys
	290 295 300
40	GGG CCT GTG TGT GCG GCA GGT GGG CCC TGG GCA GAA GTC AGA GAT TCT 960
	Gly Pro Val Cys Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Glu Val Arg Asp Ser
	305 310 315 320
45	AGG ACG TTC ACA CTG GTC AGC GAG GTT GAG ACG CAA GGA GAC CTC TCG 1008
	Arg Thr Phe Thr Val Ser Glu Val Thr Gln Gly Asp Leu Ser
	325 330 335
50	AGG AAG ATT CCC ACA GAG GAT GAG TAC ACG GAC CGG CCC TCG CAG CCT 1056
	Arg Lys Ile Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Thr Asp Arg Pro Ser Gln Pro
	340 345 350
55	TCG ACT GGT TCA CTG CTC CTA ATC CAG CAG GGA AGC AAA TCT ATA CCC 1104
	Ser Thr Gly Ser Leu Leu Leu Ile Gln Gln Gly Ser Lys Ser Ile Pro
	355 360 365
60	CCA TTC CAG GAG CCC CTG GAA GTG GGG GAG AAC GAC AGT TTA AGC CAG 1152
	Pro Phe Gln Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln
	370 375 380
65	TGT TTC ACC GGG ACT GAA AGC ACG GTG GAT TCT GAG GGC TGT GAC TTC 1200
	Cys Phe Thr Gly Thr Glu Ser Thr Val Asp Ser Glu Gly Cys Asp Phe
	385 390 395 400
70	ACT GAG CCT CCG AGC AGA ACT GAC TCT ATG CCC GTG TCC CCT GAA AAG 1248
	Thr Glu Pro Pro Ser Arg Thr Asp Ser Met Pro Val Ser Pro Glu Lys
	405 410 415

ES 2 144 386 T3

	CAC	CTG	ACA	AAA	GAA	ATA	GAA	GGT	GAC	AGT	TGC	CTC	CCC	TGG	GTG	GTC	1296
	His	Leu	Thr	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Val	Val	
				420					425					430			
5	AGC	TCC	AAC	TCA	ACA	GAT	GGC	TAC	ACA	GGC	AGT	GGG	AAC	ACT	CCT	GGG	1344
	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Asp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Pro	Gly	
			435					440					445				
10	GAG	GAC	CAT	GAA	CCC	TTT	CCA	GGG	TCC	CTG	AAA	TGT	GGA	CCA	TTG	CCC	1392
	Glu	Asp	His	Glu	Pro	Phe	Pro	Gly	Ser	Leu	Lys	Cys	Gly	Pro	Leu	Pro	
		450						455					460				
15	CAG	TGT	GCC	TAC	AGC	ATG	GGC	TTT	CCC	AGT	GAA	GCA	GCA	GCC	AGC	ATG	1440
	Gln	Cys	Ala	Tyr	Ser	Met	Gly	Phe	Pro	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Met	
	465					470					475					480	
20	GCA	GAG	GCG	GGA	GTA	CGG	CCC	CAG	GAC	AGG	GCT	GAT	GAG	AGG	GGA	GCC	1488
	Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Ala	Asp	Glu	Arg	Gly	Ala	
					485					490					495		
25	GTG	ACT	GGA	AAC	AGT	AAC	TCC	ACG	TTC	ATC	TCT	AGC	GGG	CAG	GTG	ATG	1584
	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Met	
			515					520					525				
30	AAC	TTC	AAG	GGT	GAC	ATC	ATC	GTG	GTG	TAT	GTC	AGC	CAG	ACC	TCG	CAG	1632
	Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	
			530					535					540				
35	GAG	GGC	CCG	GGT	TCC	GCA	GAG	CCC	GAG	TCG	GAG	CCC	GTG	GGC	CGC	CCT	1680
	Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Arg	Pro	
	545					550					555					560	
40	GTG	CAG	GAG	GAG	ACG	CTG	GCA	CAC	AGA	GAC	TCC	TTT	GCG	GGC	ACC	GCG	1728
	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	His	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Thr	Ala	
					565					570					575		
45	CCG	CGC	TTC	CCC	GAC	GTC	TGT	GCC	ACC	GGG	GCT	GGG	CTG	CAG	GAG	CAG	1776
	Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Val	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	Glu	Gln	
				580					585					590			
50	GGG	GCA	CCC	CGG	CAG	AAG	GAC	GGG	ACA	TCG	CGG	CCG	GTG	CAG	GAG	CAG	1824
	Gly	Ala	Pro	Arg	Gln	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Gln	
			595					600					605				
55	GGT	GGG	GCG	CAG	ACT	TCA	CTC	CAT	ACC	CAG	GGG	TCC	GGA	CAA	TGT	GCA	1872
	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Ser	Leu	His	Thr	Gln	Gly	Ser	Gly	Gln	Cys	Ala	
		610					615					620					
60	GAA	TGA															1878
	Glu																
	625																

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 625 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

ES 2 144 386 T3

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

ES 2 144 386 T3

	Met	Thr	Arg	Glu	Glu	Lys	Met	Val	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Gly	Val	Cys
	290						295					300				
5	Gly	Pro	Val	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Trp	Ala	Glu	Val	Arg	Asp	Ser
	305					310					315					320
	Arg	Thr	Phe	Thr	Leu	Val	Ser	Glu	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Asp	Leu	Ser
					325					330					335	
10	Arg	Lys	Ile	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro
				340					345					350		
	Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Gln	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Pro
15			355					360					365			
	Pro	Phe	Gln	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln
		370					375					380				
20	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Glu	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Asp	Phe
	385					390					395					400
	Thr	Glu	Pro	Pro	Ser	Arg	Thr	Asp	Ser	Met	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Lys
					405					410					415	
25	His	Leu	Thr	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Val	Val
				420					425					430		
	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Asp	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ser	Gly	Asn	Thr	Pro	Gly
30			435					440					445			
	Glu	Asp	His	Glu	Pro	Phe	Pro	Gly	Ser	Leu	Lys	Cys	Gly	Pro	Leu	Pro
		450					455					460				
35	Gln	Cys	Ala	Tyr	Ser	Met	Gly	Phe	Pro	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Met
	465					470					475					480
	Ala	Glu	Ala	Gly	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Ala	Asp	Glu	Arg	Gly	Ala
					485					490					495	
40	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Asp	Gln	Pro	Pro	Ala	Ser	Gly	Asn
				500					505					510		
	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Met
45			515					520					525			
	Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln
		530				535						540				
50	Glu	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Glu	Pro	Glu	Ser	Glu	Pro	Val	Gly	Arg	Pro
	545					550					555					560
	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	His	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Thr	Ala
					565					570					575	
55	Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Val	Cys	Ala	Thr	Gly	Ala	Gly	Leu	Gln	Glu	Gln
				580					585					590		
	Gly	Ala	Pro	Arg	Gln	Lys	Asp	Gly	Thr	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Gln
60			595					600					605			
	Gly	Gly	Ala	Gln	Thr	Ser	Leu	His	Thr	Gln	Gly	Ser	Gly	Gln	Cys	Ala
		610					615					620				
65	Glu															
	625															

ES 2 144 386 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 20 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

10 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15
15 Gly Ser Thr Gly
20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

30 Asp Tyr Lys Asp Glu
5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

45 His His His His His His
5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 33 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
55 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

60 Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
1 5 10 15
Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
65 20 25 30
Arg