



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 327 102**

⑮ Int. Cl.:

**C12N 15/00** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **01968572 .6**

⑯ Fecha de presentación : **05.09.2001**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1317536**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **11.06.2003**

⑭ Título: **Moléculas análogas al receptor de TNF y usos de las mismas.**

⑩ Prioridad: **05.09.2000 US 230191 P**

⑬ Titular/es: **AMGEN Inc.**  
**One Amgen Center Drive**  
**Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2009**

⑭ Inventor/es: **Theill, Lars, Eyde;**  
**Yeh, Richard;**  
**Silbiger, Scott, Michael;**  
**Yu, Gang y**  
**Senaldi, Giorgio**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2009**

⑭ Agente: **Carpintero López, Mario**

**ES 2 327 102 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Moléculas análogas al receptor de TNF y usos de las mismas.

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos 60/230.191 presentada el 5 de Septiembre de 2000.

### Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a novedosos polipéptidos similares al receptor de TNF (TNFr) y a las moléculas de ácido nucleico que codifican el mismo, denominadas "MK61" en el presente documento.

15 La invención se refiere también a vectores, células huésped, composiciones farmacéuticas, agentes de unión selectiva y los procedimientos para producir polipéptidos MK61. También se proporcionan procedimientos para el diagnóstico, tratamiento, mejora y/o prevención de enfermedades asociadas con los polipéptidos MK61.

### Antecedentes de la invención

20 Los avances técnicos en la identificación, clonación, expresión y manipulación de las moléculas de ácido nucleico y el descifrado del genoma humano han acelerado en gran medida el descubrimiento de nuevas terapias basadas en el descifrado del genoma humano. Las técnicas de secuenciación rápida del ácido nucleico pueden generar ahora información de la secuencia a velocidades sin precedentes y, acopladas con los análisis asistidos por ordenador, permiten el ensamblaje de las secuencias solapantes en los genomas parcial y completo así como la identificación de regiones que codifican polipéptidos. Una comparación de una secuencia de aminoácidos predicha frente a una compilación de 25 una base de datos de secuencias de aminoácidos conocidas permite determinar la extensión de homologías respecto de secuencias y/o hitos estructurales anteriormente identificados. La clonación y la expresión de una región que codifica el polipéptido de una molécula de ácido nucleico proporcionan un producto polipéptido para el análisis estructural y funcional. La manipulación de las moléculas de ácido nucleico y los polipéptidos codificados para crear variantes y derivados de los mismos puede conferir propiedades ventajosas a un producto para uso como compuesto terapéutico.

30 A pesar de los significativos avances técnicos en la investigación del genoma durante la década pasada, el potencial para el desarrollo de terapéuticas novedosas basadas en el genoma humano está todavía en gran parte sin realizar. No se han identificado todavía muchos genes que codifican polipéptidos terapéuticos potencialmente beneficiosos o aquellos que codifican polipéptidos que pueden actuar como "dianas" de las moléculas terapéuticas.

35 De acuerdo con esto, es un objeto de la invención identificar polipéptidos novedosos, y moléculas de ácido nucleico que codifiquen los mismos, que tengan beneficio diagnóstico o terapéutico.

40 Tras años de estudio sobre la necrosis de los tumores, finalmente en 1984 se clonaron los factores de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$  y  $\beta$ . Los años siguientes fueron testigos de la aparición de una superfamilia de citoquinas TNF, que incluían el ligando fas (FasL), el ligando CD27 (CD27L), el ligando CD30 (CD30L), el ligando CD40 (CD40L), el ligando que induce la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL, designado también AGP-1), la proteína de unión a la osteoprotegerina (POG-BP o ligando OPG), el ligando 4-1BB, LIGHT, APRIL, y TALL-1. Smith y col. (1994), Cell, 76: 959-962; Lacey y col. (1998), Cell, 93: 165-176; Chichepotiche y col. (1997), J. Biol. Chem., 272: 32401-32410; Mauri y col. (1998), Immunity, 8: 21-30; Hahne y col. (1998), J. Exp. Med., 188: 1185-90; Shu y col. (1999), J. Leukocyte Biology, 65: 680-3. Esta familia se unificó por su estructura, concretamente en el término C. Además, la mayor parte de los miembros conocidos hasta la fecha se expresan en compartimentos inmunes, aunque algunos miembros se expresan también en otros tejidos u órganos, igualmente. Smith y col. (1994), Cell 76: 959-62. Todos los ligandos miembros, con la excepción de LT- $\alpha$ , son proteínas transmembrana de tipo II, caracterizadas por una 45 región conservada de 150 aminoácidos en el interior de la región extracelular C-terminal. Aunque restringida a sólo un 20-25% de identidad, la región conservada de 150 aminoácidos se pliega en sándwich en una lámina  $\beta$  plegada característica, y trimeriza. Esta región conservada se puede liberar proteolíticamente, generando de esta manera una 50 forma funcional soluble. Banner y col. (1993), Cell, 73:431-445.

55 Muchos miembros comprendidos dentro de esta familia de ligandos se expresan en tejidos linfoides enriquecidos y juegan importantes papeles en el desarrollo y la modulación del sistema inmune. Smith y col. (1994). Por ejemplo, TNF $\alpha$  se sintetiza principalmente por los macrófagos y es un importante mediador de las respuestas inflamatorias y las defensas inmunes. Tracey y Cerami (1994), Annu. Rev. Med., 45: 491-503. Fas-L, expresado de manera predominante en células T activadas, modula la apoptosis mediada por TCR en timocitos. Nagata y col. (1995) Immunology Today, 16: 39-43; Castrim y col. (1996), Immunity, 5: 617-27. CD40L, expresado también por las células T activadas, proporciona una señal esencial para la supervivencia, la proliferación y el cambio de isótipo de la inmunoglobulina de las células B. Noelle (1996), Immunity, 4: 415-9.

60 Se han identificado los receptores análogos de la mayor parte de los miembros de la familia del ligando de TNF. Estos receptores comparten repeticiones múltiples ricas en cisteína características en el interior de sus regiones extracelulares, y no poseen motivos catalíticos en el interior de las regiones citoplásmicas. Smith y col. (1994). Dos subgrupos de TNFR homólogos: Fas, TNFR1, DR3, DR4, DR5, y DR6 contienen la región intracelular de muerte que se une a TRADD o FADD. Esto conduce a la activación de la caspasa 8 y a la apoptosis. Locksley y col. (2001) Cell 104:

487-501. Sin embargo, se puede necesitar también un señalador a través de los receptores de muerte para la proliferación de los hepatocitos y las células T. Strasser y col., (1999) *Intl. J. Biochem. Cell Biol.* 31: 533-537, Yamada y col. (1997), *Proc. Natl. Acad. Of Sci. EE.UU.* 94: 1441-6. El otro grupo que incluye TNFR2, CD40, o CD30 se une a los Factores Asociados al Receptor de TNF (TRAF), adaptadores moleculares que acoplan estos receptores superficiales a

5 las cascadas de señalización en la dirección 3'. Esto conduce a la activación de JNK y NFKB que pueden promover el crecimiento y la supervivencia celular. Estas proteínas juegan por tanto papeles críticos en la morfogénesis, el control de la apoptosis, la diferenciación, o la proliferación. Las proteínas de la superfamilia TNF/TNFR se estudian ahora extensivamente como dianas para terapia contra muchas enfermedades humanas tales como aterosclerosis, rechazo al aloinjerto, artritis, y cáncer. Locksley y col. (2001), Williams y col. (2000), *Ann. Rheum. Dis.* 59: 75-80.

10 Ademáis de las moléculas asociadas al receptor de la membrana, numerosos receptores que pertenecen a la familia de supergenes del receptor de TNF existen en forma de proteínas solubles de unión al ligando. Muchas de las formas solubles de los receptores transmembrana se han identificado posteriormente como conteniendo sólo la(s) región(es) de unión al ligando extracelular de los receptores. Por ejemplo, se ha encontrado una forma soluble del receptor de TNF en orina y suero (véase la Patente de los Estados Unidos N°: 5.843.789 y Nophar y col., *EMBO J.*, 9(10):3269-3278, 1990), y se ha demostrado que se activa mediante la rotura proteolítica de los receptores de TNF superficiales celulares (Wallach y col., *Agents Actions Suppl.*, 35: 51-57, 1991). Estas formas solubles de las moléculas del receptor se han implicado en la modulación de la actividad de TNF pero no sólo interfiriendo en la unión de TNF con su receptor, sino también estabilizando la estructura de TNF y conservando su actividad, prolongando de esta manera alguno de sus efectos (Aderka y col, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7 (3): 231-240, 1996).

25 Los miembros de las superfamilias de los ligandos y los receptores superficiales celulares del factor de necrosis tumoral regulan la función inmune y la mayor parte de la superfamilia de proteínas TNF/TNFR tales como FASL/FAS, CD40L/CD40, TNF/TNFR, o LT $\beta$ /LT $\beta$ R, por nombrar unas cuantas, se expresan en el sistema inmune, en el que coordina la homeostasis celular inmune, la muerte celular inducida por la activación, el cebado de las células T, las funciones y la supervivencia de las células dendríticas, o la formación de centros germinales y órganos linfoides tales como los parches de Peyer y los nódulos linfáticos. Fu y col. (1999), *Ann. Rev. Immunol.* 17: 399-433, Grewal y col. (1998), *Ann. Rev. Immunol.* 16: 111-135. Recientemente, se han identificado nuevos miembros de estas grandes familias que tienen funciones críticas en la inmunidad y el acoplamiento de las células linfoides con otros sistemas de órganos tales como la morfogénesis ósea y la formación de la glándula mamaria en el embarazo.

30 Naismith y col., (Trends Biochem Sci. Feb de 1998; 23(2): páginas 74-9) revisan la similitudes estructurales y funcionales entre la familia de genes TNFR.

35 Idriss y col. (Microsc Res Tech. 1 de agosto de 2000; 50(3): páginas 184-95) describen las relaciones estructura-función entre la superfamilia del receptor alfa de TNF y el TNF.

40 Debido al papel crucial que los miembros de la familia de ligandos de TNF y sus receptores (asociados a membrana y solubles) juegan en el sistema inmunológico y en una variedad de procesos de enfermedad, existe una necesidad de identificar y caracterizar nuevos miembros de estas familias, para uso en la mejora del diagnóstico y la terapia.

## Resumen de la invención

45 La presente invención se refiere a nuevas moléculas de ácido nucleico de MK61 y los polipéptidos codificados.

50 De acuerdo con la invención, se describen en el presente documento numerosas isoformas de MK61 humano: "hMK61T1", "hMK61T2", "hMK61T3", "hMK61T4", "hMK61T5", y "hMK61T6". Adicionalmente, se describen en el presente documento una isoforma de ratón ("mMK61") y un polipéptido de fusión con Fc de la misma ("mMK61-Fc" y "hMK61-Fc").

55 La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- (a) la secuencia de nucleótidos que se define en la SEC DE ID N°: 1, SEC DE ID N°: 3, SEC DE ID N°: 5, SEC DE ID N°: 7, SEC DE ID N°: 9, SEC DE ID N°: 11, SEC DE ID N°: 13, o SEC DE ID N°: 15;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16;
- (c) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o muy restrictivas con el complemento de (a) o (b), en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16; y
- (d) una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquiera de (a) a (c).

## ES 2 327 102 T3

La invención proporciona también una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es al menos aproximadamente un 70, 75, 80, 85, 90, 96, 96, 97, 98 ó 99 por ciento idéntico al polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una variante alélica o variante de corte y empalme de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- (c) una secuencia de nucleótidos de la SEC DE ID Nº: 1, (a), o (b) que codifica un fragmento de polipéptido de al menos aproximadamente 25 restos de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene al menos una sustitución de aminoácido y/o la delección de la secuencia amino que se define en cualquiera de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- (e) una secuencia de nucleótidos de la SEC DE ID Nº: 1, o (a)-(d) que comprende un fragmento de al menos aproximadamente 16 nucleótidos;
- (f) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o muy restrictivas con el complemento de cualquiera de (a)-(e), en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, y
- (g) una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquiera de (a)-(e).

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16 con al menos una sustitución conservativa de aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16 con al menos una inserción de aminoácidos en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16 con al menos una inserción de aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- (d) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16 que tiene un truncamiento en C y/o en N terminal, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;

## ES 2 327 102 T3

- 5 (e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16 con al menos una modificación seleccionada entre el grupo constituido por sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal, en la que el polipéptido codificado tiene un actividad que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16;
- 10 (f) una secuencia de nucleótidos de (a)-(e) que comprende un fragmento de al menos aproximadamente 16 nucleótidos;
- 15 (g) una secuencia de nucleótidos que hibrida en condiciones moderadamente o muy restrictivas con el complemento de cualquiera de (a)-(f), en la que el polipéptido codificado tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16; y
- (h) una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquiera de (a)-(e).

20 La invención proporciona también un vector de expresión que comprende las moléculas de ácido nucleico aisladas que se definen en el presente documento, las células huésped recombinantes (eucariota y/o procariota) que comprenden el vector; el procedimiento para producir un polipéptido h2520 que comprende cultivar la célula huésped en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido y opcionalmente aislar el polipéptido a partir del cultivo; y el polipéptido aislado producido mediante este procedimiento. La molécula de ácido nucleico usada en este procedimiento puede 25 comprender también otro promotor de ADN diferente del promotor de ADN del polipéptido MK61 natural unido operativamente con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido MK61.

30 La invención proporciona también una molécula de ácido nucleico que se describe en los párrafos anteriores en la que el porcentaje de identidad se determina usando un programa informático seleccionado entre el grupo constituido por GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, y el algoritmo de Smith-Waterman.

35 La presente invención proporciona un procedimiento para identificar inhibidores y/o estimulantes candidatos de la actividad o producción del polipéptido MK61 que comprende exponer una célula huésped a los inhibidores y/o estimulantes candidatos, midiendo la actividad o producción del polipéptido MK61 en la célula huésped y comparando esta actividad con las células control (es decir, las células no expuestas al inhibidor y/o estimulante candidato). En un aspecto relacionado, la invención proporciona los inhibidores y/o estimulantes identificados mediante cualquiera de los procedimientos anteriores.

40 La invención proporciona también un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16.

45 La invención proporciona también un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- (a) la secuencia de aminoácidos madura que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, y que comprende opcionalmente además una metionina amino terminal;
- 50 (b) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, en la que el polipéptido tiene una actividad que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16;
- 55 (c) una secuencia de aminoácidos que presenta al menos aproximadamente un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 99 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, tal como se determina usando un programa informático seleccionado entre el grupo constituido por GAP, BLASTP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, y el algoritmo de Smith-Waterman;
- 60 (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16 que comprende al menos aproximadamente 25 restos de aminoácidos en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, y

- 5 (e) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica o variante de corte y empalme de cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se definen en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, o al menos una de (a)-(c) en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

10 La invención proporciona además un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- 15 (a) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, con al menos una sustitución conservativa de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- 20 (b) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, con al menos una inserción de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- 25 (c) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, con al menos una delección de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
- 30 (d) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16 que tiene un truncamiento en C y/o en N terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, y
- 35 (e) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, con al menos una modificación seleccionada entre el grupo constituido por sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

45 Se proporcionan en la presente invención análogos de MK61 que son el resultado de sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas del polipéptido MK61 de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16. Dichos análogos incluyen un polipéptido MK61 en el que el aminoácido correspondiente a la posición 38, 39 ó 51 de las SEC DE ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 es cisteína, serina o alanina; un polipéptido MK61 en el que el aminoácido correspondiente a la posición 60 ó 76 de las SEC DE ID Nºs 2 ó 6 es cisteína, serina o alanina, un polipéptido MK61 en el que el aminoácido correspondiente a la posición 41, 42, 54, 63 ó 79 de las SEC DE ID Nºs: 14 ó 16 es cisteína serina o alanina, un polipéptido MK61 en el que el aminoácido correspondiente a la posición 171 ó 172 de la SEC DE ID Nº: 2 es leucina, norleucina, valina, metionina, alanina o fenilalanina; un polipéptido MK61 en el que el aminoácido correspondiente a la posición 178 ó 180 de las SEC DE ID Nºs: 14 ó 16 es leucina, norleucina, valina, metionina, alanina o fenilalanina; un polipéptido MK61 en el que el aminoácido correspondiente a la posición 141 de las SEC DE ID Nºs: 14 ó 16 es glicina, prolina o alanina.

50 La invención proporciona también procedimientos para inhibir la actividad del receptor y/o el ligando de MK61 en un mamífero, que comprenden administrar al menos un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

55 También se proporcionan polipéptidos de fusión que comprenden las secuencias de aminoácidos de (a)-É anteriores. Además, la invención abarca los polipéptidos de fusión que comprenden las secuencias de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 16, SEC DE ID Nº: 36 y SEC DE ID Nº: 39.

60 La presente invención proporciona también un vector de expresión que comprende las moléculas de ácido nucleico aisladas que se definen en el presente documento, las células huésped recombinantes que comprenden las moléculas

de ácidos nucleicos recombinantes que se definen en el presente documento, y un procedimiento para la producción de un polipéptido MK61 que comprende cultivar las células huésped y aislar opcionalmente el polipéptido producido de esta manera.

5 La invención abarca también un animal transgénico no humano que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido MK61. Las moléculas de ácidos nucleicos de MK61 se introducen en el animal de una manera que permita la expresión y el aumento de los niveles de MK61, que puede incluir el aumento de los niveles en circulación. El animal transgénico no humano es preferiblemente un mamífero.

10 Se proporcionan también derivados de los polipéptidos MK61 de la presente invención.

La presente invención proporciona además un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une específicamente a un polipéptido MK61 que se define en el presente documento. Este anticuerpo puede ser polyclonal o monoclonal, y se puede producir inmunizando un animal con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC 15 DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

Se proporciona también el hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2.

20 La presente invención proporciona también un procedimiento para detectar o cuantificar la cantidad de polipéptido MK61 en una muestra que comprende poner en contacto una muestra sospechosa de contener polipéptido MK61 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-MK61 que se define en el presente documento y detectar la unión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

25 Adicionalmente son proporcionados por la invención agentes de unión selectiva o sus fragmentos que son capaces de unirse específicamente a los polipéptidos MK61, los derivados, variantes y fragmentos (que tienen preferiblemente secuencias de al menos aproximadamente 25 aminoácidos) de los mismos. Estos agentes de unión selectiva pueden ser anticuerpos tales como anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos polyclonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos químicos, anticuerpos injertados con región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos antiidiotípicos, y sus fragmentos. Además, los agentes de unión selectiva pueden ser fragmentos de la 30 región variable de un anticuerpo, tales como fragmentos Fab o Fab', o sus fragmentos, y pueden comprender al menos una región determinante de la complementariedad con especificidad para un polipéptido MK61 que se define en el presente documento. El agente de unión selectiva puede unirse también a una marca detectable, tal como una radiomarca, 35 una marca fluorescente, una marca de enzima, o cualquier otra marca conocida en la técnica. Además, el agente de unión selectiva puede antagonizar la actividad biológica del polipéptido MK61, y/o producirse inmunizando un animal con un polipéptido MK61 que se define en el presente documento.

40 La presente invención proporciona también un hibridoma que produce un agente de unión selectiva capaz de unirse al polipéptido MK61 que se define en el presente documento.

45 También se proporciona un procedimiento para tratar, prevenir, o mejorar una enfermedad, dolencia, o trastorno que comprende administrar a un paciente una cantidad eficaz de un agente de unión selectiva que se define en el presente documento. Una cantidad eficaz, o una cantidad terapéuticamente eficaz, es una cantidad suficiente para dar como resultado un cambio detectable en el curso o magnitud de la enfermedad, dolencia o trastorno, tal como la intensidad o duración del pronóstico de cualquier síntoma asociado con la misma.

50 La invención abarca también las composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos, los polipéptidos o los agentes de unión selectiva anteriormente descritos y uno o más agentes de formulación farmacéuticamente aceptables. El agente de formulación farmacéuticamente aceptable puede ser un vehículo, adyuvante, 55 solubilizante, estabilizante, o antioxidante. Las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención pueden estar contenidas en vectores víricos. Las composiciones se usan para proporcionar cantidades terapéuticamente eficaces de las moléculas de ácidos nucleicos o polipéptidos de la presente invención. La invención se dirige también a los procedimientos para usar los polipéptidos, las moléculas de ácidos nucleicos, y los agentes de unión selectiva.

55 Se proporcionan también derivados de los polipéptidos MK61 de la presente invención. Estos polipéptidos pueden estar covalentemente modificados con un polímero soluble en agua en el que el polímero soluble en agua se selecciona entre el grupo constituido por polietilenglicol, monoetoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles 60 polioxietilados, y alcohol polivinílico.

65 La presente invención proporciona también polipéptidos de fusión que comprenden las secuencias de polipéptidos que se definen en el presente documento fusionadas con una secuencia de aminoácidos heteróloga, que puede ser una región constante de IgG o un fragmento de la misma.

65 Se incluyen también en la presente invención los procedimientos para tratar, prevenir o mejorar una dolencia médica, tal como cáncer, en un mamífero que dan como resultado la disminución de los niveles del polipéptido MK61. Estos procedimientos incluyen administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista selec-

cionado entre el grupo constituido por agentes de unión selectiva, moléculas pequeñas, péptidos, derivados péptidos y oligonucleótidos de sentido contrario. Estas dolencias médicas pueden incluir aquellas caracterizadas por la estimulación del sistema inmune tales como las enfermedades autoinmunes y leucemias y linfomas.

5 Se incluyen también en la presente invención los procedimientos para tratar, prevenir o mejorar una dolencia médica en un mamífero que dan como resultado un aumento en los niveles del polipéptido MK61. Estos procedimientos comprenden administrar a un paciente una cantidad eficaz de polipéptido MK61; una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido MK61; o una molécula de ácido nucleico que comprende los elementos que regulan o modulan la expresión de un polipéptido MK61. Los ejemplos de estos procedimientos incluyen la terapia génica y 10 la terapia celular y se describen adicionalmente en el presente documento. Estas dolencias médicas pueden incluir aquellas caracterizadas por la supresión del sistema inmune tales como el SIDA y los cánceres.

La invención abarca los procedimientos de diagnóstico de una dolencia patológica o una susceptibilidad a una dolencia patológica en un sujeto producida por o resultante de niveles anormales de polipéptido MK61 que comprenden 15 determinar la presencia o la cantidad de expresión del polipéptido MK61 en un tejido biológico, o muestra celular, y comparar el nivel de dicho polipéptido en un tejido biológico, o muestra celular bien de sujetos normales o del sujeto en un momentos diferentes, en el que la susceptibilidad a una dolencia patológica se basa en la presencia o la cantidad de expresión del polipéptido.

20 Se pueden usar los polipéptidos MK61 y las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención para tratar, prevenir, mejorar y/o detectar enfermedades y trastornos, que incluyen aquellos reseñados en el presente documento.

La presente invención proporciona también un procedimiento para identificar los compuestos que se unen a un 25 polipéptido MK61. El procedimiento comprende poner en contacto un polipéptido MK61 con una molécula de ensayo y determinar la extensión de la unión de la molécula de ensayo con el polipéptido. El procedimiento puede comprender además determinar si dichas moléculas de ensayo son agonistas o antagonistas de un polipéptido MK61. La presente invención proporciona además un procedimiento para ensayar el impacto de las moléculas sobre la expresión de un polipéptido MK61 o sobre la actividad de un polipéptido MK61.

30 La invención abarca también procedimientos para regular la expresión y la modulación (es decir, el aumento o la disminución) de los niveles de un polipéptido MK61. Un procedimiento comprende administrar a un animal una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido MK61. En otro procedimiento, se puede administrar una molécula de ácido nucleico que comprende los elementos que regulan o modulan la expresión de un polipéptido MK61. Los ejemplos de estos procedimientos incluyen la terapia génica, la terapia celular y la terapia de sentido 35 inverso como se describe adicionalmente en el presente documento.

La presente invención proporciona además un procedimiento para modular los niveles de un polipéptido MK61 en un animal que comprenden administrar al animal la molécula de ácido nucleico que se define en el presente documento.

40 La invención abarca también un animal transgénico no humano que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido MK61. La molécula de ácido nucleico de MK61 se introduce en el animal de manera que 45 permita la expresión y el aumento en los niveles del polipéptido MK61, que puede incluir el aumento de los niveles en circulación. El animal transgénico no humano es preferiblemente un mamífero.

La presente invención proporciona un reactivo diagnóstico que comprende un polinucleótido marcado de manera detectable que codifica la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2, o un fragmento, variante u homólogo de la misma, incluyendo las variantes alélicas y las variantes ayustadas de la misma. El polinucleótido marcado de manera detectable puede ser un ADNc, ADN, o ARN de cadena primera.

La invención proporciona también un procedimiento para detectar la presencia de moléculas de ácido nucleico de MK61 en una muestra biológica que comprende las etapas de:

- 55 (a) proporcionar una muestra biológica sospechosa de contener moléculas de ácido nucleico de MK61;
- (b) poner en contacto la muestra biológica con un reactivo diagnóstico en condiciones en las que el reactivo diagnóstico hibridará con las moléculas de ácido nucleico de MK61 contenidas en dicha muestra biológica;
- 60 (c) detectar la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico de MK61 en la muestra biológica y el reactivo diagnóstico; y
- (d) comparar el nivel de hibridación entre la muestra biológica y el reactivo diagnóstico con el nivel de hibridación entre una concentración conocida de moléculas de ácido nucleico de MK61 y el reactivo diagnóstico.

# ES 2 327 102 T3

La invención proporciona también un procedimiento para detectar la presencia de moléculas de ácido nucleico de MK61 en un tejido o muestra celular que comprende las etapas de:

- (a) proporcionar un tejido o muestra celular sospechosa de contener moléculas de ácido nucleico de MK61;
- 5 (b) poner en contacto el tejido o la muestra celular con un reactivo diagnóstico en condiciones en las que el reactivo diagnóstico hibridará con las moléculas de ácido nucleico de MK61;
- (c) detectar la hibridación entre las moléculas de ácido nucleico de MK61 en el tejido o muestra celular y el reactivo diagnóstico; y
- 10 (d) comparar el nivel de hibridación entre el tejido o la muestra celular y el reactivo diagnóstico con el nivel de hibridación entre una concentración conocida de moléculas de ácido nucleico de MK61 y el reactivo diagnóstico.

15

La invención proporciona procedimientos para inhibir la actividad del receptor de MK61 en un mamífero que comprenden administrar al menos una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo constituido por las SEC DE ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 36 y 38.

20

La invención proporciona procedimientos para inhibir la actividad del ligando de MK61 en un mamífero que comprenden administrar al menos una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo constituido por las SEC DE ID N°s: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 36 y 38.

25

La invención proporciona procedimientos para estimular una respuesta inmune en un mamífero administrando un regulador negativo de la señalización del receptor de MK61. Un regulador negativo es una molécula que inhibe la señalización del receptor de MK61. Los reguladores negativos incluyen, pero no se limitan a proteínas de fusión, tales como las que se definen en las SEC DE ID N°s: 16, 36 y 39, anticuerpos, moléculas pequeñas, péptidos y derivados péptidos.

30

La invención proporciona también procedimientos para inhibir una respuesta inmune que comprenden administrar un regulador positivo o la señalización del receptor de MK61. Un regulador positivo es una molécula que activa la señalización del receptor de MK61. Los reguladores positivos incluyen ligandos de MK61 y anticuerpos agonistas.

35

La invención proporciona procedimientos para estimular la señalización inversa mediante el ligando de MK61 unido a la superficie celular que comprenden un regulador positivo de la señalización inversa del ligando de MK61. Los reguladores positivos incluyen, pero no se limitan a proteínas de fusión de MK61, anticuerpos, moléculas pequeñas, y derivados péptidos. El término "señalización inversa" se refiere a la activación de la señalización celular inducida por una molécula de unión a un ligando unido a la superficie celular tal como la unión mediante el receptor del ligando o 40 un anticuerpo anti-ligando.

40

La invención proporciona también procedimientos para inhibir la señalización inversa mediante un ligando de MK61 unido a la superficie celular que comprende un regulador negativo de la señalización inversa del ligando de MK61. Los reguladores negativos incluyen, pero no se limitan a proteínas de fusión de MK61, anticuerpos, moléculas pequeñas y derivados péptidos.

45

La invención proporciona procedimientos para tratar el trastorno linfoproliferativo de las células B o las células T, una enfermedad autoinmune o una enfermedad inflamatoria en un mamífero que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína de fusión MK61-Fc, un anticuerpo anti-MK61, un oligonucleótido de sentido contrario, un ligando de MK61, o un anticuerpo del ligando anti-MK61 a dicho mamífero.

50

La invención abarca también un fragmento de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los restos 20-60 de la región rica en cisteína de la SEC DE ID N°: 36. La región rica en cisteína se empareja con la firma de la región rica en cisteína de la superfamilia TNFR tal como se define en Madry y col (Intl. Immunol. 10: 1693-1702, 1998) y las referencias de las anteriores y se espera que abarque la región de unión al ligando de MK61.

55

Se pueden usar los polipéptidos MK61 para identificar sus ligandos. Se han usado diversas formas de "clonación de la expresión" para clonar los ligandos de los receptores, véase, por ejemplo, Davis y col., Cell, 87: 1161-1169 (1996). Se describen con mayor detalle en el presente documento este y otros experimentos de clonación del ligando de MK61. El aislamiento del(de los) ligando(s) permite la identificación o desarrollo de agonistas y/o antagonistas novedosos de la ruta de señalización de MK61. Dichos agonistas y antagonistas incluyen el(los) ligando(s) de MK61, los anticuerpos del ligando anti-MK61 y los derivados del mismo, moléculas pequeñas, carbohidratos, lípidos, polinucleótidos (que incluyen oligonucleótidos de sentido contrario), cualquiera de los cuales se puede usar para tratar potencialmente una o más enfermedades o trastornos, que incluyen aquellos reseñados en el presente documento.

60

65

**Breve descripción de las figuras**

Deberá entenderse que en las figuras descritas a continuación, los nucleótidos 5' respecto de los nucleótidos que codifican el péptido señal son parte de la secuencia que flanquea 5' no traducida (5'-UTR). Adicionalmente, los 5 nucleótidos 3' del codón de parada representan la secuencia 3' no traducida (3'-UTR).

La Figura 1 representa gráficamente una secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID Nº: 1) que codifica MK61T1 humano (hMK61T1). Se representa también la secuencia de aminoácidos (SEC DE ID Nº: 2) de hMK61T1 humano. hMK61T1 es un receptor superficial celular que contiene un péptido señal (PS), una región rica en cisteína de tipo TNFr (CRD), un espaciador, la región transmembrana (TM), y una región intracelular larga con dos regiones muy conservadas entre especies. El péptido señal predicho está subrayado en esta figura, y el codón de parada en la SEC DE ID Nº: 1 está doblemente subrayado.

La Figura 2 representa gráficamente una secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID Nº: 3) que codifica MK61T2 humano (hMK61T2), considerado como un receptor soluble. También se representa gráficamente la secuencia de aminoácidos (SEC DE ID Nº: 4) de hMK61T2 humano. El péptido señal predicho está subrayado en esta figura, y el codón de parada de la SEC DE ID Nº: 3 está doblemente subrayado.

La Figura 3 representa gráficamente una secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID Nº: 5) que codifica MK61T3 humano (hMK61T3). También se representa gráficamente la secuencia de aminoácidos (SEC DE ID Nº: 6) de hMK61T3 humano. Se cree que hMK61T3 es un receptor soluble, que tiene un péptido señal y una CRD de tipo TNFr. El péptido señal predicho está subrayado en esta figura, y el codón de parada en la SEC DE ID Nº: 5 está doblemente subrayado.

La Figura 4 representa gráficamente una secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID Nº: 7) y una secuencia de aminoácidos (SEC DE ID Nº: 8) que codifican MK61T4 humano (hMK61T4), considerado como un receptor soluble. El péptido señal predicho está subrayado en esta figura, y el codón de parada en la SEC DE ID Nº: 7 está doblemente subrayado.

La Figura 5 representa gráficamente una secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID Nº: 9) y una secuencia de aminoácidos (SEC DE ID Nº: 10) que codifican MK61T5 humano (hMK61T5), considerado como un receptor soluble. El péptido señal predicho está subrayado en esta figura, y el codón de parada en la SEC DE ID Nº: 9 está doblemente subrayado.

La Figura 6 representa gráficamente una secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID Nº: 11) y una secuencia de aminoácidos (SEC DE ID Nº: 12) que codifican MK61T6 humano, considerado como un receptor soluble. El péptido señal predicho está subrayado en esta figura, y el codón de parada en la SEC DE ID Nº: 11 está doblemente subrayado.

La Figura 7 representa gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID Nº: 13) y la secuencia de aminoácidos (SEC DE ID Nº: 14) que codifican MK61 de ratón (mMK61), denominado también "Smi12-00051-F3", o "Smi12-00051". En esta figura, el péptido señal predicho está subrayado, y el codón de parada en la SEC DE ID Nº: 13 está doblemente subrayado.

La Figura 8 representa gráficamente la secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID Nº: 15) y la secuencia de aminoácidos (SEC DE ID Nº: 16) que codifican el polipéptido de fusión mMK61-Fc de ratón (mMK61-Fc). En esta figura, el péptido señal predicho está subrayado, la porción Fc de la secuencia está doblemente subrayada, el emplazamiento de restricción de la unión de MK61 con Fc está en negrita, y la secuencia consenso Kozak (que no está traducida) está en cursiva.

La Figura 9 muestra una transferencia Western que muestra que la proteína de fusión mMK61 Fc (mMK61-Fc) es capaz de segregarse a partir de células de mamíferos.

La Figura 10 muestra una comparación de aminoácidos de mMK61 (SEC DE ID Nº: 14) con un receptor OPG, Mrank, (SEC DE ID Nº: 17), un miembro conocido de la familia TNFr. Mrank es el precursor del receptor de OPG de ratón (osteoprotegerina).

La Figura 11 muestra una comparación de aminoácidos de mMK61 (SEC DE ID Nº: 14) con el receptor del ligando Fas (mfas), (SEC DE ID Nº: 18). mfas es un precursor del receptor del antígeno superficial que media la apoptosis.

La Figura 12 muestra una comparación de aminoácidos de mMK61 (SEC DE ID Nº: 14) con un receptor de la linfotoxina-beta de ratón conocido (TnfrC), SEC DE ID Nº: 19. TnfrC es un precursor del receptor de la linfotoxina-beta, y se denomina también "proteína relacionada con el receptor 2 del factor de necrosis tumoral" o "precursor del receptor c del factor de necrosis tumoral".

Las Figuras 13 y 14 representan gráficamente múltiples inmunotransferencias Northern de tejidos que se sondearon con una sonda radioactiva de MK61 humano cebado aleatoriamente. Estas inmunotransferencias demostraron que el ARNm de MK61 se expresa en los tejidos linfoides humanos.

## ES 2 327 102 T3

La Figura 15 representa gráficamente un histograma que compara la expresión del ARNm de MK61 humano en diversos tejidos y líneas celulares humanas tal como se midió mediante la PCR cuantitativa.

La Figura 16 representa gráficamente los histogramas que cuantifican la unión de la proteína de fusión MK61-Fc sobre la superficie de células humanas tal como se midió mediante el análisis FACS. Los histogramas indican que la proteína de fusión MK61-Fc se une a la superficie celular de las células U937 y Jurkat.

La Figura 17 muestra los histogramas que demuestran la mejora en la unión de la proteína de fusión MK61-Fc sobre la superficie celular de las células Jurkat y U937 tras el tratamiento con interferón gamma.

La Figura 18 representa gráficamente los histogramas que cuantifican la producción de IgG (panel superior) e IgA (panel inferior) en cultivos de esplenocitos de ratón tras el tratamiento con la proteína de fusión MK61-Fc.

La Figura 19 representa gráficamente los histogramas que cuantifican el efecto de la proteína de fusión MK61-Fc sobre los pesos de los bazos en ratones (panel superior) y los linfocitos de bazo (panel inferior). Estos histogramas demuestran que el tratamiento con la proteína de fusión MK61-Fc aumentó el peso del bazo y el número de linfocitos de bazo.

La Figura 20 representa gráficamente el análisis histológico de los bazos de ratones tratados con MK61-Fc. El análisis histológico indicó la presencia de hiperplasia linfoide.

La Figura 21 representa gráficamente los histogramas que cuantifican los números de células B y T de bazo en ratones tratados con proteína de fusión MK61-Fc.

La Figura 22 representa gráficamente los histogramas que cuantifican los niveles de inmunoglobulina en plasma en ratones tratados con proteína de fusión MK61-Fc.

La Figura 23 representa gráficamente los histogramas que cuantifican la generación de anticuerpos específicos anti-KLH en ratones tratados con proteína de fusión MK61-Fc

La Figura 24 muestra la secuencia de aminoácidos del MK61-delta Fc CHO humano (SEC DE ID N°: 36).

La Figura 25 muestra la secuencia de aminoácidos del MK61-Fc CHO humano (SEC DE ID N°: 39).

### 35 Descripción detallada de la invención

Los encabezamientos de sección usados en el presente documento tienen únicamente efectos organizativos y no se deben tomar como limitantes del objeto descrito.

La isoforma hMK61T1 es un receptor superficial celular que tiene un péptido señal, una región rica en cisteína del receptor de TNF (TNFR), una región transmembrana (TM), y una región intracelular larga y muy conservada.

Las cinco restantes isoformas humanas (hMK61T2, hMK61T3, hMK61T4, hMK61T5, y hMK61T6) se consideran formas solubles del receptor de MK61. hMK61T3 y hMK61T5 contienen cada una CRD completa de TNFr, y son probablemente inhibidores que se producen naturalmente de la señal de transducción mediada por hMK61T1. Las isoformas hMK61T2, hMK61T4, y hMK61T6 contienen cada una CRD parciales. mMK61 es una isoforma de MK61 de ratón, y mMK61-Fc es un polipéptido de fusión con Fc de la misma.

#### Definiciones

Los términos “gen MK61” o “molécula de ácido nucleico de MK61” o “polinucleótido” se refieren a una molécula de ácido nucleico que comprende o está constituida por una secuencia de nucleótidos que se define en la SEC DE ID N°: 1, SEC DE ID N°: 3, SEC DE ID N°: 5, SEC DE ID N° 7, SEC DE ID N°: 9, SEC DE ID N°: 11, SEC DE ID N°: 13, o SEC DE ID N°: 15, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, y las moléculas de ácido nucleico que se definen en el presente documento.

El término “polipéptido MK61” se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, y los polipéptidos relacionados. Los polipéptidos relacionados incluyen: las variantes alélicas del polipéptido MK61, los ortólogos del polipéptido MK61, las variantes de corte y empalme del polipéptido MK61, las variantes del polipéptido MK61 y los derivados del polipéptido MK61. Los polipéptidos MK61 pueden ser polipéptidos maduros, tal como se define en el presente documento, o pueden tener o no un residuo de metionina amino terminal dependiendo del procedimiento mediante el cual se preparan.

El término “variante alélica del polipéptido MK61” se refiere al polipéptido codificado mediante una de las diversas formas alternativas posibles que se producen de manera natural de un gen que ocupa un locus dado sobre un cromosoma de un organismo o una población de organismos.

# ES 2 327 102 T3

El término “derivados del polipéptido MK61” se refiere a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, las variantes alélicas del polipéptido MK61, los ortólogos del polipéptido MK61, las variantes de corte y empalme del polipéptido MK61, o las variantes del polipéptido MK61, tal como se define en el presente documento, que se han modificado químicamente.

El término “fragmento del polipéptido MK61” se refiere a un polipéptido que comprende un truncamiento en el término amino (con o sin una secuencia líder) y/o el truncamiento en el término carboxilo del polipéptido cuya secuencia es tal como se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, las variantes alélicas del polipéptido MK61, los ortólogos del polipéptido MK61, las variantes de corte y empalme del polipéptido MK61 y/o la variante del polipéptido MK61 que tiene una o más adiciones o sustituciones o delecciones internas de aminoácidos (en la que el polipéptido resultante tiene al menos seis (6) aminoácidos o más de longitud) en comparación con la secuencia de aminoácidos del polipéptido MK61 que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16. Los fragmentos del polipéptido MK61 puede ser el resultado del corte y empalme alternativo del ARN o de la actividad de la proteasa *in vivo*. Para las formas unidas a transmembrana o membrana de los polipéptidos MK61, los fragmentos preferidos incluyen formas tales como aquellas que carecen de una región de unión transmembrana o membrana.

En las formas de realización preferidas, los truncamientos comprenden aproximadamente 10 aminoácidos, o aproximadamente 20 aminoácidos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos, o más de aproximadamente 100 aminoácidos. Los fragmentos de polipéptido producidos de esta manera comprenderán aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, o aproximadamente 50 aminoácidos, o aproximadamente 75 aminoácidos, o aproximadamente 100 aminoácidos, o aproximadamente 150 aminoácidos, o aproximadamente 200 aminoácidos. Dichos fragmentos del polipéptido MK61 pueden comprender opcionalmente un residuo de metionina amino terminal. Se apreciará que se pueden usar dichos fragmentos, por ejemplo, para generar anticuerpos de los polipéptidos MK61.

El término “polipéptido de fusión de MK61” se refiere a una fusión de uno o más aminoácidos (tales como un péptido o polipéptido heterólogo) en los términos amino o carboxilo del polipéptido que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, las variantes alélicas del polipéptido MK61, los ortólogos del polipéptido MK61, las variantes de corte y empalme del polipéptido MK61, o las variantes del polipéptido MK61 que tienen una o más delecciones, sustituciones o adiciones internas de aminoácidos en comparación con la secuencia del polipéptido MK61 que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

El término “ortólogo del polipéptido MK61” se refiere a un polipéptido procedente de otra especie que corresponde a una secuencia de aminoácidos del polipéptido MK61 que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16. Por ejemplo, los polipéptidos MK61 de ratón y humano se consideran ortólogos entre sí.

El término “variante de corte y empalme del polipéptido MK61” se refiere a una molécula de ácido nucleico, normalmente ARN, que se genera mediante el procesamiento alternativo de secuencias intrón en un transcripto primario de ARN que contiene la región de codificación no contigua de la secuencia de aminoácidos del polipéptido MK61 que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

El término “variantes del polipéptido MK61” se refiere a los polipéptidos MK61 que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen una o más sustituciones, delecciones (tal como delecciones internas y/o fragmentos del polipéptido MK61), y/o adiciones (tales como adiciones internas y/o polipéptidos de fusión de MK61) de aminoácidos en comparación con las secuencias del polipéptido MK61 que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16 (con o sin una secuencia líder). Se pueden producir las variantes naturalmente (*por ejemplo*, las variantes alélicas del polipéptido MK61, los ortólogos del polipéptido MK61, y las variantes de corte y empalme del polipéptido MK61) o se pueden construir artificialmente. Se pueden preparar dichas variantes del polipéptido MK61 a partir de las moléculas de ácido nucleico correspondientes que tienen una secuencia de ADN que varía de acuerdo con la secuencia que se define en la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15. En las formas de realización preferidas, las variantes tienen entre 1 y 3, o entre 1 y 5, o entre 1 y 10, o entre 1 y 15, o entre 1 y 20, o entre 1 y 25, o entre 1 y 50, o entre 1 y 75, o entre 1 y 100, o más de 100 sustituciones, inserciones, adiciones y/o delecciones de aminoácidos, en las que las sustituciones pueden ser conservativas, o no conservativas, o cualquier combinación de las mismas.

El término “antígeno” se refiere a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse mediante un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo, y adicionalmente capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epitopo de cada antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epitopos.

## ES 2 327 102 T3

El término “polipéptidos MK61 biológicamente activos” se refiere a los polipéptidos MK61 que tienen al menos una característica de actividad del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

5

Los términos “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se refieren cada uno a la cantidad de polipéptido MK61 o molécula de ácido nucleico de MK61 usada para soportar un nivel observable de una o más actividades biológicas de los polipéptidos MK61 que se definen en el presente documento.

10 El término “vectores de expresión” se refiere a un vector que es adecuado para uso en una célula huésped y contiene secuencias de ácido nucleico que dirigen y/o controlan la expresión de las secuencias de ácido nucleico heterólogas. La expresión incluye, pero no se limita a, procesos tales como la transcripción, traducción, y corte y empalme del ARN, si están presentes intrones.

15 El término “célula huésped” se usa para referirse a una célula que se ha transformado, o es capaz de transformarse con una secuencia de ácido nucleico y a continuación expresar un gen seleccionado de interés. El término incluye la progenie de la célula parental, si la progenie es o no idéntica en morfología o en la apariencia genética al original parental, siempre que esté presente el gen seleccionado.

20 El término “identidad” tal como se conoce en la técnica se refiere a una relación entre las secuencias de dos o más moléculas de polipéptidos o dos o más moléculas de ácidos nucleicos, tal como se determina comparando las secuencias. En la técnica, “identidad” también significa el grado de parecido en la secuencia entre las moléculas de ácidos nucleicos y los polipéptidos, como el caso puede ser, tal como se determina por el emparejamiento entre cadenas de dos o más nucleótidos o dos o más secuencias de aminoácidos. “Identidad” mide el porcentaje de emparejamientos 25 idénticos entre la más pequeñas de las dos o más secuencias con el alineamiento de huecos (si cabe) resuelto mediante un modelo matemático o programa informático concreto (es decir, “algoritmos”).

30 El término “similitud” es un concepto relacionado pero, a diferencia de “identidad”, se refiere a una medida de la similitud que incluye tanto los emparejamientos idénticos como los emparejamientos con sustituciones conservativas. Si dos secuencias de polipéptidos tienen, por ejemplo, 10/20 aminoácidos idénticos, y el resto son todas sustituciones 35 no conservativas, entonces el porcentaje de identidad y similitud de ambas podría ser el 50%. Si, en el mismo ejemplo, existen cinco posiciones más en las que las sustituciones son conservativas, entonces el porcentaje de identidad sigue siendo del 50%, pero el porcentaje de similitud sería del 75% (15/20). Por tanto, en los casos en los que las sustituciones son conservativas, el grado de porcentaje de similitud entre dos polipéptidos será mayor que el porcentaje de identidad entre aquellos dos polipéptidos.

40 El término “molécula de ácido nucleico aislada” se refiere a una molécula de ácido nucleico de la invención que (1) se ha separado de al menos aproximadamente un 50 por ciento de proteínas, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que se encuentra naturalmente cuando el ADN total se aísla de las células fuente, (2) no se une a todo o a una porción de un polinucleótido al cual se une la “molécula de ácido nucleico aislada” en la naturaleza, (3) se une de manera operable a un polinucleótido que no se une en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia de polinucleótido más grande. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico aislada de la presente invención está sustancialmente libre de cualquier otra(s) molécula(s) de ácido nucleico contaminante u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que podrían interferir con su uso en la producción del 45 polipéptido o su uso terapéutico, diagnóstico, profiláctico o de investigación.

50 El término “polipéptido aislado” se refiere a un polipéptido de la presente invención que (1) se ha separado de al menos el 50% de polinucleótidos, lípidos, carbohidratos u otros materiales con los que se encuentra naturalmente cuando se aísla de la célula fuente, (2) no se une (mediante interacción covalente o no covalente) a todo o a una porción de un polipéptido al cual el “polipéptido aislado” se une en la naturaleza, (3) se une de manera operable (mediante interacción covalente o no covalente) a un polipéptido con el cual no se une en la naturaleza, o (4) no se produce en la naturaleza. Preferiblemente, el polipéptido aislado está sustancialmente libre de otro cualquier polipéptido contaminante u otros contaminantes que se encuentran en su entorno natural que podrían interferir con su uso terapéutico, 55 diagnóstico, profiláctico o de investigación.

55 El término “polipéptido MK61 maduro” se refiere a un polipéptido MK61 que carece de una secuencia líder. Un polipéptido MK61 maduro puede incluir también otras modificaciones tales como el procesamiento proteolítico del término amino (con o sin una secuencia líder) y/o el término carboxilo, la rotura de un polipéptido más pequeño procedente de un precursor más grande, la glicosilación unida a N y/o unida a O, y similar.

60 Un polipéptido MK61 maduro a modo de ejemplo está representado gráficamente por 24 restos de aminoácidos a 355 restos de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2; por 24 restos de aminoácidos a 85 restos de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 4; por 24 restos de aminoácidos a 136 restos de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 6; por 24 restos de aminoácidos a 187 restos de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 8; por 24 restos de aminoácidos a 71 restos de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 10; por 24 restos de aminoácidos a 167 restos de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 12; por 22 restos de aminoácidos a 345 restos de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 14; y por 22 restos de aminoácidos a 404 restos de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 16.

Los términos “secuencia de ácido nucleico” o “molécula de ácido nucleico” se refieren a una secuencia de ADN o ARN. Los términos abarcan las moléculas formadas a partir de cualquiera de las bases análogas conocidas de ADN y ARN tales como, pero sin limitarse a 4-acetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenina, aziridinil-citosina, pesudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboxi-metilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-iso-penteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetil-guanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiamino-metil-2-tiouracilo, beta-D-manosil-queosina, 5'-metoxi-carbonil-metiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, y 2,6-diaminopurina.

El término “que se produce naturalmente” o “nativo” cuando se usa en relación con materiales biológicos tales como moléculas de ácido nucleico, polipéptidos, células huésped, y similares, se refiere a los materiales que se encuentran en la naturaleza y que no están manipulados por el hombre. Similarmente, “que no se produce naturalmente” o “no nativo” tal como se usa en el presente documento se refiere a un material que no se encuentra en la naturaleza o que se ha modificado o sintetizado estructuralmente por el hombre.

El término “unido de manera operable” se usa en el presente documento para referirse a un procedimiento para flanquear secuencias en el que las secuencias que flanquean así descritas se configuran o ensamblan con el fin de llevar a cabo su función usual. De esta manera, una secuencia que flanquea unida de manera operable a una secuencia de codificación puede ser capaz de efectuar la replicación, la transcripción y/o la traducción de la secuencia de codificación. Por ejemplo, una secuencia de codificación se une de manera operable a un promotor cuando el promotor es capaz de dirigir la transcripción de esta secuencia de codificación. Una secuencia que flanquea no necesita ser contigua a la secuencia de codificación, siempre que funcione correctamente. De esta manera, por ejemplo, pueden estar presente secuencias ya transcritas no traducidas entre una secuencia promotora y la secuencia de codificación, y la secuencia promotora puede considerarse todavía “unida de manera operable” a la secuencia de codificación.

Los términos “vehículo farmacéuticamente aceptable” o “vehículo fisiológicamente aceptable” tal como se usan en el presente documento se refieren a uno o más materiales de formulación adecuados para llevar a cabo o potenciar la administración del polipéptido MK61, la molécula de ácido nucleico de MK61 o el agente de unión selectiva de MK61 en forma de composición farmacéutica.

El término “agente de unión selectiva” se refiere a una molécula o moléculas que tienen especificidad por un polipéptido MK61. Tal como se usa en el presente documento, los términos “específico” y “especificidad” se refieren a la capacidad de los agentes de unión selectiva de unirse a polipéptidos MK61 humanos y no unirse a polipéptidos MK61 no humanos. Se apreciará, sin embargo, que los agentes de unión selectiva pueden unirse también a los ortólogos del polipéptido que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, esto es, versiones interespecies de la misma, tal como los polipéptidos de ratón y rata.

El término “transducción” se usa para referirse a la transferencia de ácidos nucleicos desde una bacteria a otra, normalmente mediante un fago. “Transducción” se refiere también a la adquisición y transferencia de secuencias celulares eucariotas mediante retrovirus.

El término “transfección” se usa para referirse a la captación de ADN extraño o exógeno por una célula, y una célula se ha transfecido cuando el ADN exógeno se ha introducido en el interior de la membrana celular. Se conocen bien en la técnica numerosas técnicas de transfección y se describen en el presente documento. Véanse, por ejemplo, Graham y col., *Virology*, 52: 456 (1973); Sambrook y col., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, (1989); Davis y col., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, (1986); and Chu y col., *Gene*, 13: 197 (1981). Se pueden usar dichas técnicas para introducir uno o más restos de ADN exógeno en las células huésped adecuadas.

El término “transformación”, tal como se usa en el presente documento se refiere a un cambio en las características genéticas de las células, y una célula se ha transformado cuando se ha modificado para contener ADN nuevo. Por ejemplo, una célula se transforma cuando se modifica genéticamente a partir de su estado nativo. Tras la transfección o traducción, el ADN transformante puede recombinar con el de la célula integrándose físicamente en un cromosoma de la célula, éste se puede mantener transitoriamente como un elemento episomal sin replicarse, o se puede replicar independientemente como un plásmido. Se considera que una célula se ha transformado de manera estable cuando el ADN se replica con la división de la célula. El término “vector” se usa para referirse a cualquier molécula (por ejemplo, ácido nucleico, plásmido o virus) usada para transferir información de la codificación en una célula huésped.

#### *Conexión de las moléculas de ácido nucleico y/o lo polipéptidos*

Se entiende que las moléculas de ácido nucleico relacionadas incluyen variantes alélicas o de corte y empalme de la molécula de ácido nucleico de la SEC DE ID N°: 1, SEC DE ID N°: 3, SEC DE ID N°: 5, SEC DE ID N° 7, SEC DE ID N°: 9, SEC DE ID N°: 11, SEC DE ID N°: 13, o SEC DE ID N°: 15, e incluyen secuencias que son complementarias con cualquiera de las secuencias de nucleótidos anteriores. Las moléculas de ácido nucleico relacionadas incluyen

## ES 2 327 102 T3

también una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que comprende o está constituido esencialmente por una sustitución, modificación, adición y/o delección de uno o más restos de aminoácidos en comparación con el polipéptido en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

5

Los fragmentos incluyen moléculas que codifican un polipéptido de al menos aproximadamente 25 restos de aminoácidos, o aproximadamente 50, o aproximadamente 75, o aproximadamente 100, o más de aproximadamente 100, restos de aminoácidos del polipéptido de la SEC DE ID Nº: 2.

10 Además, las moléculas de ácido nucleico de MK61 relacionadas incluyen moléculas preferidas que comprenden secuencias de nucleótidos que hibridan bajo condiciones moderadamente o muy restrictivas tal como se define en el presente documento con la secuencia complementaria completa de la molécula de ácido nucleico de la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15, o de una molécula que codifica un polipéptido, cuyo polipéptido comprende la secuencia 15 de aminoácidos que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, o de un fragmento de ácido nucleico que se define en el presente documento, o de un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido que se define en el presente documento. Se pueden preparar sondas de hibridación usando las secuencias de MK61 proporcionadas 20 en el presente documento para seleccionar el ADNc, las bibliotecas de ADN genómico o sintético de las secuencias relacionadas. Las regiones del ADN y/o la secuencia de aminoácidos del polipéptido MK61 que presentan identidad significativa con las secuencias conocidas se determinan fácilmente usando los algoritmos de alineación de secuencias que se describen en el presente documento, y se pueden usar aquellas regiones para diseñar sondas para el rastreo.

25 El término "condiciones muy restrictivas" se refiere a aquellas condiciones que se diseñan para permitir la hibridación de las cadenas de ADN cuyas secuencias son muy complementarias, y para excluir la hibridación de ADN significativamente desparejados. La restricción de la hibridación se determina principalmente mediante la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de los agentes desnaturalizantes tales como formamida. Los ejemplos de "condiciones muy restrictivas" para la hibridación y el lavado son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 30 M a 65-68°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M, y formamida al 50% a 42°C. Véanse Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Anderson y col., Nucleic Acid Hybridization: a practical approach, Ch. 4, IRL Press Limited, Oxford, Inglaterra (1985).

35 Se pueden usar también condiciones más restrictivas (tales como temperatura más elevada, fuerza iónica menor, más formamida, u otro agente desnaturalizante); sin embargo, se afectará el grado de hibridación. Se pueden incluir otros agentes en los tampones de hibridación y lavado con el objetivo de reducir la hibridación no específica y/o de fondo. Los ejemplos son, albúmina de suero bovino al 0,1%, polivinil pirrolidona al 0,1%, pirofosfato de sodio al 40 0,1%, Dodecil sulfato de sodio al 0,1% (NaDODSO<sub>4</sub> o SDS) ficol, solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (u otro ADN no complementario), y sulfato de dextrano, aunque se pueden usar también otros agentes adecuados. Se pueden cambiar la concentración y tipos de estos aditivos sin afectar sustancialmente la restricción de las condiciones de hibridación. Se llevan a cabo normalmente experimentos de hibridación a pH 6,8-7,4; sin embargo, a condiciones de fuerza iónica normales, la velocidad de hibridación es casi independiente del pH. Véase Anderson y col., Nucleic Acid Hybridization: a Practical Approach, Ch. 4, IRL Press Limited, Oxford, Inglaterra (1985).

45 Los factores que afectan la estabilidad de un dúplex de ADN incluyen la composición base, la longitud, y el grado de desapareamiento del par de bases. Una persona experta en la técnica puede ajustar las condiciones de hibridación con el fin de acomodar estas variables y permitir a los ADN de diferentes secuencias conectadas formar híbridos. Se puede estimar la temperatura de fusión de un dúplex de ADN perfectamente emparejado mediante la siguiente ecuación:

50

$$T_m (\text{°C}) = 81,5 + 16,6 (\log[\text{Na}^+]) + 0,41 (\% \text{ de G+C}) - 600/N - 0,72 (\% \text{ de formamida})$$

55 en la que N es la longitud del dúplex formado en los nucleótidos,  $[\text{Na}^+]$  es la concentración molar del ión de sodio en la solución de hibridación o lavado, y % de G+C es el porcentaje de las bases (guanina + citosina) en el híbrido. Para híbridos imperfectamente emparejados, la temperatura de fusión se reduce aproximadamente 1°C por cada 1% desparejado.

60 El término "condiciones moderadamente restrictivas" se refiere a condiciones en las que un dúplex de ADN con un grado mayor de desapareamiento de los pares de bases del que podría producirse en "condiciones muy restrictivas" es capaz de formar. Los ejemplos de "condiciones moderadamente restrictivas" típicos son cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M a 50-65°C o cloruro de sodio 0,015 M, citrato de sodio 0,0015 M, y formamida al 20% a 37-50°C. Por medio de ejemplo, una condición "moderadamente restrictiva" de 50°C en ión de sodio 0,015 M permitirá 65 aproximadamente un 21% de desapareamiento.

65 La persona experta en la técnica apreciará que no existe distinción absoluta entre las condiciones "muy" y "moderadamente restrictivas". Por ejemplo, a ión sodio 0,015 M (sin formamida), la temperatura de fusión del ADN largo perfectamente emparejado es aproximadamente de 71°C. Con un lavado a 65°C (a la misma fuerza iónica), esto podría

## ES 2 327 102 T3

permitir un desapareamiento del 6%. Para capturar más secuencias lejanamente relacionadas, una persona experta en la técnica puede simplemente disminuir la temperatura o aumentar la fuerza iónica.

5 Se proporciona una buena estimación de la temperatura de fusión en NaCl\* 1 M para las sondas de oligonucleótidos de hasta aproximadamente 20 nucleótidos por:

$$T_m = 2^\circ\text{C por par de bases A-T} + 4^\circ\text{C por par de bases G-C}$$

10 \* La concentración del ión sodio en sal de citrato de sodio 6X (SSC) es 1 M. Véase Suggs y col., Developmental Biology Using Purified Genes, p. 683, Brown and Fox (eds.) (1981).

Las condiciones de lavado con restricción elevada de los oligonucleótidos son normalmente a una temperatura de 0-5°C por debajo de la  $T_m$  del oligonucleótido en SSC 6x, SDS al 0,1% para los oligonucleótidos más largos.

15 En otra forma de realización, las moléculas de ácidos nucleicos relacionadas comprenden o están constituidas por una secuencia de nucleótidos que es aproximadamente un 70 por ciento (70%) idéntica a la secuencia de nucleótidos que se define en la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15, o comprende o está constituida esencialmente por una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que es aproximadamente un 70 por ciento (70%) idéntico al polipéptido que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16. En las formas de realización preferidas, las secuencias de nucleótidos son aproximadamente el 75 por ciento, o aproximadamente el 80 por ciento, o aproximadamente el 85 por ciento, o aproximadamente el 90 por ciento, o aproximadamente el 95, 96, 97, 98, ó 99 por ciento idénticas a la secuencia de nucleótidos que se define en la SEC DE ID Nº: 1, o la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que es aproximadamente el 75 por ciento, o aproximadamente el 80 por ciento, o aproximadamente el 85 por ciento, o aproximadamente el 90 por ciento, o aproximadamente el 95, 96, 97, 98, ó 99 idéntica a la secuencia del polipéptido que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

30 Las diferencias en la secuencia de ácido nucleico pueden dar como resultado modificaciones conservativas y/o no conservativas de la secuencia de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

35 Las modificaciones conservativas en la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16 (y que corresponden a las modificaciones en los nucleótidos que codifican) producirán polipéptidos MK61 que tienen características funcionales y químicas similares a aquellas de un polipéptido MK61 que se produce naturalmente. Por el contrario, se pueden llevar a cabo modificaciones sustanciales en las características funcionales y/o químicas de los polipéptidos MK61 seleccionando las sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16 que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento (a) de la estructura del esqueleto molecular en el área de la sustitución, por ejemplo, una conformación en lámina o hélice, (b) la carga de hidrofobia de la molécula en el emplazamiento diana, o (c) el volumen de la cadena secundaria.

45 Por ejemplo, una "sustitución conservativa de aminoácidos" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácidos natural con un residuo no natural, de tal manera que existe poco o ningún efecto sobre la polaridad o la carga del residuo de aminoácidos en la posición. Además, cualquier residuo natural en el polipéptido se puede sustituir también con alanina, como se ha descrito anteriormente para la "mutagénesis con escaneo de alanina".

50 Las sustituciones conservativas de aminoácidos abarcan también los restos de aminoácidos que no se producen naturalmente que se incorporan normalmente mediante síntesis química de péptidos más bien que mediante síntesis en sistemas biológicos. Estos incluyen los péptidomiméticos y otras formas inversas o invertidas de los restos de aminoácidos.

55 Los restos que se producen naturalmente se pueden dividir en clases basadas en las propiedades comunes de las cadenas secundarias:

- 1) hidrófobos. Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) hidrófilos neutros, Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- 3) ácidos, Asp, Glu;
- 4) básicos. His, Lys, Arg;
- 5) restos que influencian la orientación de la cadena. Gly, Pro; y
- 6) Aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

## ES 2 327 102 T3

Por ejemplo, las sustituciones no conservativas pueden implicar el intercambio de un miembro de una de estas clases por un miembro de otra clase. Dichos restos sustituidos se pueden introducir en las regiones del polipéptido MK61 humano que son homólogas, o de manera similar, con los ortólogos no humanos del polipéptido MK61, o en las regiones no homólogas de la molécula.

5 En la fabricación de dichos cambios, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos. Se ha asignado a cada aminoácido un índice hidropático en función de sus características de hidrofobia y carga. Son: isoleucina (+ 4,5); valina (+ 4,2); leucina (+ 3,8); fenilalanina (+ 2,8); cisteína/cistina (+ 2,5); metionina (+ 1,9); alanina (+ 1,8); glicina (- 0,4); treonina (- 0,7); serina (- 0,8); triptófano (- 0,9); tirosina (- 1,3); prolina (- 1,6); histidina (- 3,2); glutamato (- 3,5); glutamina (- 3,5); aspartato (- 3,5); asparagina (- 3,5); lisina (- 3,9); y arginina (- 4,5).

10 Se entiende en la técnica la importancia del índice hidropático de los aminoácidos para conferir función interactiva biológica a una proteína. Kyte y col., J. Mol. Biol., 157: 105-131 (1982). Se sabe que algunos aminoácidos se pueden sustituir por otros aminoácidos que tienen índice o puntuación hidropática similar y retendrán aún una actividad biológica similar. En la fabricación de los cambios basados en el índice hidropático, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están comprendidos dentro de  $\pm 2$ , se prefieren particularmente aquellos que están comprendidos dentro de  $\pm 1$ , y son incluso más particularmente preferidos aquellos que están comprendidos dentro de  $\pm 0,5$ .

15 20 Se entiende también en la técnica que se puede realizar eficazmente la sustitución de aminoácidos similares en función de la hidrofobia, concretamente cuando se pretende crear por tanto la proteína o el péptido equivalente biológicamente funcional, en parte, para uso en las formas de realización inmunológicas, como en el presente caso. La hidrofilia promedio local más alta de una proteína, que está gobernada por la hidrofilia de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con su inmunogenia y antigenia, *es decir*, con una propiedad biológica de la proteína.

25 30 35 Se han asignado los siguientes valores de hidrofilia a estos restos de aminoácidos. Arginina (+ 3,0); lisina (+ 3,0); aspartato (+ 3,0  $\pm$  1); glutamato (+ 3,0  $\pm$  1); serina (+ 0,3); asparagina (+ 0,2); glutamina (+ 0,2); glicina (0); treonina (- 0,4); prolina (- 0,5  $\pm$  1); alanina (- 0,5); histidina (- 0,5); cisteína (- 1,0); metionina (- 1,3); valina (- 1,5); leucina (- 1,8); isoleucina (- 1,8); tirosina (- 2,3); fenilalanina (- 2,5) y triptófano (- 3,4). En la realización de los cambios basados en valores similares de hidrofilia, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofilia están comprendidos dentro de  $\pm 2$ , se prefieren particularmente aquellos que están comprendidos dentro de  $\pm 1$ , e incluso se prefieren más particularmente aquellos que están comprendidos dentro de  $\pm 0,5$ . Se pueden identificar también los epitopos de las secuencias de aminoácidos primarias en función de la hidrofilia. Estas regiones se denominan también como "regiones núcleo epítópicas". La persona experta en la técnica puede determinar las sustituciones de aminoácidos deseadas (tanto conservativas como no conservativas) en el momento en el que se desean dichas sustituciones. Por ejemplo, se pueden usar las sustituciones de aminoácidos para identificar restos importantes del polipéptido MK61, o para aumentar o disminuir la afinidad de los polipéptidos MK61 por sus sustratos, descritos en el presente documento.

40 En la Tabla I se muestran las sustituciones de aminoácidos a modo de ejemplo.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

## ES 2 327 102 T3

TABLA I

Sustituciones de aminoácidos		
Restos originales	Sustituciones a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucina	Leu
Leu	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Ácido 1,4 diaminobutírico, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucina	Leu

Un técnico experto será capaz de determinar las variantes adecuadas del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2 usando técnicas bien conocidas. Para identificar las áreas adecuadas de la molécula que se pueden cambiar sin destruir la actividad, una persona experta en la técnica puede dirigirse a las áreas que no cree que sean importantes para la actividad. Por ejemplo, cuando se conocen polipéptidos similares con actividades similares de la misma especie o de otras especies, una persona experta en la técnica puede comparar la secuencia de aminoácidos del polipéptido MK61 con dichos polipéptidos similares. Con dicha comparación, se pueden identificar los restos y porciones de las moléculas que se conservan entre polipéptidos similares. Se apreciará sería menos probable que los cambios en las áreas de un polipéptido MK61 que no se conservasen respecto de dichos polipéptido similares afectaran adversamente la actividad biológica y/o la estructura del polipéptido MK61. Una persona experta en la técnica podría saber también que, incluso en las regiones relativamente conservadas, se pueden sustituir químicamente los aminoácidos similares por los restos que se producen naturalmente reteniendo al mismo tiempo la actividad (sustituciones conservativas de los aminoácidos). Por tanto, incluso las áreas que pueden ser importantes para la actividad biológica o para la estructura pueden estar sujetas a las sustituciones conservativas de los aminoácidos sin destruir la actividad biológica o sin afectar adversamente la estructura del polipéptido.

Adicionalmente, una persona experta en la técnica puede revisar los estudios de estructura-función identificando los restos en polipéptidos similares que son importantes para la actividad o la estructura. A la vista de dicha comparación, se puede predecir la importancia de los restos de aminoácidos en un polipéptido MK61 que corresponden a los restos de aminoácidos que son importantes para la actividad o estructura en polipéptidos similares, una persona experta en la técnica puede optar por sustituciones de aminoácidos químicamente similares para dichos restos de aminoácidos importantes predichos de los polipéptidos MK61.

Una persona experta en la técnica puede analizar también la estructura tridimensional y la secuencia de aminoácidos en relación con esta estructura en polipéptidos similares. A la vista de dicha información, una persona experta en la técnica puede predecir la alineación de los restos de aminoácidos de un polipéptido MK61 con respecto a su estructura tridimensional. Una persona experta en la técnica puede elegir no hacer cambios radicales en los restos de

- 5 aminoácidos predichos que están en la superficie de la proteína, debido a que dichos restos pueden estar implicados en importantes interacciones con otras moléculas. Además, una persona experta en la técnica puede generar variantes de ensayo que contengan una única sustitución de aminoácido en cada residuo de aminoácido deseado. Se pueden seleccionar a continuación las variantes usando ensayos de actividad conocidos por las personas expertas en la técnica. Se deberían usar dichas variantes para reunir información acerca de las variantes adecuadas. Por ejemplo, si se descubre  
10 que un cambio en un residuo de aminoácido concreto da como resultado la destrucción, la reducción indeseable o una actividad inadecuada, deberían evitarse las variantes con dicho cambio. En otras palabras, basándose en la información reunida procedente de dichos experimentos rutinarios, una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente los aminoácidos en los que deberían evitarse las sustituciones adicionales tanto solo como en combinación con otras mutaciones.

- 15 Se pueden determinar los análogos del polipéptido MK61 de la invención comparando la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos MK61 con los miembros de la familia relacionados. Los miembros de la familia relacionados con el polipéptido MK61 a modo de ejemplo pueden incluir, pero no se limitan a, los miembros de la familia del receptor de TNF tales como Mrank (SEC DE ID Nº: 17), los miembros de la familia del receptor del ligando de Fas tales como  
20 Mfsar (SEC DE ID Nº: 18) y los miembros de la familia del receptor de la linfoxina-beta tales como TNFrc (SEC DE ID Nº: 19). Se puede llevar a cabo esta comparación usando una alineación Pileup (Wisconsin GCG Program Package, ver. 8.1, que se muestra en las Figuras 10, 11 y 12) o una comparación equivalente (solapamiento) con múltiples miembros de la familia comprendidos dentro de las regiones conservada y no conservada. Tal como se muestra en las  
25 Figuras 10-12, la secuencia de aminoácidos predicha de un polipéptido MK61 (SEC DE ID Nº: 14) se alinea con la secuencia de aminoácidos de Mrank (SEC DE ID Nº: 17), Mfsar (SEC DE ID Nº: 18) y Tnfrc/SEC DE ID Nº: 19), respectivamente.

- Las personas expertas en la técnica pueden identificar otros análogos del polipéptido MK61 usando estos y otros procedimientos. Estas secuencias de solapamiento proporcionan una directriz para las sustituciones de aminoácidos  
30 conservativas y no conservativas dando como resultado análogos de MK61 adicionales. Se apreciará que estas sustituciones de aminoácidos pueden estar constituidas por aminoácidos que se producen naturalmente o que no se producen naturalmente. Por ejemplo, las alineaciones representadas gráficamente en las Figuras 10-12 indican análogos de MK61 potenciales que pueden tener el residuo de Cys en la posición 38, 39, 6 51 de las SEC DE ID Nºs: 2, 4, 6, 8, 10 y 12 sustituido con un residuo de Ser o Ala; el residuo de Cys en la posición 60 ó 76 de las SEC DE ID Nºs: 2 y  
35 6 sustituido con un residuo de Ser o Ala; el residuo de Cys en la posición 41, 42, 54, 63 ó 79 de las SEC DE ID Nºs 14 y 16 sustituido con un residuo de Ser o Ala; el residuo de Ieu en la posición 171 ó 172 de las SEC DE ID Nºs: 2 sustituido con un residuo de norleucina, Ile, Val, Met, Ala o Phe; y el residuo de Gly en la posición 141 de la SEC DE ID Nº: 14 ó 16 sustituido con un residuo de Pro o Ala.

- 40 Numerosas publicaciones científicas se han dedicado a la predicción de la estructura secundaria. Véanse Moult J., Curr. Op. in Biotech., 7(4): 422-427 (1996), Chou y col., Biochemistry, 13(2): 222-245 (1974); Chou y col., Biochemistry, 113 (2): 211-222 (1974); Chou y col., Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47: 45-148 (1978); Chou y col., Ann. Rev. Biochem., 47: 251-276 and Chou y col., Biophys. J., 26: 367-384 (1979). Además, están disponibles actualmente programas informáticos para ayudar en la predicción de la estructura secundaria. Un procedimiento para predecir la estructura secundaria se basa en la modelación de la homología. Por ejemplo, dos polipéptidos o proteínas que tienen una identidad de la secuencia mayor de un 30%, o similarmente mayor de un 40% tienen a menudo topologías estructurales similares: El reciente crecimiento de las bases de datos estructurales de proteínas (PDB) ha proporcionado una mejora de la predictibilidad de la estructura secundaria, incluyendo el número potencial de pliegues dentro de una estructura de polipéptido o proteína. Véase Holm y col., Nucl. Acid. Res., 27(1): 244-247 (1999). Se  
45 ha sugerido (Brenner y col., Curr. Op. Struct. Biol., 7(3): 369-376 (1997)) que existen un número limitado de pliegues en polipéptido o proteína dado y que una vez que se han resuelto un número crítico de estructuras, la predicción estructural será mucho más precisa.

- 50 Los procedimientos adicionales para predecir la estructura secundaria incluyen el “enhebrado” (Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7(3): 377-87 (1997); Sippl y col., Structure, 4(1): 15-19 (1996)), el “análisis del perfil” (Bowie y col., Science, 253: 164-170 (1991); Gribskov y col., Meth. Enzym., 183: 146-159 (1990); Gribskov y col., Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13): 4355-4358 (1987)), y el “enlace evolucionario” (Véase Holm, más arriba (1999), y Brenner, más arriba (1997)).

- 55 Las variantes preferidas del polipéptido MK61 incluyen las variantes de glicosilación en las que el número y/o el tipo de emplazamiento de glicosilación se ha alterado en comparación con la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16. En una forma de realización, las variantes del polipéptido MK61 comprenden un número mayor o menor de emplazamientos de glicosilación unidos a N que el de la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16. Un emplazamiento de glicosilación unido a N se caracteriza por la secuencia Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, en el que el residuo de aminoácido designado como X puede ser cualquier residuo de aminoácido excepto prolina. La sustitución de los restos de aminoácidos para crear esta secuencia proporciona

un nuevo emplazamiento potencial para la adición de una cadena de carbohidrato unida a N. Alternativamente, las sustituciones que eliminan esta secuencia eliminarán una cadena de carbohidrato unida a N existente. Se proporciona también una recolocación de las cadenas de carbohidrato unidas a N en las que se eliminan uno o más emplazamientos de glicosilación unidos a N (normalmente aquellos que se producen naturalmente) y se crean uno o más nuevos emplazamientos unidos a N. las variantes de MK61 preferidas adicionales incluyen variantes de cisteína en las que se eliminan uno o más restos de cisteína de o se sustituyen por otro aminoácido (*por ejemplo*, serina) en comparación con la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16. Las variantes de cisteína cuando se deben replegar los polipéptidos de MK61 en una conformación biológicamente activa tal como después del aislamiento de cuerpos de inclusión insolubles. Las variantes de cisteína tienen generalmente menos restos de cisteína que la proteína natural, y normalmente tienen incluso numerosos para minimizar las interacciones que resultan de las cisteínas desparejadas.

La invención proporciona además polipéptidos que comprenden una porción que soporta un epitopo de una proteína que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16. El término “epitopo” se refiere a una región de una proteína a la cual se puede unir un anticuerpo. Véase *por ejemplo*, Geysen y col., PNAS, EE.UU. 81: 3998-4002 (1984). Los epitopos pueden ser lineales o conformacionales, estando los últimos compuestos por regiones discontinuas de la proteína que forman un epitopo tras el plegado de la proteína. Los epitopos lineales tienen al menos 6 restos de aminoácidos de longitud. Los péptidos sintéticos relativamente cortos que mimetizan parte de una secuencia de la proteína son rutinariamente capaces de estimular un antisuero que reacciona con la proteína parcialmente mimetizada. Véase, Sutcliffe y col., Science 219: 660-666 (1983). Los anticuerpos que reconocen los epitopos lineales cortos son particularmente útiles en las aplicaciones analíticas y diagnósticas que emplean proteína desnaturizada, tales como la transferencia Western. Véase Tobin, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 76: 4350-4356 (1979). Los anticuerpos de los péptidos cortos pueden reconocer también proteínas en la conformación natural y de esta manera serán útiles para monitorizar la expresión de la proteína y el aislamiento de la proteína, y en detectar las proteínas MK61 en solución, tal como mediante ELISA O en estudios de inmunoprecipitación.

Además, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, o una variante del polipéptido MK61 se puede fusionar con un polipéptido homólogo para formar un homodímero o a un polipéptido heterólogo para formar un heterodímero. Los péptidos y polipéptidos heterólogos incluyen, pero no se limitan a: un epitopo para permitir la detección y/o el aislamiento de un polipéptido de fusión MK61; una proteína del receptor transmembrana o una porción de la misma, tal como una región extracelular, o una región transmembrana e intracelular; un ligando o una porción del mismo que se une a una proteína del receptor transmembrana; una enzima o una porción del mismo que es catalíticamente activa; o polipéptido o péptido que promueve la oligomerización, tal como una región cremallera de leucina; un polipéptido o péptido que aumenta la estabilidad, tal como una región constante de inmunoglobulina; y un polipéptido que tiene una actividad terapéutica diferente de la del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, o una variante del polipéptido MK61.

Se pueden hacer fusiones tanto en el término amino como en el término carboxi de los polipéptidos que comprende la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o una variante del polipéptido MK61. Las fusiones pueden ser directas con una molécula no ligante o adaptadora, o indirectas usando una molécula ligante o adaptadora. Una molécula ligante o adaptadora puede ser uno o más restos de aminoácidos, normalmente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 restos de aminoácidos. Se puede diseñar también una molécula ligante o adaptadora con un emplazamiento de escisión para una endonucleasa de restricción del ADN en un polinucleótido de codificación o para una proteasa para permitir la separación de los restos fusionados. Se apreciará que una vez construidos se pueden derivatizar los polipéptidos de fusión de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento.

En una forma de realización adicional de la invención, el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o una variante del polipéptido MK61 se fusiona con una o más regiones de una región Fc de la IgG humana. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, una región variable conocida como “Fab”, que se une a los antígenos, y una región constante conocida como “Fc”, que está implicada en las funciones efectoras tales como la activación del complemento y el ataque mediante células fagocíticas. Una Fc tiene una larga semivida en suero, mientras que una Fab es de vida corta. Capon y col., Nature, 337: 525-31 (1989). Cuando se construye conjuntamente con una proteína terapéutica, una región Fc puede proporcionar semivida más larga o incorporar dichas funciones como la unión del receptor de Fc, la unión de la proteína A, la fijación del complemento y quizás incluso la transferencia placental. Igualmente, la Tabla II resume el uso de algunas fusiones Fc conocidas en la técnica.

## ES 2 327 102 T3

TABLA II

<u>Fusión Fc con proteínas terapéuticas</u>				
	<b>Forma de Fc</b>	<b>Pareja de fusión</b>	<b>Implicaciones terapéuticas</b>	<b>Referencia</b>
5	IgG1	Término N de CD30-L Enfermedad de Hodgkin	Linfoma anaplásico; leucemia de células T	Patente de los Estados Unidos Nº 5.480.981
10	Fc $\gamma$ 2a murino	IL-10	Antiinflamatorio; rechazo al trasplante	Zheng y col. (1995), J. Immunol., 154: 5590- 5600
15	IgG1	Receptor de TNF	Shock séptico	Fisher y col. (1996), N. Engl. J. Med., 334: 1697-1702; Van Zee y col., (1996), J. Immunol., 156: 2221- 2230
20	IgG, IgA, IgM, o IgE (excluyendo la primera región)	Receptor de TNF	Inflamación, trastornos autoinmunes	Patente de los Estados Unidos nº 5.808.029, otorgada el 15 de septiembre de 1998
25	IgG1	Receptor de CD4	SIDA	Capon y col. (1989), Nature 337: 525-531
30	IgG1, IgG3	Término N de IL-2	Anticanceroso, antivírico	Harvill y col. (1995), Immunotech., 1: 95- 105
35	IgG1	Término C de OPG	Osteoartritis; densidad ósea	Documento WO 97/23614, publicado el 3 de Julio de 1997
40	IgG1	Término N de leptina	Antioobesidad	Documento PCT/US 97/23183, presentado el 11 de Diciembre de 1997
45	Ig Cy1 humana	CTLA-4	Trastornos autoinmunes	Linsley (1991), J. Exp. Med., 174: 561-569
50				
55				
60				
65				

## ES 2 327 102 T3

En un ejemplo, toda o una porción de la bisagra IgG humana, las regiones CH2 y CH3 se pueden fusionar en cualquiera del término N o el término C de los polipéptidos MK61 usando procedimientos conocidos por el técnico experto. El polipéptido de fusión MK61 resultante se puede purificar mediante el uso de una columna de afinidad de la Proteína A. Se ha encontrado que los péptidos y proteínas fusionados con una región Fc presentan una semivida sustancialmente mayor *in vivo* que la contraparte no fusionada. También, una fusión en una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión: La región Fc puede ser una región Fc que se produce naturalmente o puede estar alterada para mejoras algunas calidades, tales como las calidades terapéuticas, el tiempo de circulación, reducir la agregación, etc.

Se puede calcular fácilmente la identidad y la similitud de las moléculas de ácido nucleico y polipéptido relacionados mediante procedimientos conocidos. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, Nueva York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press (1987); Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York (1991); y Carillo y col., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Los procedimientos preferidos para determinar la identidad y/o similitud se diseñan para proporcionar el mayor emparejamiento entre las secuencias ensayadas. Los procedimientos para determinar la identidad y similitud se describen en los programas informáticos de libre disposición. Los procedimientos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan, el paquete del programa GCG, que incluye GAP (Devereux y col., Nucl. Acid. Res., 12: 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul y col., J. Mol. Biol., 215: 403-410 (1990)). El programa BLASTX es de libre disposición del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul y col. NCB/NLM/NIH Bethesda, MD 20894; Altschul y col., más arriba (1990)). Se puede usar también el algoritmo Smith Waterman bien conocido para determinar la identidad.

Algunos esquemas de alineación para alinear dos secuencias de aminoácidos pueden dar como resultado el emparejamiento de sólo una corta región de dos secuencias, y esta pequeña región alineada puede tener una identidad de la secuencia muy elevada incluso aunque no existan relaciones significativas entre las dos secuencias de longitud completa. De acuerdo con esto, en una forma de realización preferida el procedimiento de alineación seleccionado (programa GAP) dará como resultado una alineación que se extiende al menos 50 aminoácidos contiguos del polipéptido diana.

Por ejemplo, usando el algoritmo informático GAP (Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin, Madison, WI), dos polipéptidos para los cuales el porcentaje de identidad de la secuencia que se va a determinar se alinean para un emparejamiento óptimo de sus aminoácidos respectivos (el “tramo emparejado”, tal como se determina mediante el algoritmo). Se usan una penalización por creación de huecos (que se calcula como 3 x la diagonal promedio; la “diagonal promedio” es el promedio de la diagonal de la matriz de comparación que se está usando; la “diagonal” es la puntuación o número asignado a cada emparejamiento de aminoácidos perfecto mediante la matriz de comparación concreta) y una penalización por extensión de huecos (que es usualmente 1/10 veces la penalización por creación de huecos), así como una matriz de comparación tal como PAM 250 o BLOSUM 62 en conjunción con el algoritmo. Se usa también una matriz de comparación estándar (véase Dayhoff y col., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5 (3) (1978) para la matriz de comparación PAM 250; Henikoff y col., Proc. Natl. Acad. Sci EE.UU., 89: 10915-10919 (1992) para la matriz de comparación BLOSUM 62) mediante el algoritmo.

Los parámetros preferidos para una comparación de secuencias del polipéptido incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y col., J. Mol. Biol., 48: 443-453 (1970);

Matriz de comparación: BLOSUM 62 de Henikoff y col., más arriba (1992);

Penalización por hueco: 12

Penalización por longitud de hueco: 4

Umbral de similitud: 0

El programa GAP es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriormente mencionados son parámetros por defecto para las comparaciones de polipéptidos (junto con no penalizaciones para los huecos de los extremos) que usan el algoritmo GAP.

Los parámetros preferidos para las comparaciones de moléculas de ácido nucleico incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y col., más arriba (1970);

Matriz de comparación: emparejadas = + 10, desapareamiento = 0

## ES 2 327 102 T3

Penalización por hueco: 50

Penalización por longitud de hueco: 3

5

El programa GAP es también útil con los parámetros anteriores. Los parámetros anteriormente mencionados son parámetros por defecto para las comparaciones de moléculas de ácido nucleico.

10 La persona experta en la técnica puede usar otros algoritmos a modo de ejemplo, penalizaciones por creación de huecos, penalizaciones por extensión de huecos, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc., que incluyen aquellos que se muestra en el Manual del Programa, paquete Wisconsin, versión 9, septiembre de 1997. La elección concreta que se vaya a hacer será evidente para la persona experta en la técnica y dependerá de la comparación específica que se va a hacer, tal como ADN a ADN, proteína a proteína, proteína a ADN; y adicionalmente, si la comparación es entre pares dados de secuencias (en cuyo caso se prefieren generalmente GAP o BestFit) o entre una 15 secuencia y una gran base de datos de secuencias (en cuyo caso se prefieren FASTA O BLASTA).

### Síntesis

20 Aquellas personas expertas en la técnica apreciarán que se pueden producir las moléculas de ácido nucleico y polipéptido descritas en el presente documento mediante técnicas recombinantes y otros medios.

### Moléculas de ácido nucleico

25 Las moléculas de ácido nucleico codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61 y se pueden obtener fácilmente por una variedad de medios que incluyen, sin limitación, síntesis química, selección de bibliotecas de ADNc o genómica, selección de la biblioteca de expresión y/o amplificación del ADNc mediante la PCR.

30 Los procedimientos de ADN recombinante usados en el presente documento son generalmente aquellos que se muestran en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), y/o en Ausubel y col., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishers Inc. y Wiley and Sons, NY (1994). La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento y los procedimientos para obtener dichas moléculas.

35 Cuando se ha identificado un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61 procedente de una especie, se puede usar todo o una porción de este gen como una sonda para identificar los ortólogos o genes relacionados de la misma especie. Se pueden usar sondas o cebadores para seleccionar bibliotecas de ADNc procedentes de diversas fuentes de tejido que se cree que expresan el polipéptido MK61. Además, se puede usar parte o toda la molécula de ácido nucleico de la secuencia que se define en la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 40 5, SEC DE ID Nº 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15 para seleccionar una biblioteca genómica para identificar un gen aislado que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61. Normalmente, se emplearán en la selección condiciones de restricción moderada o elevada para minimizar el número de falsos positivos obtenidos de la selección.

45 Se pueden identificar también las moléculas de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos MK61 mediante la clonación de la expresión que emplea la detección de clones positivos basándose en una propiedad de la proteína expresada. Normalmente, se seleccionan las bibliotecas de ácido nucleico mediante la unión de un anticuerpo u otra pareja de unión (*por ejemplo*, receptor o ligando) con las proteínas clonadas que se expresan y se muestran en la superficie de una célula huésped: El anticuerpo o pareja de unión se modifica con una marca detectable para identificar aquellas células que expresan el clon deseado.

55 Se pueden seguir las técnicas de expresión recombinante llevadas a cabo de acuerdo con las descripciones que se establecen a continuación para producir estos polinucleótidos y para expresar los polipéptidos codificados. Por ejemplo, insertando una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61 en un vector apropiado, una persona experta en la técnica produce fácilmente grandes cantidades de la secuencia de nucleótidos deseada. A continuación se pueden usar las secuencias para generar sondas de detección o cebadores de amplificación. Alternativamente, se puede insertar un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61 en un vector de expresión. Introduciendo el vector de expresión en un huésped apropiado, se puede producir el polipéptido MK61 codificado en grandes cantidades.

60

65 Otro procedimiento para obtener una secuencia de ácido nucleico adecuada es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En este procedimiento, se prepara ADN a partir de poli(A) + ARN o ARN total usando el enzima transcriptasa inversa. Dos cebadores de oligonucleótidos, normalmente complementarios de dos regiones separadas de ADNc (oligonucleótidos) codifican la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61, a continuación se añaden al ADNc junto con una polimerasa tal como polimerasa Taq, y la polimerasa amplifica la región del ADNc entre los dos cebadores.

Otras medios de preparar una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61 es la síntesis química usando procedimientos bien conocidos por el técnico experto, tales como los descritos por Engels y col., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 28: 716-734 (1989). Estos procedimientos incluyen, *entre otros*, los procedimientos del fosfotriéster, la fosforamidita y el H-fosfonato para la síntesis de ácido nucleico. Un procedimiento preferido para dicha síntesis química es la síntesis soportada por polímero usando la química estándar de la fosforamidita. Normalmente, el ADN codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61 con algunos cientos de nucleótidos de longitud. Se pueden sintetizar ácidos nucleicos de tamaño superior a aproximadamente 100 nucleótidos en forma de fragmentos diferenciados usando estos procedimientos. A continuación los fragmentos se pueden unir entre sí para formar la secuencia de nucleótidos de longitud completa de un polipéptido MK61. Normalmente, el fragmento de ADN que codifica el término amino del polipéptido tendrá un ATG, que codifica un residuo de metionina. Esta metionina puede estar presente o no en la forma madura del polipéptido Mk61, dependiendo de si el polipéptido producido en la célula huésped se diseña para que se segregue a partir de esta célula. Se pueden usar igualmente otros procedimientos conocidos por el técnico experto.

En algunas formas de realización, las variantes de ácido nucleico contienen codones que se han alterado para la expresión óptima de un polipéptido MK61 en una célula huésped dada. Las alteraciones concretas del codón dependerán del(de los) polipéptido(s) MK61 y de la(s) célula(s) huésped seleccionadas para la expresión. Dicha "optimización del codón" se puede llevar a cabo mediante una variedad de procedimientos, por ejemplo, seleccionando los codones que se prefieren para el uso en genes muy expresados en una célula huésped dada. Se pueden usar los algoritmos informáticos que incorporan tablas de frecuencia de codones tales como "Ecohigh.cod" para la preferencia del codón de genes bacterianos fuertemente expresados y proporcionados en la University of Wisconsin Package Versión 9.0, Genetics Computer Group, Madison, WI. Otras tablas útiles de frecuencia de codones incluyen "Celegans\_high.cod", "Celegans\_low.cod", "Drosophila\_high.cod", "Human\_high.cod", "Maize\_high.cod", y "Yeast\_high.cod".

## 25 Vectores y células huésped

Se puede insertar una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61 en un vector de expresión apropiado usando técnicas de ligadura estándar. El vector se selecciona normalmente para que sea funcional en la célula huésped concreta empleada (*es decir*, el vector es compatible con la maquinaria de la célula huésped de tal manera que se puede producir la amplificación del gen y/o la expresión del gen). Se puede amplificar/expresar una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de un polipéptido MK61 en células huésped procariotas, de levadura, de insecto (sistemas de baculovirus), y/o eucariotas. La selección de la célula huésped dependerá en parte de si se va a modificar post-traduccionalmente un polipéptido MK61 (por ejemplo, glicosilado y/o fosforilado). Si acaso, son preferibles las células huésped de levaduras, insectos, o mamíferos. Para una revisión de los vectores de expresión, véase *Meth. Enz.*, vol. 185, D. V. Goeddel, ed., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990).

Normalmente, los vectores de expresión usados en cualquiera de las células huésped contendrán secuencias para el mantenimiento del plásmido y para la clonación y expresión de las secuencias de nucleótidos exógenas. Dichas secuencias, denominadas colectivamente como "secuencias de flanqueo" en algunas formas de realización, incluirán normalmente una o más de las siguientes secuencias de nucleótidos: un promotor, una o más secuencias potenciadoras, un origen de la replicación, una secuencia de terminación transcripcional, una secuencia intrón completa que contiene un emplazamiento de corte y empalme donante y aceptor, una secuencia que codifica una secuencia líder para la secreción del polipéptido, un emplazamiento de unión con el ribosoma, una secuencia de poliadenilación, una región poliligante para insertar el ácido nucleico que codifica el polipéptido que se va a expresar, y un elemento marcador seleccionable. Se describen a continuación cada una de estas secuencias.

Opcionalmente, el vector puede contener una secuencia que codifica una "etiqueta", *es decir*, una molécula de oligonucleótido localizada en el extremo 5' o 3' del polipéptido MK61 de la secuencia de codificación; la secuencia del oligonucleótido codifica poliHis (tal como hexaHis), u otra "etiqueta" tal como FLAG, HA (hemaglutinina del virus de la gripe) o myc para la cual existen anticuerpos comercialmente disponibles. Esta etiqueta se fusiona normalmente con el polipéptido tras la expresión del polipéptido, y puede servir como medio para la purificación por afinidad del polipéptido MK61 a partir de la célula huésped. Se puede llevar a cabo la purificación por afinidad, por ejemplo, mediante cromatografía en columna usando anticuerpos contra la etiqueta como una matriz de afinidad. Opcionalmente, se puede eliminar la etiqueta posteriormente a partir del polipéptido MK61 purificado por diversos medios tales como usando algunas peptidasas para la rotura.

Las secuencias de flanqueo pueden ser homólogas (*es decir*, procedentes de la misma especie y/o cepa como la célula huésped), heterólogas (*es decir*, procedentes de una especie diferente de la especie o cepa huésped), híbrida (*es decir*, una combinación de secuencias de flanqueo procedentes de más de una fuente) o sintética, o las secuencias de flanqueo pueden ser secuencias naturales cuya función regula normalmente la expresión del polipéptido MK61. De esta manera, la fuente de una secuencia de flanqueo puede ser cualquier organismo procariota o eucariota, cualquier organismo vertebrado o invertebrado, o cualquier planta, con la condición de que la secuencia de flanqueo sea funcional en, y pueda activarse por, la maquinaria de la célula huésped.

Se pueden obtener las secuencias de flanqueo útiles en los vectores de esta invención mediante cualquiera de los diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Normalmente, las secuencias de flanqueo útiles en la presente invención diferentes de las secuencias de flanqueo del gen MK61 endógeno se habrán identificado previamente me-

diante mapeado y/o mediante digestión con endonucleasa de restricción y pueden aislarse de esta manera a partir de la fuente de tejido apropiada usando las endonucleasas de restricción apropiadas. En algunos casos, se puede conocer la secuencia de nucleótidos completa de una secuencia de flanqueo. Aquí, se puede sintetizar la secuencia de flanqueo usando los procedimientos descritos en el presente documento para la síntesis o la clonación de ácido nucleico.

5 Cuando se conoce toda o únicamente una porción de la secuencia de flanqueo, se puede obtener ésta usando la PCR y/o seleccionando una biblioteca genómica con oligonucleótidos adecuados y/o fragmentos de la secuencia de flanqueo procedentes de la misma u otra especie. Cuando no se conoce la secuencia de flanqueo, se puede aislar un fragmento de ADN que contiene una secuencia de flanqueo a partir de una pieza más grande de ADN que puede 10 contener, por ejemplo, una secuencia de codificación o incluso otro gen o genes. Se puede llevar a cabo el aislamiento mediante digestión con endonucleasa de restricción para producir el fragmento de ADN apropiado seguido por aislamiento usando la purificación con gel de agarosa, cromatografía en columna Qiagen® (Chatsworth, CA) u otros procedimientos conocidos por el técnico experto. La selección de los enzimas adecuados para llevar a cabo este 15 objetivo será fácilmente evidente para una persona normalmente experta en la técnica.

15 Un origen de replicación es normalmente una parte de aquellos vectores de expresión procariota adquiridos comercialmente, y el origen ayuda en la amplificación del vector de la célula huésped. La amplificación del vector hasta un cierto número de copias puede, en algunos casos, ser importante para la expresión óptima de un polipéptido MK61. Si el vector de elección no contiene un origen del emplazamiento de replicación, se puede sintetizar químicamente en 20 función de una secuencia conocida, y ligarse al vector. Por ejemplo, el origen de replicación procedente del plásmido pBR322 (Producto Nº 303-3s, New Englands Biolabs, Beverly, MA) es adecuado para la mayor parte de bacterias gram negativas, y diversos orígenes (*por ejemplo*, SV40, polioma, adenovirus, virus de la estomatitis vesicular (VSV) o papilomavirus tales como VPH o VPB) son útiles para la clonación de vectores en células de mamíferos. Generalmente, el origen del componente de replicación no es necesario para los vectores de expresión en mamíferos (*por 25 ejemplo*, el origen de SV40 se usa a menudo únicamente dado que contiene el promotor temprano).

Una secuencia de terminación de la transcripción se localiza normalmente en la dirección 3' respecto del extremo de una región de codificación del polipéptido y sirve para terminar la transcripción. Usualmente, la secuencia de terminación de la transcripción en células procariotas es un fragmento rico en G-C seguido por una secuencia poli T. 30 Aunque la secuencia se clona fácilmente a partir de una biblioteca o incluso se adquiere comercialmente como parte de un vector, se puede también sintetizar fácilmente usando los procedimientos de síntesis de ácidos nucleicos tales como aquellos descritos en el presente documento.

Un elemento del gen marcador seleccionable codifica una proteína necesaria para la supervivencia y el crecimiento 35 de una célula huésped que crece en un medio de cultivo selectivo. Los genes marcadores de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, *por ejemplo*, ampicilina, tetraciclina, o kanamicina para las células huésped procariotas, (b) complementa las deficiencias auxotróficas de la célula; o (c) suministra nutrientes críticos no disponibles de medios complejos. Los marcadores seleccionables preferidos son el 40 gen de resistencia a la kanamicina, el gen de resistencia a la ampicilina, y el gen de resistencia a la tetraciclina. Se puede usar también un gen de resistencia a la neomicina para la selección en células huésped procariotas y eucariotas.

Se pueden usar otros genes de selección para amplificar el gen que se va a expresar. La amplificación es el procedimiento en el que los genes que tienen mayor demanda por la producción de una proteína crítica para crecer se reiteran en tandem en el interior de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamíferos incluyen dihidrofolato reductasa (DHFR) y timidina quinasa. Los transformantes de células de mamíferos se colocan a una presión de selección a la que sólo los transformantes se adaptan únicamente para sobrevivir en virtud del gen de selección presente en el vector. La presión de selección se impone cultivando las células transformadas en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia sucesivamente, conduciendo por tanto a la amplificación del gen de selección y del 50 ADN que codifica un polipéptido MK61. Como resultado, se sintetizan cantidades aumentadas de polipéptido MK61 a partir del ADN amplificado.

Suele ser necesario un emplazamiento de unión con el ribosoma para el inicio de la traducción del ARNm y se caracteriza por una secuencia Shine-Dalgarno (procariotas) o una secuencia Kozak (eucariotas). El elemento se 55 localiza normalmente en dirección 3' respecto del promotor y en dirección 5' respecto de la secuencia de codificación de un polipéptido MK61 que se va a expresar. La secuencia Shine-Dalgarno varía, pero es normalmente una polipurina (*es decir*, que tiene un contenido A-G elevado). Se han identificado muchas secuencias Shine-Dalgarno, cada una de las cuales se puede sintetizar fácilmente usando los procedimientos que se muestran en el presente documento y usan en un vector procariota.

60 Se puede usar una secuencia líder, o señal, para dirigir un polipéptido MK61 hacia el exterior de la célula huésped. Normalmente, se ubica una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia señal en la región de codificación de una molécula de ácido nucleico de MK61, o directamente en el extremo 5' de una región de codificación del polipéptido MK61. Se han identificado muchas secuencias señal y se pueden usar cualquiera de ellas que sea funcional en la 65 célula huésped seleccionada en conjunción con una molécula de ácido nucleico de MK61. Por tanto, una secuencia señal puede ser homóloga (se produce naturalmente) o heteróloga para un gen o ADNc de MK61. Adicionalmente, se puede sintetizar químicamente una secuencia señal usando los procedimientos descritos en el presente documento. En la mayor parte de los casos, la secreción de un polipéptido MK61 a partir de la célula huésped mediante la presencia

de un péptido señal dará como resultado la eliminación del péptido señal procedente del polipéptido MK61 segregado. La secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte de una molécula de ácido nucleico de MK61 que se inserta en el vector.

5 Incluido dentro del alcance de esta invención está el uso de tanto una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal del polipéptido MK61 natural unida a una región de codificación del polipéptido MK61 como de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal heteróloga unida a una región de codificación del polipéptido MK61. La secuencia señal heteróloga seleccionada debería ser una secuencia que se pueda reconocer y procesar, *es decir*, escindida mediante una señal peptidasa, por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no 10 reconocen y procesan la secuencia señal del polipéptido MK61 natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, o enterotoxina II líder termoestable. Para la secreción de levaduras, se puede sustituir la secuencia señal del polipéptido MK61 natural por los líderes de la invertasa de levadura, el factor alfa, o la fosfatasa ácida. En la expresión celular de mamíferos, la secuencia señal natural es satisfactoria, aunque se pueden usar otras secuencias señal de mamíferos.

15 En algunos casos, como en los que se desea la glicosilación en un sistema de expresión de célula huésped eucariota, se pueden manipular las diversas presecuencias para mejorar la glicosilación o el rendimiento. Por ejemplo, se puede alterar el emplazamiento de escisión de la peptidasa de un péptido señal concreto, o añadir presecuencias, que también 20 pueden afectar la glicosilación. El producto de proteína final puede tener, en la posición 3 (en relación con el primer aminoácido de la proteína madura), uno o más aminoácidos adicionales incidentes en la expresión que pueden no haberse eliminado totalmente. Por ejemplo, el producto de proteína final puede tener uno o dos restos de aminoácidos que se encuentran en el emplazamiento de escisión de la peptidasa, unidos al término N. Alternativamente, el uso de algunos emplazamientos de escisión de enzimas puede dar como resultado una forma ligeramente truncada del polipéptido MK61 deseado, si la enzima corta en dicha área en el interior del polipéptido maduro.

25 En muchos casos, la transcripción de una molécula de ácido nucleico se incrementa por la presencia de uno o más intrones en el vector; esto es particularmente verdadero cuando se produce un polipéptido en células huésped eucariotas, especialmente células huésped de mamíferos. Los intrones usados se pueden producir naturalmente en el interior del gen MK61, especialmente cuando el gen usado es una secuencia genómica de longitud completa o un 30 fragmento de la misma. Cuando el intrón no se produce naturalmente en el interior del gen (como en la mayor parte de los ADNc), el(los) intrón(es) se pueden obtener de otra fuente. La posición del intrón con respecto a las secuencias de flanqueo y el gen MK61 es generalmente importante, ya que el intrón debe transcribirse para ser efectivo. De esta manera, cuando una molécula de ADNc de MK61 se está transcribiendo, la posición preferida para el intrón es 35 3' en el emplazamiento de inicio de la transcripción, y 5' en la secuencia poliA de terminación de la transcripción. Preferiblemente, el intrón o intrones se localizarán en un lado o el otro (*es decir*, 5' o 3') del ADNc de tal manera que no interrumpan la secuencia de codificación. Se puede usar cualquier intrón de otra fuente, incluyendo la vírica, 40 los organismos procariotas y eucariotas (planta o animal), para poner en práctica esta invención, a condición de que sea compatible con la(s) célula(s) huésped en la que se inserta. Incluidos también en el presente documento están los intrones sintéticos. Opcionalmente, se puede usar más de un intrón en el vector.

45 Los vectores de expresión y clonación de la presente invención contendrán cada uno normalmente un promotor que se reconoce por el organismo huésped y que se une de manera operable a la molécula que codifica un polipéptido MK61. Los promotores son secuencias no transcritas localizadas normalmente en la dirección 5' (5') del codón de inicio de un gen estructural (generalmente en el interior de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción del gen estructural. Los promotores se agrupan convencionalmente en una de dos clases, los promotores inducibles y los promotores constitutivos. En este contexto, los promotores inducibles incluyen promotores represibles/depresibles y promotores inducibles convencionales. Los promotores inducibles inician el aumento de los niveles de la transcripción del ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo, tal como la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. Los promotores constitutivos, por otra parte, 50 inician la producción continua del producto génico; esto es, existe poco o ningún control sobre la expresión del gen. Se conocen bien un gran número de promotores, reconocidos por una variedad de células huésped potenciales. Un promotor adecuado se une de manera operable al ADN que codifica un polipéptido MK61 mediante, por ejemplo, la eliminación del promotor desde la fuente de ADN mediante digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia promotora deseada en el vector. Se puede usar la secuencia promotora del gen MK61 natural para dirigir la 55 amplificación y/o la expresión de una molécula de ácido nucleico de MK61. Se prefiere un promotor heterólogo, sin embargo, si éste permite una transcripción mayor y rendimientos mayores de la proteína expresada en comparación con el promotor natural, y si éste es compatible con el sistema de la célula huésped que se ha seleccionado para el uso.

60 Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariotas incluyen los sistemas promotores de la beta lactamasa y la lactosa; la fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptófano (trp); y los promotores híbridos tal como el promotor tac. Son también adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Se han publicado sus secuencias, permitiendo por tanto a una persona experta en la técnica ligarlos con la(s) secuencia(s) de ADN deseada(s), usando ligantes o adaptadores según se necesite para suministrar cualquier emplazamiento de restricción útil.

65 Se conocen bien en la técnica los promotores adecuados para uso con huéspedes de levadura. Los potenciadores de levadura se usan ventajosamente con los promotores de levadura. Se conocen bien los promotores adecuados para el uso con células huésped de mamíferos e incluyen, pero no se limitan a, aquellos obtenidos a partir de genomas de virus tales como el virus del poliomielitis, el virus de la viruela aviar, adenovirus (tales como Adenovirus 2), el virus del

papiloma bovino, el virus del sarcoma de las aves, el citomegalovirus (CMV), un retrovirus, el virus de la hepatitis B y más preferiblemente el Virus 40 de Simios (SV40). Otros promotores de mamíferos adecuados incluyen los promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, los promotores del choque térmico y el promotor de la actina.

5 Los promotores adicionales que pueden ser de interés en el control de la transcripción del gen MK61 incluyen, pero no se limitan a: la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature*, 290: 304-310, (1981)), el promotor CMV, el promotor contenido en la repetición larga del extremo 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto y col., *Cell*, 22: 787-797, (1980)); el promotor de la timidina quinasa del herpes (Wagner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 78: 144-145, (1981)), las secuencias reguladoras del gen de la metalotionina (Brinster y col., *Nature*, 296: 39-42, (1982)), los vectores de expresión procariota tales como el promotor de la beta lactamasa (Villa-Kamaroff, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 75: 3727-3731, (1978)), o el promotor tac (DeBoer, y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 80: 21-25, (1983)). También de interés son las siguientes regiones de control transcripcional en animales, que presentan especificidad por el tejido y se han utilizado en animales transgénicos: la región control del gen de la elastasa I que es activa en las células acinares pancreáticas [Swift y col., *Cell*, 38: 639-646, (1984); Ornitz y col., 10 *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50: 399-409 (1986); MacDonald, *Hepatology*, 7: 425-515, (1987)]; la región control del gen de la insulina que es activa en las células beta pancreáticas (Hanahan, *Nature*, 315: 115-122, (1985)); la región control del gen de la inmunoglobulina que es activa en las células linfoides (Grosschedl y col., *Cell*, 38: 647-658 (1984)); Adames y col., *Nature*, 318: 533-538 (1985)); (Alexander y col., *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1436-1444, (1987)); la 15 región control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocíticas (Leder y col., *Cell*, 45: 485-495, (1986)); la región control del gen de la albúmina que es activa en el hígado (Pinkert y col., *Genes and Devel.*, 1: 268-276, (1987)); la región control del gen de la alfafetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf y col., *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1639-1648, (1985)); Hammer y col., *Science*, 235: 53-58, (1987)); la región control del gen de la 1-antitripsina alfa que es activa en el hígado (Kelsey y col., *Genes and Devel.*, 1: 161-171, (1987)); la región control del gen de la beta globina que es activa en las células mieloides [Mogram y col., 20 *Nature*, 315: 338-340, (1985); Kolllias y col., *Cell*, 46: 89-94, (1986)]; la región control del gen de la proteína básica de mielina que es activa en las células de oligodendrocitos en el cerebro (Readhead y col., *Cell*, 48: 703-712, (1987)); la 25 región control del gen 2 de la cadena ligera de miosina que es activa en el músculo esquelético (Sani, *Nature*, 314: 283-286, (1985)); y la región control del gen que libera la hormona gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason y col., *Science*, 234: 1372-1378, (1986)).

30 Se puede insertar una secuencia potenciadora en el vector para aumentar la transcripción de un ADN que codifica un polipéptido MK61 de la presente invención por los eucariotas superiores. Los potenciadores son elementos cis actuantes del ADN, normalmente de aproximadamente 10-300 pb de longitud, que actúan sobre el promotor para aumentar su transcripción. Los potenciadores tienen orientación y posición relativamente independientes. Se han 35 encontrado en las posiciones 5' y 3' de la unidad de transcripción. Se conocen algunas secuencias potenciadoras disponibles de genes de mamíferos (*por ejemplo*, globina, elastasa, albúmina, alfafetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus. El potenciador de SV40, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma, y los potenciadores del adenovirus son elementos potenciadores a modo de ejemplo para la activación de los promotores eucariotas. Aunque se puede ayudar un potenciador en el vector en la 40 posición 5' ó 3' de una molécula de ácido nucleico de MK61, éste se localiza normalmente en la posición 5' desde el promotor.

Se pueden construir los vectores de expresión de la invención a partir de un vector de partida tal como un vector comercialmente disponible. Dichos vectores pueden contener o no todas las secuencias de flanqueo deseadas. Cuando 45 una o más de las secuencias de flanqueo deseadas no están aún presentes en el vector, se pueden obtener y ligar individualmente en el vector. Los procedimientos usados para obtener cada una de las secuencias de flanqueo son bien conocidos por una persona experta en la técnica.

Los vectores preferidos para practicar esta invención son aquellos que son compatibles con las células huésped 50 bacterianas, de insectos, y de mamíferos. Dichos vectores incluyen, entre otros pCRII, pCR3, y ADN3.1pc (Invitrogen Company, Carlsbad, CA), pBSII (Stratagene Company, La Jolla, CA), pET15 $\beta$  (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII; Invitrogen), pDSR-alfa (Publicación PCT N°. WO 90/14363) y pFastBacDual (Gibco/BRL, Grand Island, NY).

55 Los vectores adicionales adecuados incluyen, pero no se limitan a, cósmidos, plásmidos o virus modificados, pero se apreciará que el sistema vector debe ser compatible con la célula huésped seleccionada. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, plásmidos tales como derivados plásmidos Bluescript $^{\circledR}$  (un número elevado de copias de fagérido basado en ColE1, Stratagene Cloning Systems Inc., La Jolla CA), plásmidos de clonación de la PCR diseñados para clonar productos de la PCR amplificados con Taq (*por ejemplo*, TOPO $^{\text{TM}}$  TA Cloning $^{\circledR}$  Kit, derivados de plásmido PCR2.1 $^{\circledR}$ , Invitrogen, Carlsbad, CA), y vectores de mamíferos, levaduras o virus tales como un sistema de expresión de baculovirus (derivados de plásmido pBaCPAK, Clontech, Palo Alto, CA).

Una vez que se ha construido el vector y se ha insertado una molécula que codifica un polipéptido MK61 en el 65 emplazamiento apropiado del vector, se puede insertar el vector completado en una célula huésped seleccionada para la amplificación y/o la expresión del polipéptido. Se puede llevar a cabo la transformación de un vector de expresión de un polipéptido MK61 en una célula huésped seleccionada mediante procedimientos bien conocidos tales como la transfección, la infección, la transformación mediada por cloruro de calcio, la electroporación, la microinyección, la lipofección o el procedimiento DEAE-dextrano u otras técnicas conocidas. El procedimiento seleccionado será en

parte una función del tipo de célula huésped que se va a usar. Estos procedimientos y otros procedimientos adecuados son bien conocidos por el técnico experto y se muestran, por ejemplo, en Sambrook y col, más arriba.

Las células huésped pueden ser células huésped procariotas (tales como *E. coli*) o células huésped eucariotas (tales como células de levadura, un insecto o un vertebrado). La célula huésped, cuando se cultiva en condiciones apropiadas, puede sintetizar un polipéptido MK61 que se puede recoger posteriormente del medio de cultivo (si la célula huésped se separa ésta en el interior del medio) o directamente de la célula huésped que lo produce (si ésta no se separa). La selección de una célula huésped apropiada dependerá de diversos factores, tales como los niveles de expresión deseados, las modificaciones del polipéptido que son deseables o necesarias para la actividad (tales como la glicosilación o la fosforilación), y la facilidad de plegado en una molécula biológicamente activa.

Se conocen en la técnica numerosas células huésped adecuadas y muchas están disponibles de la American Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, células de mamíferos, tales como células de ovario de hámster chino (CHO) (ATCC Nº CCL61); células CHO DHFR (Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 97: 4216-4220 (1980)); células 293 o 293T de riñón embrionario humano (HEK) (ATCC Nº CRL 1573); o células 3T3 (ATCC Nº CCL92). Se conocen en la técnica la selección de células huésped de mamíferos adecuadas y los procedimientos para la transformación, el cultivo, la amplificación, la selección, la producción y purificación del producto. Otras líneas celulares de mamíferos adecuadas son las líneas celulares COS-1 (ATCC Nº CRL 1650) y COS-7 (ATCC Nº CRL 1651) de monos, y la línea celular CV-1 (ATCC Nº CCL70). Las células huésped de mamíferos a modo de ejemplo adicionales incluyen líneas celulares de primates y líneas celulares de roedores, que incluyen líneas celulares transformadas. Son también adecuadas las células diploides normales, las cepas celulares derivadas de cultivos *in vitro* de tejido primario, así como los explantes primarios. Las células candidatas pueden ser genotípicamente deficientes en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección que actúa de manera dominante. Otras líneas celulares de mamíferos adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células N2A de neuroblastoma de ratón, HeLa, células L-929 de ratón, líneas 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH, líneas celulares BHK o HaK de hámster, que están disponibles también de la ATCC. Cada una de estas líneas celulares se conoce por y está disponible para aquellas personas expertas en la técnica de la expresión de proteínas.

Útiles de manera similar como células huésped adecuadas para la presente invención son las células bacterianas. Por ejemplo, se conocen bien las diversas cepas de *E. coli* (por ejemplo, HB101, (ATCC Nº 33694) DH5 $\alpha$ , DH10 y MC 1061 (ATCC Nº 53338) como células huésped en el campo de la biotecnología. Se pueden emplear también en este procedimiento diversas cepas de *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, otros *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, y similares.

Muchas cepas de células de levaduras conocidas por aquellas personas expertas en la técnica están también disponibles como células huésped para la expresión de los polipéptidos de la presente invención. Las células de levaduras preferidas incluyen, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

Adicionalmente, cuando se desea, se pueden utilizar sistemas celulares de insectos en los procedimientos de la presente invención. Dichos sistemas se describen por ejemplo en Kitts y col., Biotechniques, 14: 810-817 (1993); Lucklow, Curr. Opin. Biotechnol., 4: 564-572 (1993); y Lucklow y col., J. Virol., 67: 4566-4579 (1993). Las células de insectos preferidas son Sf-9 y Hi5 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Se pueden usar animales transgénicos para expresar los polipéptidos MK61 glicosilados. Por ejemplo, se puede usar un animal transgénico que produce leche (una vaca o cabra, por ejemplo) y obtener el presente polipéptido glicosilado en la leche del animal. Se pueden usar plantas para producir polipéptidos MK61; sin embargo, en general, la glicosilación que se produce en células de plantas es diferente de la que se produce en células de mamíferos, y puede dar como resultado un producto glicosilado que no es adecuado para el uso terapéutico en seres humanos.

#### 50 *Producción de polipéptidos*

Se pueden cultivar células huésped que comprenden un vector de expresión del polipéptido MK61 usando medios estándares bien conocidos por el técnico experto. Estos medios contendrán normalmente todos los nutrientes necesarios para el crecimiento y la supervivencia de las células. Los medios adecuados para cultivar células de *E. coli* incluyen, por ejemplo, caldo Luria (LB) y/o Caldo Terric (TB). Los medios adecuados para cultivar células eucariotas incluyen el medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), y el Medio Esencial Mínimo (MEM) y/o el Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), todos los cuales se pueden suplementar con suero y/o factores de crecimiento tal como se indica por la línea celular concreta que está siendo cultivada. Un medio adecuado para cultivos de insecto es el medio de Grace suplementado con yeastolate, hidrolizado de lactoalbúmina, y/o suero de ternero fetal, según sea necesario.

Normalmente, se añade como suplemento a los medios un antibiótico u otro compuesto útil para el crecimiento selectivo de las células transformadas. El compuesto que se va a usar estará dictado por el elemento marcador seleccionable presente en el plásmido con el que se transformó la célula huésped. Por ejemplo, cuando el elemento marcador seleccionable es la resistencia a la kanamicina, el compuesto añadido al medio de cultivo será kanamicina. Otros compuestos para el crecimiento selectivo incluyen ampicilina, tetraciclina y neomicina.

5 Se puede evaluar la cantidad de un polipéptido MK61 producido por una célula huésped usando procedimientos estándar conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, sin limitación, análisis de transferencia Western, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, electroforesis en gel no desnaturalizante, separación cromatográfica, tal como Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC), inmunodetección tal como inmunoprecipitación, y/o ensayos de actividad tales como ensayo de cambio de gel de unión al ADN.

10 Si se ha diseñado un polipéptido MK61 para segregarse desde las células huésped, la mayoría del polipéptido se puede encontrar en el medio de cultivo celular. Si sin embargo, el polipéptido MK61 no se segregá desde las células huésped, éste estará presente en el citoplasma y/o en el núcleo (de las células huésped eucariotas) o en el citosol (de las células huésped bacterianas).

15 Se puede extraer un polipéptido MK61 situado en el citoplasma y/o en el núcleo de la célula huésped (de las células huésped eucariotas) o en el citosol (de las células huésped bacterianas), en el material intracelular (que incluye los cuerpos de inclusión de las bacterias gram negativas) de la célula huésped, usando cualquier técnica estándar conocida por el técnico experto. Por ejemplo, las células huésped se pueden lisar para liberar los contenidos del periplasma/citoplasma mediante prensa de French de choque osmótico, homogenización, perturbación enzimática, exposición a detergentes o caótropos, y/o sonicación seguida por centrifugación.

20 Si un polipéptido MK61 ha formado cuerpos de inclusión en el citosol, los cuerpos de inclusión se pueden a menudo unir a las membranas celulares internas y/o externas y de esta manera se encontrarán principalmente en el material residual tras la centrifugación. A continuación se puede tratar el material residual a pH extremos o con un agente caótropo tal como un detergente, guanidina, derivados de guanidina, urea, o derivados de urea en presencia de un agente reductor tal como ditiotreitol a pH alcalino o triscarboxietilfosfina a pH ácido para liberar, separar, y solubilizar los cuerpos de inclusión. El polipéptido MK61 en su forma ahora soluble se puede a continuación analizar 25 usando electroforesis en gel, inmunoprecipitación o similar. Si se desea aislar el polipéptido MK61, se puede llevar a cabo el aislamiento usando procedimientos estándar tales como aquellos descritos en el presente documento y en Marston y col., Meth. Enz., 182: 264-275 (1990).

30 En algunos casos, un polipéptido MK61 puede no ser biológicamente activo tras el aislamiento. Se pueden usar diversos procedimientos para "replegar" o convertir el polipéptido a su estructura terciaria y generar enlaces disulfuro para restaurar la actividad biológica. Dichos procedimientos incluyen exponer el polipéptido solubilizado a un pH normalmente superior a 7 y en presencia de una concentración concreta de un caótropo. La selección del caótropo es muy similar a las elecciones usadas para la solubilización de los cuerpos de inclusión, pero normalmente, el caótropo se usa a una concentración más baja y no se usan necesariamente los mismos caótropos para la solubilización. En la 35 mayor parte de los casos, la solución de replegado/oxidación contendrá también un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una relación específica para generar un potencial redox concreto que permita que se produzca el deslizamiento del disulfuro durante la formación del(de los) puente(s) de cisteína de la proteína. Algunos de los acoplamientos redox comúnmente usados incluyen cisteína/cistamina, glutatió (GSH)/ditriobis GSH, cloruro cuproso, ditiotreitol (DTT)/ditiano DTT, y 2-2 mercaptoetanol (bME)/ditio-b(ME). Se puede usar un cosolvente para aumentar 40 la eficacia del replegado, y los reactivos más comunes usados para este objetivo incluyen glicerol, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, arginina y similares.

45 Si no se forman cuerpos de inclusión en un grado significativo tras la expresión de un polipéptido MK61, entonces el polipéptido se encontrará principalmente en el sobrenadante tras la centrifugación del homogenado celular. El polipéptido puede aislarse además del sobrenadante usando procedimientos tales como los descritos en el presente documento o conocidos de otra manera en la técnica.

50 Se puede llevar a cabo la purificación de un polipéptido MK61 a partir de la solución usando una variedad de técnicas. Si se ha sintetizado el polipéptido de tal manera que contiene una etiqueta tal como hexahistidina (polipéptido MK61(hexaHis) u otro péptido pequeño tal como FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) o myc (Invitrogen, Carlsbad, CA) en cualquiera de sus términos carboxilo o amino, se puede purificar éste en un procedimiento de una etapa pasando la solución a través de una columna de afinidad en la que la matriz de la columna tiene una afinidad elevada por la etiqueta.

55 55 Por ejemplo, la polihistidina se une con gran afinidad y especificidad al níquel; de esta manera, se puede usar una columna de afinidad de níquel (tal como columnas de níquel Quiagen®) para la purificación del polipéptido/poliHis de MK61. Véase por ejemplo, Ausubel y col., eds., Current Protocols in Molecular Biology, Sección 10.11.8, John Wiley & Sons, New York (1993).

60 Adicionalmente, se puede purificar el polipéptido MK61 mediante el uso de un anticuerpo monoclonal que es capaz de reconocer y unirse específicamente al polipéptido MK61.

65 Los procedimientos adecuados de purificación incluyen de esta manera, sin limitación, la cromatografía de afinidad, la cromatografía de inmunoafinidad, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía mediante tamiz molecular, la Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento (HPLC), la electroforesis (que incluye la electroforesis en gel natural) seguido por la elución del gel, y la focalización isoelectrónica preparativa (máquina/técnica "Isoprime", Hoefer Scientific, San Francisco, CA). En algunos casos, se pueden combinar dos o más técnicas de purificación para conseguir un aumento de la pureza.

Se pueden preparar también los polipéptidos MK61 mediante procedimientos de síntesis química (tales como síntesis de péptidos en fase sólida) usando técnicas conocidas en la técnica, tales como aquellas que se muestran por Merrifield y col., J. Am. Chem. Soc., 85: 2149 (1963), Houghten y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82: 5132 (1985), y Stewart y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984). Se pueden 5 sintetizar dichos polipéptidos con o sin una metionina en el término amino. Los polipéptidos MK61 químicamente sintetizados se pueden oxidar usando los procedimientos que se muestran en estas referencias para formar puentes disulfuro. Se espera que los polipéptidos MK61 químicamente sintetizados tengan actividad biológica comparable a la de los polipéptidos MK61 correspondientes producidos de manera recombinante o purificados a partir de fuentes 10 naturales, y de esta manera, se puedan usar de manera intercambiable con un polipéptido MK61 recombinante o natural.

Otro medio de obtener un polipéptido MK61 es mediante la purificación de muestras biológicas tales como una fuente de tejidos y/o fluidos en las que el polipéptido MK61 se encuentra naturalmente. Se puede llevar a cabo dicha purificación usando procedimientos de purificación de proteínas tales como los que se describen en el presente 15 documento o tal como de otra manera conocida en la técnica. Se puede hacer el seguimiento de la presencia del polipéptido MK61 durante la purificación, por ejemplo, usando un anticuerpo preparado frente al polipéptido MK61 o los fragmentos péptidos del mismo producidos de manera recombinante.

Se conocen en la técnica numerosos procedimientos adicionales para producir ácidos nucleicos y polipéptidos, y se 20 pueden usar los procedimientos para producir polipéptidos que tengan especificidad por MK61. Véase, por ejemplo, Roberts y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 94:12297-12303 (1997), que describe la producción de proteínas de fusión entre un ARNm y su péptido codificado. Véase también Roberts, R., Curr. Opin. Chem. Biol., 3: 268-273 (1999). Adicionalmente, la Patente de los Estados Unidos nº 5.824.469 describe procedimientos para obtener oligonucleótidos 25 capaces de llevar a cabo una función biológica específica. El procedimiento implica generar una reserva heterogénea de oligonucleótidos, teniendo cada uno una secuencia aleatorizada 5', una secuencia preselecciónada central y una secuencia aleatorizada 3'. La reserva heterogénea resultante se introduce en una población de células que no muestran la función biológica deseada. A continuación se seleccionan las subpoblaciones de células para aquellas que presentan una función biológica predeterminada. A partir de esta subpoblación, se aislan los oligonucleótidos capaces de llevar 30 a cabo la función biológica deseada.

Las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.763.192, 5.814.476, 5.723.323 y 5.817.483 describen procedimientos para producir péptidos o polipéptidos. Esto se realiza produciendo genes estocásticos o fragmentos de los mismos, e introduciendo a continuación estos genes en células huésped que producen una o más proteínas codificadas por los genes estocásticos. A continuación se seleccionan las células huésped para identificar aquellos clones que producen 35 péptidos o polipéptidos que tienen la actividad deseada.

Otro procedimiento para producir péptidos o polipéptidos se describe en el documento PCT/US98/20094 (documento WO99/5650 presentado por Athersys, Inc. conocido como Activación aleatoria de la expresión del gen para el descubrimiento del gen (RAGE-GD, por sus siglas en inglés), el procedimiento implica la activación de la expresión 40 de un gen endógeno o la sobreexpresión de un gen mediante procedimientos de recombinación *in situ*. Por ejemplo, la expresión de un gen endógeno se activa o aumenta integrando una secuencia reguladora en la célula diana que es capaz de activar la expresión del gen mediante recombinación no homóloga o ilegítima. El ADN diana se somete en primer lugar a radiación, y se inserta un promotor genético. El promotor localiza aleatoriamente una rotura en el extremo frontal 5' de un gen, iniciando la transcripción del gen. Esto da como resultado la expresión del péptido o polipéptido 45 deseado.

Se apreciará que se pueden usar también estos procedimientos para crear bibliotecas comprehensivas de expresión de proteínas similares a IL-17, que se pueden usar posteriormente para la selección fenotípica de producción elevada en una variedad de ensayos, tales como ensayos bioquímicos, ensayos celulares, y ensayos de organismos completos 50 (*por ejemplo*, planta, ratón, etc.).

#### Derivados químicos

Una persona experta en la técnica puede preparar derivados químicamente modificados de los polipéptidos MK61, 55 siguiendo las descripciones que se muestran a continuación en el presente documento. Los derivados del polipéptido MK61 se modifican de una manera que es diferente tanto en el tipo como en la localización de las moléculas unidas al polipéptido. Los derivados pueden incluir moléculas formadas por la delección de uno o más grupos químicos unidos naturalmente. Se puede modificar el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 60 14, o SEC DE ID N°: 16, o una variante del polipéptido MK61 mediante el enlace covalente de uno o más polímeros. Por ejemplo, el polímero seleccionado es normalmente soluble en agua de tal manera que la proteína a la cual se une no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. Incluida dentro del alcance de los polímeros adecuados está una mezcla de polímeros. Preferiblemente, para el uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero será farmacéuticamente aceptable.

Cada polímero puede ser de cualquier peso molecular y pueden estar ramificados o no ramificados. Cada polímero tiene normalmente un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en las preparaciones de un polímero soluble en agua algunas moléculas tendrán

más peso, algunas menos, que el peso molecular establecido). El peso molecular promedio de cada polímero está preferiblemente entre aproximadamente 5 kDa, aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa y lo más preferible entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 35 kDa.

5 Los polímeros solubles en agua adecuados o las mezclas de los mismos incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos unidos a N o unidos a O; azúcares; fosfatos; polietilenglicol (PEG) (incluyendo las formas de PEG que se han usado para derivatizar proteínas, incluyendo monoalcoxi ( $C_1-C_{10}$ ) o ariloxi-polietilenglicol); monometoxi-polietilenglicol; dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular de, por ejemplo 6 kDa); celulosa; u otros polímeros basados en carbohidrato, poli-(N-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de propileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (*por ejemplo*, glicerol) y alcohol polivinílico. También, abarcadas por la presente invención están las moléculas reticulantes bifuncionales que se pueden usar para preparar multímeros unidos covalentemente del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, SEC DE ID Nº: 16, o una variante del polipéptido MK61.

15 En general, se puede llevar a cabo la derivatización química en cualquier condición adecuada usada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activada. Los procedimientos para preparar derivados químicos de los polipéptidos comprenderán en general las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con una molécula de polímero activada (tal como un éster o derivado de aldehído reactivos de la molécula del polímero) en condiciones 20 en las que el polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, o una variante del polipéptido MK61 llega a unirse a una o más moléculas de polímero, y (b) obtener el(s) producto(s) de reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán basándose en parámetros conocidos y 25 en el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la relación de moléculas de polímero: proteína, mayor es el porcentaje de moléculas de polímero unidas. En una forma de realización, el derivado del polipéptido MK61 puede tener un resto único de molécula de polímero en el término amino (*véase, por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos Nº 5.234.784).

30 Se puede llevar a cabo específicamente la pegilación del polipéptido mediante cualquiera de las reacciones de pegilación conocidas en la técnica, tal como se describe por ejemplo en las siguientes referencias: Francis y col., Focus on Growth Factors, 3: 4-10 (1992); Documentos EP 0154316; EP 0401384 y patente de los Estados Unidos Nº. 4.179.337. Por ejemplo, se puede llevar a cabo la pegilación mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero soluble en agua reactivo análogo) tal como se describe en el presente documento. Para las reacciones de acilación, el(s) polímero(s) seleccionado(s) debería(n) tener un grupo 35 éster reactivo único. Para la alquilación reductora, el(s) polímero(s) seleccionado(s) debería(n) tener un grupo aldehído reactivo único. Un aldehído reactivo es, por ejemplo, propionaldehído de polietilenglicol, que es estable en agua, o los derivados monoalcoxi  $C_1-C_{10}$  o ariloxi del mismo (*véase la Patente de los Estados Unidos nº 5.252.714*).

40 En otra forma de realización, se pueden acoplar químicamente los polipéptidos MK61 a biotina, y se permite a continuación que las moléculas de biotina/polipéptido MK61 que están conjugadas se unan a la avidina, dando como resultado moléculas de avidina tetravalente/biotina/polipéptido MK61. Se pueden acoplar también covalentemente los polipéptidos MK61 a dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP) y los conjugados resultantes precipitarse con anti-DNP o anti-TNP-IgM para formar conjugados decaméricos con una valencia de 10.

45 En general, las dolencias que se pueden mitigar o modular mediante la administración de los presentes derivados del polipéptido MK61 incluyen aquellas descritas en el presente documento para los polipéptidos MK61. Sin embargo, los derivados del polipéptido MK61 descritos en el presente documento pueden tener actividades adicionales, actividad biológica potenciada o reducida, u otras características, tales como un aumento o disminución de la semivida, en comparación con las moléculas no derivatizadas.

50 *Animales no humanos diseñados mediante ingeniería genética*

Adicionalmente incluidos dentro del alcance de la presente invención están los animales no humanos tales como ratones, ratas, conejos, u otros roedores, conejos, cabras u ovejas, u otros animales de granja, en los que se ha (tienen) 55 perturbado el gen (o genes) que codifican el polipéptido MK61 natural (“careciendo de”) de tal manera que el nivel de expresión de este gen o genes está significativamente disminuido o completamente eliminado. Se pueden preparar dichos animales usando las técnicas y procedimientos tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.557.032.

60 La presente invención incluye además animales no humanos tales como ratones, ratas u otros roedores, conejos, cabras, ovejas, u otros animales de granja en los que cualquier forma natural del(de los) gen(s) MK61 para este animal o un(unos) gen(es) MK61 heterólogo(s) se sobreexpresa(n) por el animal, creando por tanto un animal “transgénico”. Dichos animales transgénicos se pueden preparar usando procedimientos bien conocidos tales como aquellos descritos en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.489.743 y la Solicitud PCT Nº WO94/28122.

65 La presente invención incluye además animales no humanos en los que el promotor de uno o más de los polipéptidos MK61 de la presente invención está tanto activado como inactivado (*por ejemplo*, usando procedimientos de recombinación homóloga) para alterar el nivel de expresión de uno o más de los polipéptidos MK61 naturales.

Se pueden usar estos animales no humanos para seleccionar fármacos candidatos. En dicha selección, se puede medir el impacto de un fármaco candidato sobre el animal, por ejemplo, los fármacos candidatos pueden disminuir o aumentar la expresión del gen MK61. En algunas formas de realización, se puede medir la cantidad de polipéptido MK61 que se produce tras la exposición del animal al fármaco candidato. Adicionalmente, en algunas formas de realización, se puede detectar el impacto real del fármaco candidato sobre el animal. Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen concreto puede dar como resultado una, o asociarse con una, enfermedad o dolencia patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un fármaco candidato para disminuir la expresión del gen o su capacidad para evitar, inhibir, o eliminar una dolencia patológica. En otros ejemplos, la producción de un producto metabólico concreto tal como fragmento de un polipéptido puede dar como resultado una, o asociarse con, una enfermedad o dolencia patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un fármaco candidato para disminuir la producción de dicho producto metabólico o su capacidad para evitar, inhibir, o eliminar una dolencia patológica.

#### *Micromatriz*

Se apreciará que se puede utilizar tecnología de micromatriz de ADN de acuerdo con la presente invención. Las micromatrices de ADN son matrices de alta densidad de ácidos nucleicos en miniatura posicionadas sobre un soporte sólido, tal como vidrio. Cada célula o elemento en el interior de la matriz tiene numerosas copias de una especie única de ADN que actúa como diana para la hibridación de su ARNm análogo. En el perfilado de la expresión usando tecnología de micromatrices de ADN, se extrae en primer lugar el ARNm a partir de una muestra de células o tejido y a continuación se convierte enzimáticamente en ADNc marcado fluorescentemente. Este material se hibrida en la micromatriz y el ADNc no unido se elimina mediante lavado. A continuación se visualiza la expresión de los genes discretos representados sobre la matriz cuantificando la cantidad de ADNc marcado que se une específicamente a cada ADN diana. De esta manera se puede cuantificar la expresión de miles de genes con una elevada producción, de manera paralela a la de una muestra única de material biológico.

El perfilado de esta expresión de producción elevada tiene un amplio intervalo de aplicaciones con respecto a las moléculas de MK61 de la invención, incluyendo, pero sin limitarse a: la identificación y validación de genes MK61 relacionados con enfermedades como dianas para composiciones terapéuticas; la toxicología molecular de las moléculas MK61 y los inhibidores de las mismas; la estratificación de las poblaciones y la generación de sustitutos de marcadores para ensayos clínicos; y la potenciación del descubrimiento de un fármaco de molécula pequeña relacionado con MK61 ayudando en la identificación de los compuestos selectivos en selecciones de producción elevada (HTS).

#### *Agentes de unión selectiva*

Tal como se usa en el presente documento, el término “agente de unión selectiva” se refiere a una molécula que tiene especificidad por uno o más polipéptidos MK61. Los agentes de unión selectiva adecuados incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos y derivados de los mismos, polipéptidos, y moléculas pequeñas. Se pueden preparar los agentes de unión selectiva adecuados usando los procedimientos conocidos en la técnica. Un agente de unión selectiva de un polipéptido MK61 como ejemplo de la presente invención es capaz de unirse a alguna porción del polipéptido MK61 inhibiendo por tanto la unión del polipéptido al(a los) receptor(es) del polipéptido MK61.

Los agentes de unión selectiva tales como los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que se unen a los polipéptidos MK61 están comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos pueden ser policlonales, incluyendo los policlonales monoespecíficos, monoclonales (MAb), recombinantes, químicos, humanizados tales como injertados a CDR, humanos, de cadena única, y/o biespecíficos, así como los fragmentos, variantes o derivados de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos incluyen aquellas porciones del anticuerpo que se unen a un epitopo sobre el polipéptido MK61. Los ejemplos de dichos fragmentos incluyen fragmentos Fab y F(ab') generados mediante rotura enzimática de anticuerpos de longitud completa. Otros fragmentos de unión incluyen aquellos generados mediante técnicas de ADN recombinante, tales como la expresión de plásmidos recombinantes que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican regiones variables del anticuerpo.

Los anticuerpos policlonales dirigidos hacia un polipéptido MK61 se producen en general en animales (*por ejemplo*, conejos o ratones) por medio de múltiples inyecciones subcutáneas, intramusculares o intraperitoneales de polipéptido MK61 y un adyuvante. Puede ser útil conjugar un polipéptido para una proteína vehículo que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar, tal como la hemocianina de lapa californiana, suero, albúmina, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja. También, se usan agentes de agregación como albúmina para potenciar la respuesta inmune. Tras la inmunización, los animales se sangran y se ensaya el suero para determinar el título de anticuerpos del polipéptido anti-mK61.

Los anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un polipéptido MK61 se producen usando cualquier procedimiento que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Los ejemplos de procedimientos adecuados para preparar anticuerpos monoclonales incluyen los procedimientos del hibridoma de Kohler y col., *Nature*, 256: 495-497 (1975) y el procedimiento del hibridoma de células B humanas, Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984) y Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987). La invención proporciona también líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales reactivos con los polipéptidos MK61.

- Se pueden modificar los anticuerpos monoclonales de la invención para uso como agentes terapéuticos. Una forma de realización es un anticuerpo “químérico” en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que el(s) resto(s) de la(s) cadena(s) es/son idéntico(s) u homólogo(s) a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos. Se incluyen también los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada. Véanse, la Patente de los Estados Unidos nº 4.816.567 y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU, 81: 6851-6855 (1985).
- En otra forma de realización, un anticuerpo monoclonal de la invención es un anticuerpo “humanizado”. Se conocen bien en la técnica los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos (véanse las Patentes de los Estados Unidos N°s 5.585.089, y 5.693.762). En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en éste procedentes de una fuente que no es humana. Se puede llevar a cabo la humanización, por ejemplo, usando los procedimientos descritos en la técnica (Jones y col., Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeven y col., Science 239: 1534-1536 (1988)), sustituyendo al menos una porción de una región determinante de la complementariedad en un roedor (CDR) para las regiones correspondientes de un anticuerpo humano.
- Abarcados también por la invención están los anticuerpos humanos que se unen a los polipéptidos, fragmentos, variantes y/o derivados de MK61. Usando animales transgénicos (*por ejemplo*, ratones) que sean capaces de producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena, dichos anticuerpos se producen mediante inmunización con un antígeno de MK61 (es decir, tienen al menos 6 aminoácidos contiguos), opcionalmente conjugado con un vehículo. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 2551-2555 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362: 255-258 (1993) y Brugermann y col., Year in Immunol., 7: 33 (1993). En un procedimiento, dichos animales transgénicos se producen incapacitando los locus endógenos que codifican las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera de los anteriores, e insertando ácidos nucleicos que codifican las proteínas de cadena pesada y ligera humanas en el genoma de los mismos. Los animales parcialmente modificados, que son aquellos que tienen menos del complemento completo de modificaciones, se cruzan a continuación entre sí para obtener un animal que tenga todas las modificaciones deseadas del sistema inmune. Cuando se administra un inmunógeno, estos animales transgénicos producen anticuerpos con regiones variables humanas, que incluyen secuencias de aminoácidos humanos (en lugar de, *por ejemplo*, murino), que incluyen regiones variables que son inmunoespecíficas para estos antígenos. Véanse las solicitudes PCT n°s PCT/US96/05928 y PCT/US93/06926. Se describen procedimientos adicionales en la Patente de los Estados Unidos N° 5.545.807, en las solicitudes PCT n°s PCT/US91/245, PCT/GB89/01207, y en los documentos EP 546073B1 y EP 546073A1. Se pueden producir también anticuerpos humanos mediante la expresión de ADN recombinante en células huésped o mediante la expresión en células de hibridoma tal como se describe en el presente documento.
- En una forma de realización alternativa, se pueden producir anticuerpos humanos a partir de bibliotecas para despliegue en fagos (Hoogenboom y col., J. Mol. Biol. 227: 381 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol. 222: 581 (1991)). Estos procedimientos imitan la identificación inmune mediante el despliegue de repertorios de anticuerpos sobre la superficie de bacteriófagos filamentosos, y la selección posterior del fago para su unión a un antígeno de elección. Se describe una de dichas técnicas en la Solicitud PCT N° PCT/US98/17364, presentada a nombre de Adams y col. que describe el aislamiento de anticuerpos agonistas de elevada afinidad y funcionalidad para los receptores MPL y msk que usan dicha hipótesis.
- Los anticuerpos químéricos, injertos de CDR, y humanizados se producen normalmente mediante procedimientos recombinantes. Los ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos se introducen en las células huésped y se expresan usando los materiales y procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. En una forma de realización preferida, los anticuerpos se producen en células huésped de mamíferos, tales como células CHO. Se pueden producir anticuerpos monoclonales (*por ejemplo*, humanos) mediante la expresión de ADN recombinante en las células huésped o mediante la expresión en células de hibridoma tal como se describe en el presente documento.
- Se pueden emplear los anticuerpos anti-MK61 de la invención en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación (Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) para la detección y cuantificación de polipéptidos MK61. Los anticuerpos se unirán a los polipéptidos MK61 con una afinidad que es apropiada para el procedimiento de ensayo que se está empleando.
- Para aplicaciones en diagnóstico, en algunas formas de realización, se pueden marcar los anticuerpos anti-MK61 con un resto detectable. El resto detectable puede ser cualquiera que sea capaz de producir, tanto directa como indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , o  $^{125}\text{I}$ ; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina; o un enzima, tal como fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o peroxidasa de rábano picante (Bayer y col., Meth. Enz., 184: 138-163 (1990)).
- Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un patrón marcado (por ejemplo, un polipéptido MK61, o una porción inmunológicamente reactiva del mismo) para competir con el analito de la muestra de ensayo (un polipéptido MK61) por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo anti-MK61. La cantidad de polipéptido MK61

en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que llega a unirse con los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que llega a unirse, los anticuerpos normalmente se insolubilizan antes o después de la competición, de manera que el estándar y el analito que se unen con los anticuerpos se pueden separar convenientemente a partir del patrón y el analito que permanecen sin unir.

5 Los ensayos de tipo sándwich implican normalmente el uso de dos anticuerpos, capaz cada uno de unirse a una porción inmunógena diferente, o epitopo, de la proteína que se va a detectar y/o cuantificar. En un ensayo de tipo sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une normalmente mediante un primer anticuerpo que se inmoviliza sobre un soporte sólido, y después de eso un segundo anticuerpo se une al analito, formando de esta manera un complejo insoluble de tres partes. Véase, *por ejemplo*, la Patente de los Estados Unidos nº 4.376.110. El segundo anticuerpo él mismo estar marcado con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich directos) o se puede medir usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que se marca con un resto detectable (ensayos de tipo sándwich indirectos) Por ejemplo, un tipo de ensayo de tipo sándwich es un ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA), en cuyo caso, el resto detectable es un enzima.

10 15 Los agentes de unión selectiva de la invención, incluyendo los anticuerpos anti-MK61, son también útiles para la formación de imagen *in vivo*. Se puede administrar un anticuerpo marcado con un resto detectable a un animal, preferiblemente en el torrente sanguíneo, y se ensaya la presencia y la ubicación del anticuerpo marcado en el huésped. Se puede marcar el anticuerpo con cualquier resto que sea detectable en un animal, tanto mediante resonancia magnética 20 nuclear, radiología, como por otros medios de detección conocidos en la técnica.

25 30 Se pueden usar los agentes de unión selectiva de la invención, incluyendo los anticuerpos, como agentes terapéuticos. Estos agentes terapéuticos son en general agonistas o antagonistas porque potencian o reducen, respectivamente, al menos una de las actividades biológicas de un polipéptido MK61. En una forma de realización, los anticuerpos antagonistas de la invención son anticuerpos o fragmentos de unión de los mismos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido MK61 y que son capaces de inhibir o eliminar la actividad funcional de un polipéptido MK61 *in vivo* o *in vitro*. En las formas de realización preferidas, el agente de unión selectiva, por ejemplo, un anticuerpo antagonista, inhibirá la actividad funcional de un polipéptido MK61 en al menos aproximadamente un 50%, y preferiblemente en al menos aproximadamente un 80%. En otra forma de realización, el agente de unión selectiva puede ser un anticuerpo que es capaz de interactuar con una pareja de unión de MK61 (un ligando o un receptor) inhibiendo o eliminando por tanto la actividad de MK61 *in vitro* o *in vivo*. Los agentes de unión selectiva, que incluyen anticuerpos agonistas y antagonistas de antiMK61, se identifican mediante ensayos de selección que son bien conocidos en la técnica.

35 La invención se refiere también a un kit que comprende agentes de unión selectiva de MK61 (tales como anticuerpos) y otros reactivos útiles para detectar los niveles del polipéptido MK61 en muestras biológicas. Dichos reactivos pueden incluir una marca detectable, suero de bloqueo, muestras control positivas y negativas, y reactivos de detección.

40 45 Se pueden usar polipéptidos MK61 para clonar el(es) ligando(s) de MK61 usando una estrategia de “clonación de la expresión”. Se pueden usar el polipéptido MK61 o el polipéptido MK61 “etiquetado para afinidad/actividad” (tal como una fusión Fc o una fusión mediante fosfatasa alcalina) radiomarcados con (<sup>125</sup>yodo) en ensayos de unión para identificar un tipo celular o una línea celular o tejido que expresa el(es) ligando(s) de MK61. A continuación se puede convertir el ARN aislado de dichas células o tejidos en ADNc, clonarse en un vector de expresión en mamíferos, y transfecirse en células de mamíferos (por ejemplo, COS, o 293) para crear una biblioteca de expresión. El polipéptido MK61 radiomarcado o etiquetado se puede usar a continuación como reactivo de afinidad para identificar y aislar el subconjunto de células en esta biblioteca que expresan el(es) ligando(s) de MK61. A continuación se aísla el ADN de estas células y se transfecta en células de mamíferos para crear una biblioteca de expresión secundaria en la que la fracción de células que expresan el(es) ligando(s) de MK61 podría ser muchas veces superior que en la biblioteca original. Este procedimiento de enriquecimiento se puede repetir iterativamente hasta que se aísla un clon recombinante único que contiene un ligando de MK61. El aislamiento del(es) ligando(s) de MK61 es útil para identificar o desarrollar agonistas y antagonistas novedosos de la ruta de señalización de MK61. Dichos agonistas y antagonistas incluyen el(es) ligando(s) de MK61, los anticuerpos del ligando anti-MK61, moléculas pequeñas u oligonucleótidos de sentido contrario. Se puede usar estos para tratar, prevenir, o diagnosticar una o más enfermedades o trastornos, que incluyen los descritos en el presente documento.

50 55 *Ensayo de diferentes moduladores de la actividad del polipéptido MK61*

En algunas situaciones, puede ser deseable identificar moléculas que son moduladores, *es decir*, agonistas o antagonistas de la actividad del polipéptido MK61. Se pueden identificar las moléculas naturales o sintéticas que modulan el polipéptido tipo MK61 usando uno o más ensayos de selección, tales como los descritos en el presente documento. Se pueden administrar dichas moléculas tanto en una manera *ex vivo* como en una manera *in vivo* mediante inyección, o mediante dosificación oral, dispositivo de implante o similar.

60 65 “Molécula(s) de ensayo” se refiere a la(s) molécula(s) que está/están en evaluación para la capacidad de modular (*es decir*, aumentar o disminuir) la actividad de un polipéptido MK61. Más habitualmente, una molécula de ensayo interactuará directamente con un polipéptido MK61. Sin embargo, se contempla también que una molécula de ensayo puede modular también la actividad del polipéptido MK61 indirectamente, tal como afectando la expresión del gen MK61, o uniéndose a una pareja de unión de MK61 (*por ejemplo*, receptor o ligando). En una forma de realización,

## ES 2 327 102 T3

una molécula de ensayo se unirá a un polipéptido MK61 con una constante de afinidad de al menos aproximadamente  $10^{-6}$  M, preferiblemente aproximadamente  $10^{-8}$  M, más preferiblemente aproximadamente  $10^{-9}$  M, e incluso más preferiblemente aproximadamente  $10^{-10}$  M.

5 La presente invención abarca procedimientos para identificar los compuestos que interactúan con los polipéptidos MK61. En algunas formas de realización, se incuba un polipéptido MK61 con una molécula de ensayo en condiciones que permitan la interacción de la molécula de ensayo con un polipéptido MK61, y se pueda medir la extensión de la interacción. Se puede(n) seleccionar la(s) molécula(s) de ensayo en forma sustancialmente purificada o en una mezcla bruta.

10 En algunas formas de realización, un polipéptido MK61 agonista o antagonista puede ser una proteína, péptido, carbohidrato, lípido o molécula de peso molecular pequeño que interactúa con el polipéptido MK61 para regular su actividad. Las moléculas que regulan la expresión del polipéptido MK61 incluyen ácidos nucleicos que son complementarias a los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido MK61, o son complementarias a las secuencias de 15 ácido nucleico que dirigen o controlan la expresión del polipéptido MK61, y que actúan como reguladores de sentido contrario de la expresión.

Una vez se ha identificado un conjunto de moléculas de ensayo como interactuantes con un polipéptido MK61, las 20 moléculas se pueden evaluar adicionalmente para su capacidad para aumentar o disminuir la actividad del polipéptido MK61. Se puede llevar a cabo la medida de la interacción de las moléculas de ensayo con los polipéptidos MK61 en diversos formatos, que incluyen los ensayos de unión basados en células, los ensayos de unión a membrana, los 25 ensayos en fase de solución y los inmunoensayos. En general, las moléculas de ensayo se incuban con un polipéptido MK61 durante un período especificado de tiempo, y se determina la actividad del polipéptido MK61 mediante uno o más ensayos para medir la actividad biológica.

25 Se puede ensayar también la interacción de las moléculas de ensayo con los polipéptidos MK61 directamente usando anticuerpos policlonales o monoclonales en un inmunoensayo. Alternativamente, se pueden usar en los inmunoensayos formas modificadas de polipéptidos MK61 que contienen etiquetas de epitopos, tal como se describe en el presente documento.

30 En el caso que se evalúe el que los polipéptidos MK61 muestren actividad biológica mediante una interacción con una pareja de unión (*por ejemplo*, un receptor o un ligando) se puede usar una variedad de ensayos *in vitro* para 35 medir la unión de un polipéptido MK61 con la correspondiente pareja de unión (tal como un agente de unión selectiva, receptor o ligando). Se usaron estos ensayos para seleccionar las moléculas de ensayo por su capacidad para aumentar o disminuir la velocidad y/o la extensión de la unión de un polipéptido MK61 con su pareja de unión. En un ensayo, se inmoviliza un polipéptido MK61 en los pocillos de una placa de microvaloración. Se añaden la pareja de unión de 40 MK61 radiomarcada (por ejemplo, la pareja de unión de MK61 yodada) y la(s) molécula(s) de ensayo de una en una (en cualquier orden) o simultáneamente en los pocillos. Tras la incubación, se lavan los pocillos y se cuenta (usando un contador por centelleo) la radioactividad para determinar la extensión con la cual se une la pareja de unión al polipéptido MK61. Normalmente, las moléculas de ensayarán en un intervalo de concentraciones, y se puede usar una 45 serie de pocillos control que carezcan de uno o más elementos de los ensayos del test para conseguir precisión en la evaluación de los resultados. Una alternativa a este procedimiento implica invertir las “posiciones” de las proteínas, *es decir*, inmovilizar la pareja de unión de MK61 en los pocillos de la placa de microvaloración, incubar con la molécula de ensayo y el polipéptido MK61 radiomarcado, y determinar la extensión de la unión del polipéptido MK61. Véase, por ejemplo, el capítulo 18 de Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col., eds., John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1995).

Como alternativa al radiomarcado, se pueden conjugar un polipéptido MK61 o su pareja de unión con biotina 50 y a continuación se puede detectar la presencia de la proteína biotinilada usando estreptavidina unida a un enzima, tal como peroxidasa de rábano picante (HRP) o fosfatasa alcalina (AP), se detecta colorimétricamente o mediante 55 etiquetado fluorescente de estreptavidina. Se puede usar también un anticuerpo dirigido a un polipéptido MK61 o a una pareja de unión de MK61 y conjugarla con biotina y se puede detectar tras incubación con estreptavidina unida a enzima unida a AP o HRP.

60 Se puede inmovilizar también un polipéptido MK61 o una pareja de unión de MK61 mediante unión a perlas de agarosa, perlas acrílicas u otros tipos de dichos sustratos inertes en fase sólida. Se puede colocar el complejo sustrato-proteína en una solución que contenga la proteína complementaria y el compuesto de ensayo. Tras la incubación, se precipitan las perlas mediante centrifugación, y se puede ensayar la cantidad de unión entre un polipéptido MK61 y su pareja de unión usando los procedimientos descritos en el presente documento. Alternativamente, el complejo sustrato-proteína se inmoviliza en una columna, y la molécula de ensayo y la proteína complementaria se hacen pasar a través de la columna. Se ensaya la formación de un complejo entre un polipéptido MK61 y su pareja de unión usando cualquiera de las técnicas que se muestran en el presente documento, *es decir*, el radiomarcado, la unión del anticuerpo o similar.

65 Otro ensayo *in vitro* que es útil para identificar una molécula de ensayo que aumenta o disminuye la formación de un complejo entre un polipéptido MK61 y una pareja de unión de MK61 es un sistema detector de resonancia de plasmon superficial tal como un sistema de ensayo BIACore (Pharmacia, Piscataway, NJ). Se puede llevar a cabo el sistema BIACore usando el protocolo del fabricante. Este ensayo implica esencialmente la unión covalente de cualquier poli-

péptido MK61 o una pareja de unión de MK61 con un chip sensor recubierto con dextrano que se ubica en un detector. A continuación se puede injectar el compuesto de ensayo y la otra proteína complementaria, tanto simultánea como secuencialmente, en la cámara que contiene el chip sensor. Se puede ensayar la cantidad de proteína complementaria que se une basándose en el cambio en la masa molecular que se asocia físicamente con la cara recubierta de dextrano del chip sensor. Se puede medir el cambio en la masa molecular mediante el sistema detector.

En algunos casos, puede ser deseable evaluar dos o más compuestos de ensayo conjuntamente para su capacidad de aumentar o disminuir la formación de un complejo entre un polipéptido MK61 y una pareja de unión de MK61. En estos casos, los ensayos que se muestran en el presente documento se pueden modificar fácilmente añadiendo dicho(s) compuesto(s) de ensayos adicional(es) tanto simultáneamente con como posterior a, el primer compuesto de ensayo. El resto de las etapas en el ensayo son tal como se muestran en el presente documento.

Se pueden usar ventajosamente ensayos *in vitro* tal como los descritos en el presente documento para seleccionar gran número de compuestos por los efectos sobre la formación del complejo entre un polipéptido MK61 y una pareja de unión de MK61. Se pueden automatizar los ensayos para seleccionar los compuestos generados en el despliegue de fagos, bibliotecas de péptidos sintéticos y síntesis química.

Se pueden seleccionar también los compuestos que aumentan o disminuyen la formación de un complejo entre un polipéptido MK61 y una pareja de unión de MK61 en un cultivo celular usando células y líneas celulares que expresen tanto el polipéptido MK61 como la pareja de unión de MK61. Se pueden obtener las células y líneas celulares de cualquier mamífero, pero preferiblemente serán de fuentes de ser humano u otro primate, cónido o roedor. Se evalúa la unión de un polipéptido MK61 con las células que expresan la pareja de unión de MK61 en la superficie en presencia o ausencia de moléculas de ensayo, y se puede determinar la extensión de la unión mediante, por ejemplo, citometría de flujo que usa un anticuerpo biotinilado para una pareja de unión de MK61. Se pueden usar ensayos de cultivos celulares ventajosamente para evaluar los compuestos que puntúan positivo en los ensayos de unión de la proteína que se describen en el presente documento.

Se pueden usar también cultivos celulares para seleccionar el impacto de un fármaco candidato. Por ejemplo, los fármacos candidatos pueden disminuir o aumentar la expresión del gen MK61. En algunas formas de realización, se puede medir la cantidad de polipéptido MK61 que se produce tras la exposición del cultivo celular al fármaco candidato. En algunas formas de realización, se puede detectar el impacto real del fármaco candidato sobre el cultivo celular. Por ejemplo, la sobreexpresión de un gen concreto puede tener un impacto concreto sobre el cultivo celular. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un fármaco candidato para aumentar o disminuir la expresión del gen o su capacidad para evitar o inhibir un impacto concreto sobre el cultivo celular. En otros ejemplos, la producción de un producto metabólico concreto tal como un fragmento de un polipéptido puede dar como resultado una, o asociarse con una, enfermedad o dolencia patológica. En dichos casos, se puede ensayar la capacidad de un fármaco candidato para disminuir la producción de dicho producto metabólico en un cultivo celular.

Se puede usar un sistema de levadura doble híbrido (Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU, 88: 9578-9583 (1991)) para identificar polipéptidos novedosos que se unan a, o interactúen con, polipéptidos MK61. Como ejemplo, se pueden usar constructos híbridos que comprendan un ADN que codifique una región citoplásmica de un polipéptido MK61 fusionada a una región de unión del ADN de la levadura GAL4 como un plásmido cebo doble híbrido. Se pueden caracterizar además los clones positivos que emergen de la selección para identificar las proteínas interactivas.

#### 45 *Inhibidores de P38*

Una nueva hipótesis de intervención entre el estímulo extracelular y la secreción de IL-1 y TNF $\alpha$  procedentes de la célula implica bloquear la transducción de la señal mediante la inhibición de una quinasa que se basa en la ruta de la señal. Un ejemplo es a través de la inhibición de P-38 (denominado también "RK" o "SAPK-2", Lee y col., Nature, 372: 739 (1994)), una conocida quinasa ser/thr (clon informado en Han y col., Biochimica Biophysica Acta, 1265: 224-227 (1995)). Se ha demostrado una relación lineal para la eficacia en un ensayo de unión competitiva con P-38, y el mismo inhibidor que disminuye los niveles de secreción de IL-1 de los monocitos tras la estimulación de LPS. Tras la estimulación de LPS de los monocitos, se ha demostrado que los niveles del ARN mensajero de TNF $\alpha$  aumentan 100 veces, pero los niveles de proteínas de TNF $\alpha$  aumentan 10.000 veces. De esta manera, se produce una considerable amplificación de la señalización de TNF a nivel traduccional. Tras la estimulación de LPS de los monocitos en presencia de un inhibidor P-38 no se afectan los niveles del ARNm, pero los niveles de una proteína TNF final se reducen drásticamente (hasta un 80-90% dependiendo de la eficacia del inhibidor P-38). De esta manera, los anteriores experimentos prestan un fuerte apoyo a la conclusión de que la inhibición de P-38 conduce a una disminución de la eficacia traduccional. Se encuentra una evidencia adicional de que TNF $\alpha$  está bajo control traduccional en los experimentos de deleción de Beutler y col. y Lee, en los que los segmentos del ARNm 3' no traducido (3' UTR) se eliminan dando como resultado una elevada eficacia traduccional de TNF $\alpha$ . De forma más importante, los inhibidores P-38 no tienen un efecto sobre el nivel de TNF $\alpha$  (*es decir*, la eficacia traduccional) cuando se eliminan los segmentos apropiados del ARNm de TNF $\alpha$ . De esta manera, los datos correlativos entre el nivel de unión de los inhibidores de P-38 y la disminución de los niveles de IL-1 y TNF $\alpha$  tras la estimulación de LPS con los mismos inhibidores, más la evidencia bioquímica anterior con respecto al efecto de los inhibidores P-38 sobre la eficacia traduccional de TNF $\alpha$  e IL-1 producen una fuerte relación causa efecto. Se está dibujando todavía el papel de P-38 en la célula, por tanto, pueden estar disponibles otros efectos beneficiosos con respecto a las enfermedades inflamatorias u otros estados de enfermedad obtenidos a partir de su inhibición.

Niveles elevados de  $\text{TNF}\alpha$  y/o IL-1 pueden contribuir al inicio, la etiología, o agravar numerosos estados de enfermedad, que incluyen, pero no se limitan a: artritis reumatoide; osteoartritis; espondilitis reumatoide; artritis gotosa; enfermedad inflamatoria del intestino, síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA), psoriasis; enfermedad de Crohn, rinitis alérgica; colitis ulcerosa; anafilaxis; dermatitis de contacto, asmas; terapia antivírica que incluye 5 aquellos virus sensibles a la inhibición de  $\text{TNF}\alpha$  - VIH-1, VIH-2, VIH-3, citomegalovirus (CMV), gripe, adenovirus y los virus del herpes que incluyen VHS-1, VHS-2, y herpes zoster; degeneración del músculo; caquexia; síndrome de Reiter; diabetes tipo II; enfermedades de resorción del hueso; injerto frente a reacción del huésped; lesión por reperfusión de isquemia, atherosclerosis, trauma cerebral; enfermedad de Alzheimer; esclerosis múltiple, malaria cerebral; septicemia; choque séptico; síndrome de choque tóxico; fiebre y mialgias debido a infección.

10 Se han descrito compuestos de imidazol, pirrol, piridina, pirimidina sustituidos y similares para el uso en el tratamiento de las enfermedades mediadas por citoquina mediante la inhibición de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1; IL-6, IL-8, y TNF. Se han descrito imidazoles sustituidos para uso en el tratamiento de las enfermedades mediadas por citoquina en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.593.992; los documentos WO93/14081; WO97/18626; 15 WO96/21452; WO96/21654; WO96/40143; WO97/05878; y WO97/05878. Se han descrito imidazoles sustituidos para uso en el tratamiento de la inflamación en la Patente de los Estados Unidos Nº 3.929.807. Se han descrito compuestos de pirrol sustituido para uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por citoquina en los documentos WO97/05877; WO97/05878; WO97/16426; WO97/16441; y WO97/16442. Se han descrito compuestos de arilo y 20 heteroarilo fusionados con pirrol para uso en el tratamiento de las enfermedades mediadas por citoquina en el documento WO98/22457. Se han descrito compuestos de piridina, pirimidina, pirimidinona, y piridazina para uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por citoquina en los documentos WO98/24780; WO98/24782; WO99/24404; y WO99/32448.

#### *Proteínas internalizantes*

25 Se puede usar la secuencia de la proteína TAT (procedente de VIH) para internalizar las proteínas al interior de una célula por dirección al componente de la bicapa lípida de la membrana celular. Véase por ejemplo, Falwell y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU, 91: 664-668 (1994). Por ejemplo, una secuencia de 11 aminoácidos (YGRKKRRQRR; SEC DE ID Nº: X) de la proteína tat de VIH (denominada la “región de transducción de la proteína”, o PDT de TAT) ha mostrado mediar en la liberación de proteínas bioactivas grandes tales como  $\beta$ -galactosidasa y  $^{32}\text{P}$ Kip a través de la membrana citoplasmática y la membrana nuclear de una célula. Véase Schwarze y col., Science, 285: 1569-1572 (1999); y Nagahara y col., Nature Medicine, 4: 1449-1452 (1998). Schwarze y col., más arriba, demostraron que las células cultivadas adquirieron la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa cuando se expusieron a una fusión entre TAT-PDT y  $\beta$ -galactosidasa. La inyección de ratones con proteínas de fusión TAT- $\beta$ -gal dio como resultado la expresión de  $\beta$ -gal 35 en numerosos tejidos, incluyendo el hígado, riñón, pulmón, corazón y tejido cerebral.

40 Se apreciará de esta manera que se puede usar la secuencia de la proteína TAT para internalizar una proteína o polipéptido deseado en una célula. En el contexto de la presente invención, se puede fusionar la secuencia de la proteína TAT con otra molécula tal como un antagonista de MK61 (es decir, un agente de unión selectiva anti-MK61, molécula 45 pequeña, receptor soluble, u oligonucleótido de sentido contrario) que se puede administrar intracelularmente para inhibir la actividad de una molécula de MK61. Tal como se usa en el presente documento, el término “molécula de MK61” se refiere a moléculas de ácido nucleico de MK61 y polipéptidos MK61 tal como se define en el presente documento. Cuando se deseé, se puede fusionar la propia proteína MK61 o un fragmento de péptido o forma modificada de MI61 de dicho transductor de la proteína para administrar a las células usando los procedimientos descritos anteriormente.

#### *Identificación de la fuente celular usando polipéptidos MK61*

50 De acuerdo con algunas formas de realización de la invención, puede tener utilidad el ser útil ser capaz de determinar la fuente de algunos tipos celulares asociados con un polipéptido MK61. Por ejemplo, puede ser útil para determinar el origen de una enfermedad o dolencia patológica como ayuda en la selección de una terapia apropiada.

#### *Usos terapéuticos*

55 Los polipéptidos y agonistas y antagonistas de la invención son también útiles en el diagnóstico y tratamiento de numerosas enfermedades y trastornos, que incluyen los señalados en el presente documento. Estos incluyen, pero no se limitan a enfermedades y trastornos que implican la proliferación, diferenciación, supervivencia y/o apoptosis de leucocitos y/o osteoclastos. Los polipéptidos y agonistas y antagonistas de la invención son también útiles en la regulación del crecimiento, la supervivencia y/o la apoptosis de linfoma, leucemia, y otras células cancerosas.

60 Se identificó hMK61T1 a partir de una línea celular cancerosa tratada con PMA. Por tanto, se puede regular la producción del receptor superficial de las células hMK61T1 mediante PMA y/u otras señales de crecimiento en el nivel de corte y empalme del ARN. Se identificó un péptido que correspondía a una parte de la región extracelular de hMK61T1 en orina y suero humano mediante el análisis proteómico. Además, se observó la expresión selectiva de hMK61 en bazo, nódulos linfoides, leucocitos de sangre periférica, e hígado fetal tal como se determinó mediante la inmunotransferencia Northern. Los polipéptidos y agonistas y antagonistas de la invención son por tanto también útiles 65 en el diagnóstico y/o el tratamiento de trastornos del sistema inmune (tal como se describe en el presente documento), así como en la protección y regeneración del hígado.

Muchas enfermedades y dolencias médicas se asocian con TNF y se clasifican a menudo como dolencias inflamatorias. Las enfermedades asociadas a TNF incluyen, pero no se limitan a, enfermedades espontáneas o experimentales o dolencias médicas si se asocian con niveles elevados de TNF en los fluidos o tejidos corporales, o si las células o tejidos procedentes del cuerpo producen niveles elevados de TNF en el cultivo. En muchos casos, se pueden reconocer las enfermedades asociadas con TNF mediante: (1) hallazgos patológicos asociados con la enfermedad o dolencia médica que se pueden imitar experimentalmente en animales mediante la administración o sobreregulación de la expresión de TNF, o (2) se puede inhibir o eliminar una patología inducida en modelos animales experimentales de la enfermedad o dolencia médica mediante el tratamiento con agentes que inhibían la acción de TNF. Se entenderá, sin embargo, que el mecanismo de acción de los polipéptidos MK61 no sea necesariamente la inhibición de TNF.

Una lista no exclusiva de enfermedades asociadas a TNF agudas y crónicas incluye, pero no se limita a, las siguientes: caquexia/anorexia, cáncer (*por ejemplo*, leucemias), síndrome de fatiga crónica, dolencias e indicaciones coronarias, que incluyen insuficiencia cardíaca congestiva, restenosis coronaria, infarto de miocardio, e injerto de derivación en la arteria coronaria; depresión; diabetes (*por ejemplo*, debut juvenil de Tipo 1 y diabetes mellitus); endometriosis, endometritis, y enfermedades relacionadas; fibromialgia o analgesia; injerto frente a rechazo del huésped; hiperalgesia; enfermedades inflamatorias del intestino, que incluyen enfermedad de Crohn y diarrea asociada a *Clostridium difficile*; trastornos isquémicos, que incluyen isquemia cerebral (lesión cerebral como resultado de trauma, epilepsia, hemorragia o apoplejía, cada una de las cuales puede conducir a neurodegeneración); enfermedades del pulmón (por ejemplo, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, asma, y fibrosis pulmonar); esclerosis múltiple; enfermedades neuroinflamatorias, enfermedades y dolencias oculares, que incluyen trasplante de córnea, degeneración ocular y uveítis; dolor, que incluye dolor relacionado con cáncer; pancreatitis; enfermedades periodontales, prostatitis (bacteriana o no bacteriana) y dolencias relacionadas, psoriasis y dolencias relacionadas; fibrosis pulmonar; lesión por reperfusión; enfermedades reumáticas (*por ejemplo*, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil (reumatoide), poliartritis seronegativa, espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter y artritis reactiva, enfermedad de Still, artritis psoriática, artritis enteropática, poliomiositis, dermatomiositis, escleroderma, esclerosis sistémica, vasculitis (*por ejemplo*, enfermedad de Kawasaki), vasculitis cerebral, enfermedad de Lyme, artritis inducida por estafilococos ("séptica"), síndrome de Sjögren, fiebre reumática, policondritis y polimialgia reumática y arteritis de las células gigantes); choque séptico; efectos secundarios de la terapia de radiación; lupus sistémico eritematoso, enfermedad de la articulación mandibular temporal; tiroiditis, trasplante de tejido o una dolencia inflamatoria que es el resultado de dolor, torcedura, daño del cartílago, trauma, cirugía ortopédica, infección (*por ejemplo*, VIH, *Clostridium difficile* y especies relacionadas) u otros procesos de enfermedad.

Los inhibidores de TNF $\alpha$  pueden actuar infrarregulando o inhibiendo la producción de TNF, la unión de TNF libre, interfiriendo con la unión de TNF a su receptor, o interfiriendo con la modulación de la señalización de TNF tras la unión con su receptor. El término "inhibidor de TNF $\alpha$ " incluye de esta manera los receptores de TNF solubilizados, los anticuerpos de TNF, los anticuerpos del receptor de TNF, los inhibidores del enzima que convierte TNF $\alpha$  (TACE), y otras moléculas que afectan la actividad de TNF.

Se describen en la técnica inhibidores de TNF $\alpha$  de diversos tipos, incluyendo las siguientes referencias:

Solicitudes de patente europea 308 378; 422 339; 393 438; 398 327; 412 486; 418 014, 417 563, 433 900; 464 533; 512 528; 526 905; 568 928; 663 210; 542 795; 818 439; 664 128; 542 795; 741 707; 874 819; 882 714; 880 970; 648 783; 731 791; 895 988; 550 376; 882 714; 853 083; 550 376; 943 616;

Patentes de los Estados Unidos N°s. 5.136.021; 5.929.117; 5.948.638; 5.807.862; 5.695.953; 5.834.435; 5.817.822; 5.830.742; 5.834.435; 5.851.556; 5.853.977; 5.359.037; 5.512.544; 5.695.953; 5.811.261; 5.633.145; 5.863.926; 5.866.616; 5.641.673; 5.869.677; 5.869.511; 5.872.146; 5.854.003; 5.856.161; 5.877.222; 5.877.200; 5.877.151; 5.886.010; 5.869.660; 5.859.207; 5.891.883; 5.877.180; 5.955.480; 5.955.476; 5.955.435;

Solicitudes de patente internacional (WO) 90/13575, 91/03553, 92/01002, 92/13095, 92/16221, 93/07863, 93/21946, 93/19777, 95/34326, 96/28546, 98/27298, 98/30541, 96/38150, 96/38150, 97/18207, 97/15561, 97/12902, 96/25861, 96/12735, 96/11209, 98/39326, 98/39316, 98/38859, 98/39315, 98/42659, 98/39329, 98/43959, 98/45268, 98/47863, 96/33172, 96/20926, 97/37974, 97/37973, 96/35711, 98/51665, 98/43946, 95/04045, 98/56377, 97/12244, 99/00364, 99/00363, 98/57936, 99/01449, 99/01139, 98/56788, 98/56756, 98/53842, 98/52948, 98/52937, 99/02510, 97/43250, 99/06410, 99/06042, 99/09022, 99/08688, 99/07679, 99/09965, 99/07704, 99/06041, 99/37818, 99/37625, 97/11668;

Solicitudes de patente japonesa (JP) 10147531, 10231285, 10259140, y 10130149, 10316570, 11001481, y 127.800/1991; Solicitud alemana (DE) 19731521; solicitudes británicas (GB) 2218101, 2326881, 2246569.

Para los objetivos de esta invención, las moléculas descritas en estas referencias y las moléculas descritas en las referencias (véase a continuación) se denominan colectivamente "inhibidores de TNF $\alpha$ ".

Por ejemplo, los documentos EP 393.438 y EP 422.339 enseñan las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico de un receptor de TNF soluble de tipo I (conocido también como sTNFR-I o inhibidor de TNF de 30 kDa) y un receptor de TNF soluble de tipo II (conocido también como sTNFR-II o inhibidor de TNF de 40 kDa), denominados colectivamente "sTNFR", así como las formas modificadas de los mismos (por ejemplo, los fragmentos, los derivados y variantes funcionales). Los documentos EP 393.438 y EP 422.339 describen también los procedimientos para aislar

los genes responsables de codificar los inhibidores, la clonación del gen en vectores y tipos celulares adecuados, y la expresión del gen para producir los inhibidores.

5 sTNFR-I y sTNFR-II son miembros de la superfamilia de receptores del factor de crecimiento nervioso/receptor de TNF que incluyen el receptor del factor de crecimiento nervioso (NGF), el antígeno CD40 de las células B, 4-1BB, el antígeno MRC OX40 de las células T de rata, el antígeno fas, y los antígenos CD27 y CD30 (Smith y col., *Science*, 248: 1019-1023 (1990)). La característica más conservada entre este grupo de receptores superficiales celulares es la región de unión al ligando extracelular rica en cisteína, que se puede dividir en cuatro motivos de repetición de aproximadamente cuarenta aminoácidos y que contiene 4-6 restos de cisteína en las posiciones que están 10 bien conservadas (Smith y col. (1990), *más arriba*).

15 Tal como se contempla por la presente invención, se puede administrar un polipéptido MK61 como un adjunto de otra terapia y también con otras formulaciones farmacéuticas adecuadas para la indicación que se está tratando. Se pueden administrar un polipéptido MK61 y cualquiera de una o más terapias adicionales o formulaciones farmacéuticas separadas, secuencial, o simultáneamente.

20 En una forma de realización específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento, o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más inhibidores de la interleucina-1 (IL-1) para el tratamiento de enfermedades sensibles a TNF. Las clases de inhibidores de interleucina-1 25 incluyen los antagonistas del receptor de la interleucina-1 (cualquier compuesto capaz de evitar específicamente la activación de los receptores celulares de IL-1) tal como IL-1ra, tal como se describe a continuación; los anticuerpos monoclonales del receptor anti-IL-1 (*por ejemplo*, documento EP 623.674); las proteínas de unión de IL-1 tal como los receptores de IL-1 solubles (*por ejemplo*, Patentes de los Estados Unidos N°s 5.492.888, 5.488.032, 5.464.937, 5.319.071 y 5.180.812); anticuerpos monoclonales anti-IL-1 (*por ejemplo*, documentos WO95/01997, WO94/02627, 25 WO90/06371, Patente de los Estados Unidos N°. 4.935.343, documentos EP 364,778, EP 267,611 y EP 220,063); proteínas accesorias del receptor de IL-1 (*por ejemplo*, documento WO96/23067), y otros compuestos y proteínas que bloquean la síntesis *in vivo* o la liberación extracelular de IL-1.

30 El antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1ra) es una proteína humana que actúa como un inhibidor natural de la interleucina-1. Los antagonistas del receptor de la interleucina-1, así como los procedimientos de preparación y los procedimientos de uso de los mismos se describen en la Patente de los Estados Unidos 5.075.222; y los documentos WO91/08285; WO91/17184; AU9173636; WO92/16221; WO93/21946; WO94/06457; WO94/21275; FR2706772; WO94/21235; DE4219626; WO94/20517; WO96/22793 y WO97/28828. Las proteínas incluyen antagonistas del receptor IL-1 tanto glicosilados como no glicosilados.

35 40 Específicamente, se describen tres formas preferidas de IL-1ra (IL-1ra $\alpha$ , IL-1ra $\beta$  e IL-1ra $\gamma$ ), codificada cada una por la misma secuencia de codificación de ADN y sus variantes, y se desvelan en la Patente de los Estados Unidos 5.075.222. Se desvelan también en la patente 5.075.222 los procedimientos para producir inhibidores de IL-1, concretamente IL-1ra.

45 Una clase adicional de inhibidores de la interleucina-1 incluye compuestos capaces de evitar específicamente la activación de los receptores celulares de IL-1. Dichos compuestos incluyen las proteínas de unión de IL-1, tales como los receptores y anticuerpos monoclonales solubles. Dichos compuestos incluyen también los anticuerpos monoclonales de los receptores.

50 Una clase adicional de inhibidores de la interleucina-1 incluye compuestos y proteínas que bloquean la síntesis y/o la liberación extracelular *in vivo* de IL-1. Dichos compuestos incluyen los agentes que afectan la transcripción de los genes IL-1 o el procesamiento de las preproteínas IL-1.

55 60 En una forma de realización específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con antígeno fas humano segregado o soluble o versiones recombinantes del mismo (documento WO96/20206 y Mountz y col., *J. Immunology*, 155:4829-4837; y documento EP 510.691). El documento WO96/20206 desvela el antígeno fas humano segregado (natural y recombinante, que incluye una proteína de fusión Ig), los procedimientos para aislar los genes responsables de la codificación de antígeno fas humano recombinante soluble, los procedimientos para la clonación del gen en vectores y tipos de células adecuados, y los procedimientos para expresar el gen para producir los inhibidores. El documento EP 510.691 enseña los ADN que codifican el antígeno fas humano, incluyendo el antígeno fas soluble, los vectores que expresan dichos ADN y los transformantes transfectados con el vector. Cuando se administran parenteralmente, cada una de las dosis de una proteína de fusión del antígeno fas segregado o soluble está en general entre aproximadamente 1 microgramo/kg y aproximadamente 100 microgramos/kg.

65 El tratamiento actual de las enfermedades sensibles a TNF, incluyendo la inflamación aguda y crónica tal como las enfermedades reumáticas, incluye habitualmente el uso de fármacos de primera línea para el control del dolor y la inflamación; estos fármacos se clasifican como fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Los tratamientos secundarios incluyen corticoesteroides, fármacos antirreumáticos de actuación lenta (AARD) o fármacos modificantes de la enfermedad (DM). Se puede encontrar información con respecto a los siguientes compuestos en *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*, Decimosexta Edición, Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories Merck & Co., Rahway, N.J. (1992) y en *Pharmaprojects*, PJB Publications Ltd.

En una forma de realización específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 y cualquiera de uno o más AINE para el tratamiento de las enfermedades sensibles a TNF, incluyendo la inflamación aguda y crónica tal como las enfermedades reumáticas; y la enfermedad de injerto frente a huésped. Los AINE deben su acción antiinflamatoria, al menos en parte, a la inhibición de la síntesis de prostaglandina (Goodman y Gilman en 5 "The Pharmacological Basis of Therapeutics," MacMillan 7<sup>a</sup> Edición (1985)). Se pueden clasificar los AINE en al menos nueve grupos (1) derivados del ácido salicílico; (2) derivados del ácido propiónico; (3) derivados del ácido acético; (4) derivados del ácido fenámico; (5) derivados del ácido carboxílico; (6) derivados del ácido butírico; (7) oxicamos; (8) pirazoles y (9) pirazolonas.

10 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido salicílico, los ésteres de profármacos o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Dichos derivados del ácido salicílico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: acetaminosalol, aloxiprina, aspirina, benorilato, bromosaligenina, acetilsalicilato de calcio, trisalicilato de colina magnesio, salicilato de magnesio, salicilato de colina, diflusinal, etersalato, fendasal, ácido gentísico, salicilato de glicol, salicilato de imidazol, acetilsalicilato de lisina, mesalamina, salicilato de morfolina, salicilato de 1-naftilo, olsalazina, parsalmida, acetilsalicilato de fenilo, salicilato de fenilo, salacetamida, salicilamida del ácido O-acético, salsalato, salicilato de sodio y sulfasalazina. También se pretende que queden abarcados por este grupo los derivados del ácido salicílico estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

20 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido propiónico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados del ácido propiónico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: alminoprofeno, benoxaprofeno, ácido buclóxico, carprofeno, dexindoprofeno, fenoprofeno, flunoxaprofeno, fluprofeno, flurbiprofeno, furcloprofeno, ibuprofeno, aluminio ibuprofeno, ibuproxamo, indoprofeno, isoprofeno, ketoprofeno, loxoprofeno, 25 mioprofeno, naproxeno sodio, oxaprozina, piketoprofeno, pimeprofeno, pirprofeno, pranoprofeno, ácido protizínico, piridoxiprofeno, suprofeno, ácido tiaprofénico y tioxaprofeno. También se pretende que queden abarcados por este grupo los derivados del ácido propiónico estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

30 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido acético, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados del ácido acético, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: acetamicina, alclofenaco, amfenaco, bufexamaco, cinmetacina, clopiraco, delmetacina, potasio diclofenaco, diclofenaco de sodio, etodolaco, felbinaco, fenclofenaco, fencloraco, ácido fenclózico, fentiazaco, flurofenaco, glucometacina, ibufenaco, indometacina, isofezolaco, isoxepaco, lonazolaco, ácido metiazínico, oxametacina, oxpinaoco, pimetacina, proglumetacina, sulindaco, talmetacina, tiaramida, tiopinaco, tolmetina, tolmetina sodio, zidometacina y zomepiraco. También se pretende que queden abarcados por este grupo los derivados del ácido acético estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

40 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido fenámico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados del ácido fenámico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: ácido enfenámico, etofenamato, ácido flufenámico, isonixina, ácido meclofenámico, meclofenamato de sodio, ácido medofenámico, ácido mefenámico, ácido niflúmico, talniflumato, terofenamato, ácido tolfenámico y ufenamato. También se pretende que queden abarcados por este grupo los derivados del ácido fenámico estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

45 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido carboxílico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados del ácido carboxílico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: clidanaco, diflunisal, inoridina, ketorolaco y tinoridina. También se pretende que queden abarcados por este grupo los derivados del ácido carboxílico estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

50 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más derivados del ácido butírico, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los derivados del ácido butírico, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: budamizona, butibufeno y xenbucina. También se pretende que queden abarcados por este grupo los derivados del ácido butírico estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

55 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más oxicamos, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los oxicamos, ésteres de profármacos y sales

farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: droxicamo, enolicamo, isoxicamo, piroxicamo, sudoxicamo, tenoxicamo y 4-hidroxil-1,2-benzotiazina 1,1-dióxido 4-(N-fenil)-carboxamida. También se pretende que queden abarcados por este grupo los oxicamos estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

5 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más pirazoles, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Los pirazoles, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que se pueden usar comprenden: difenamizol y epirizol. También se pretende 10 que queden abarcados por este grupo los pirazoles estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de una o más pirazolonas, ésteres 15 de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de las mismas. Las pirazolonas, ésteres de profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos que se pueden usar comprenden: apazona, azapropazona, benzpiperilona, feprazona, mofebutazona, morazona, oxifenbutazona, fenilbutazona, pipebuzona, propilfenazona, ramifenazona, suxibuzona y tiazolinobutazona. También se pretende que queden abarcadas por este grupo las pirazolonas estructuralmente relacionadas que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

20 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más de los siguientes AINE: ácido  $\epsilon$ -acetamidocaproico, S-adenosilmetionina, ácido 3-amino-4-hidroxibutírico, amixetrina, anitrazafeno, antrafenina, bendazaco, lisinato de bendazaco, benzidamina, beprozina, broperamol, bucoloma, bufezolaco, ciprocuazona, cloximato, dazidamina, deboxamet, detomidina, difenpiramida, difenpiramida, difisalamina, ditazol, emorfazona, mesilato de fanetizol, fenflumizol, floctafenina, flumizol, flunixina, fluprocuaazona, fopirtolina, fosfosal, guaimesal, guaiazoleno, isonixirn, HCl de lefetamina, leflunomida, lofemizol, lotifazol, clonixinato de lisina, meseclazona, nabumetona, nictindol, nimesulida, orgoteina, orpanoxina, oxaceprol, oxapadol, paranilina, perisoxal, citrato de perisoxal, pifoxima, piproxeno, pirazolaco, pirfenidona, procuaazona, proxazol, tielavina B, tiflazimol, timegadina, tolectina, tolpadol, triptamida y aquellos designados mediante el código numérico de la compañía tales como 480156S, AA861, AD1590, AFP802, AFP860, AI77B, AP504, AU8001, BPPC, BW540C, CHINOIN 127, CN100, EB382, EL508, F1044, FK-<sup>1</sup>506, GV3658, ITF182, KCNTEI6090, KME4, LA2851, MR714, MR897, MY309, ONO3144, PR823, PV102, PV108, R830, RS2131, SCR152, SH440, SIR133, SPASS10, SQ27239, ST281, SY6001, TA60, TAI-901 (ácido 4-benzoil-1-indancarboxílico), TVX2706, U60257, UR2301 y WY41770. También se pretende que queden 35 abarcados por este grupo los AINE estructuralmente relacionadas que tengan propiedades analgésicas y antiinflamatorias similares a los AINE.

En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más corticoesteroides, 40 ésteres de profármacos o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades sensibles a TNF, que incluyen la inflamación aguda y crónica tal como las enfermedades reumáticas, el injerto frente a la enfermedad del huésped y la esclerosis múltiple. Los corticoesteroides, ésteres de profármacos y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen hidrocortisona y los compuestos que se derivan de la hidrocortisona tales como 21-acetoxipregnolona, alclomerasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, 45 valerato de betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, propionato de clobetasol, clobetasona, butirato de clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacona, desonida, desoximerasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucloronida, flumetasona, pivalato de flumetasona, flucinolona acetonida, flunisolida, fluocinonida, fluorocinolona acetonida, fluocortin butil, fluocortolona, hexanoato de fluocortolona, valerato de diflucortolona, acetato de fluorometolona, fluperolona, acetato de fluprednide-50, fluprednisolona, flurandenolida, formocortal, halcinonida, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, fosfato de hidrocortisona, succinato de hidrocortisona 21-sodio, tebutato de hidrocortisona, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, furoato de mometasona, parametasona, prednicarbato, prednisolona 21-diedriaminoacetato de prednisolona, fosfato de sodio prednisolona, succinato de sodio prednisolona, 21-m-sulfobenzoato de sodio prednisolona, 21-eステアログリコレート de sodio prednisolona, tebutato de prednisolona, 21-trimetilacetato de prednisolona, prednisona, prednival, prednilideno, 55 21-dietilaminoacetato de prednilideno, tixocortol, triamcinolona, triamcinolona acetonida, triamcinolona benetonida y triamcinolona hexacetonida. También se pretende que queden abarcados por este grupo los corticoesteroides estructuralmente relacionadas que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

60 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o fármacos antirreumáticos de actuación lenta (SAARD) o los fármacos antirreumáticos que modifican la enfermedad (DMARD), ésteres de profármacos o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de las enfermedades sensibles a TNF, que incluyen la inflamación aguda y crónica tal como las enfermedades reumáticas, el injerto frente a la 65 enfermedad del huésped y la esclerosis múltiple. Los SAARD o DMARD, ésteres de profármacos o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos comprenden: sodio alocupreido, auranofina, aurotioglucosa, aurotioglicánido, azatioprina, brequinar sodio, bucilamina, 3-aurotio-2-propanol-1-sulfonato de calcio, clorambucilo, cloroquina, clozubarit, cuproxolina, ciclofosfamida, ciclosporina, dapsona, 15-desoxiespergualina, diacereina, glucosamina, sales de

5 oros (por ejemplo, sal de cicloquina oro, tiomalato de oro sodio, tiosulfato de oro sodio), hidroxicloroquina, sulfato de hidroxicloroquina, hidroxiurea, kebuzona, levamisol, lobenzarit, melitina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mizoribina, micofenolato de mofetilo, mioral, mostaza de nitrógeno, D-penicilamina, piridinol imidazoles tales como SKNF86002 y SB203580, rapamicina, tioles, timopoietina y vincristina. También se pretende que queden abarcados por este grupo los SAARD o DMARD estructuralmente relacionados que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

10 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más inhibidores de COX2, ésteres de profármacos o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de enfermedades sensibles a TNF, que incluyen inflamación aguda o crónica. Los ejemplos de inhibidores de COX2, ésteres de profármacos o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos incluyen, por ejemplo, celecoxib. También se pretende que queden abarcados por este grupo los inhibidores de COX2 estructuralmente relacionadas que tengan similares propiedades analgésicas y antiinflamatorias.

15 En una forma de realización más específica, la presente invención se dirige al uso de un polipéptido MK61 en combinación (pretratamiento, post-tratamiento o tratamiento paralelo) con cualquiera de uno o más antimicrobianos, ésteres de profármacos o las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos para el tratamiento de enfermedades sensibles a TNF, que incluyen inflamación aguda o crónica. Los antimicrobianos incluyen por ejemplo, las amplias 20 clases de penicilinas, cefalosporinas y otras beta-lactamas, aminoglicósidos, azoles, quinolonas, macrólidos, rifamicinas, tetraciclinas, sulfonamidas, lincosamidas y polimixinas. Las penicilinas incluyen, pero no se limitan a penicilina G, penicilina V, meticilina, nafcilina, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, floxacilina, ampicilina, ampicilina/sulbactama, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato, hetacilina, ciclacilina, bacampicilina, carbenicilina, carbenicilina indanilo, ti-carcilina, ticarcilina/clavulanato, azlocilina, mezlocilina, peperacilina, y mecilinama. Las cefalosporinas y otras beta-lactamas incluyen, pero no se limitan a cefalotina, cefapirina, cefalexina, cefradina, cefazolina, cefadroxilo, cefaclor, cefamandol, cefotetan, cefoxitin, ceruroxima, cefonicida, ceforadina, cefixima, cefotaxima, moxalactama, ceftizoxima, cetriaxona, cefoperazona, ceftazidima, imipenem y aztreonam. Los aminoglicósidos incluyen, pero no se limitan a estreptomicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina, kanamicina and neomicina. Los azoles incluyen, pero no se limitan a fluconazol. Las quinolonas incluyen, pero no se limitan a ácido nalidíxico, norfloxacina, enoxacina, 25 ciprofloxacina, ofloxacina, esparfloxacina y temafloxacina. Los macrólidos incluyen, pero no se limitan a eritomicina, espiramicina y azitromicina. Las rifamicinas incluyen, pero no se limitan a rifampina. The tetraciclinas incluyen, pero no se limitan a espicicina, clortetraciclina, clomocicicina, demeclocicicina, desoxicicicina, guamecicicina, limecicicina, mecloxicicina, metacicicina, minocicicina, oxitetraciclina, penimepicicicina, pipacicicina, rolitetraciclina, sancicicina, senocicicina y tetraciclina. Las sulfonamidas incluyen, pero no se limitan a sulfanilamida, sulfametoxazol, sulfacetamida, sulfadiazina, sulfisoxazol y co-trimoxazol (trimetoprima/sulfametoxazol). Las lincosamidas incluyen, pero no se limitan a clindamicina y lincomicina. Las polimixinas (polipéptidos) incluyen, pero no se limitan a polimixina B y 30 colistina.

#### 40 Composiciones y administración de MK61

45 Las composiciones terapéuticas comprendidas dentro del alcance de la presente invención incluyen composiciones farmacéuticas de MK61 que pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido MK61 o una molécula de ácido nucleico de MK61 en premezcla con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable seleccionado para que sea adecuado para el modo de administración en un animal humano o no humano tal como un mamífero. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más agentes de unión selectiva de MK61 en premezcla con un agente de formulación farmacéutica o fisiológicamente aceptable seleccionado para que sea adecuado para el modo de administración.

50 Los materiales de formulación aceptables son preferiblemente no tóxicos para los huéspedes en las dosificaciones y concentraciones empleadas.

55 La composición farmacéutica puede contener materiales de formulación para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la isotonicidad, el olor, la esterilidad, la estabilidad, la velocidad de disolución o liberación, la adsorción o la penetración de la composición. Los materiales de formulación adecuados, incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos (tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina); antimicrobianos; antioxidantes (tales como ácido ascórbico, sulfito de sodio o hidrogenosulfito de sodio); tampones (tales como borato, bicarbonato, Tris-HCl, citratos, fosfatos u otros ácidos orgánicos); agentes de volumen (tales como manitol o glicina); agentes quelantes (tales como ácido etilendiamino tetraacético (EDTA)); agentes complejantes (tales como cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina); rellenos; monosacáridos; disacáridos; y otros carbohidratos (tales como glucosa, manosa o dextrinas); proteínas (tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas); agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes; agentes emulsificantes; polímeros hidrófilos (tales como polivinilpirrolidona); polipéptidos de bajo peso molecular; contraiones que forman sales (tales como sodio); conservantes (tales como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol de fenetilo, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sódico o peróxido de hidrógeno), disolventes (tales como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol); alcoholes de azúcares (tales como manitol o sorbitol); agentes suspensores; tensioactivos o agentes humectantes (tales como plurónicos, PEG, ésteres de sorbitán, polisorbitatos tales como polisorbitato 20, polisorbitato 80, trítón, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal); agentes potenciadores de la estabilidad (tales como sacarosa o sorbitol), agentes potenciadores de la tonicidad (tales como haluros de metales alcalinos,

preferiblemente cloruro de sodio o potasio, manitol, sorbitol); vehículos de administración; diluyentes; excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos. (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Edición, A. R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company (1990).

- 5 Una persona experta en la técnica determinará la composición farmacéutica óptima dependiendo de, por ejemplo, la ruta pretendida de administración, el formato de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences, más arriba*. Dichas composiciones pueden influenciar el estado físico, la estabilidad la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de aclaramiento *in vivo* de la molécula de MK61.
- 10 El excipiente o vehículo primario en una composición farmacéutica puede ser tanto acuoso como no acuoso en la naturaleza. Por ejemplo, un excipiente o vehículo adecuado puede ser agua para inyección, solución salina fisiológica o fluido cerebroespinal artificial, suplementado posiblemente con otros materiales comunes en las composiciones para la administración parenteral. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina de suero son excipientes adicionales a modo de ejemplo. Otras composiciones farmacéuticas a modo de ejemplo comprenden tampón Tris de pH aproximado 7,0-8,5, o tampón acetato de pH aproximado 4,0-5,5, que puede incluir además sorbitol o un sustituto adecuado del anterior. En una forma de realización de la presente invención, se pueden preparar composiciones de polipéptido MK61 para almacenamiento mezclando la composición seleccionada para que tenga el grado deseado de pureza con agentes de formulación opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences, más arriba*) en la forma de una torta liofilizada o una solución acuosa. Además, el producto del polipéptido MK61 se puede 20 formular como liofilizado usando excipientes apropiados tales como sacarosa.

25 Se pueden seleccionar las composiciones farmacéuticas de MK61 para administración parenteral. Se pueden seleccionar, alternativamente, composiciones para inhalación o para administración a través del tracto digestivo, tal como por vía oral, o a través de otras rutas de administración conocidas en la técnica. La preparación de dichas composiciones farmacéuticamente aceptables está comprendida dentro del alcance de la persona experta en la técnica.

30 Los componentes de la formulación están presentes en concentraciones que son aceptables en el emplazamiento de la administración. Por ejemplo, se usan tampones para mantener la composición a pH fisiológico o a un pH ligeramente inferior, normalmente comprendido dentro de un intervalo de pH de entre aproximadamente 5 a aproximadamente 8.

35 Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para uso en esta invención pueden estar en forma de una solución acuosa libre de pirogénico parenteralmente aceptable que comprende la molécula de MK61 deseada en un excipiente farmacéuticamente estable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es el agua destilada estéril en la que se formula una molécula de MK61 como una solución isotónica estéril, apropiadamente preservada. Otra preparación adicional puede implicar la formulación de la molécula deseada con un agente, tal como microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (tales como ácido poliláctico o ácido poliglicólico), perlas o liposomas, que proporcionan la liberación controlada o mantenida del producto que a continuación se puede dosificar mediante una inyección en depósito. Se puede usar también ácido hialurónico y esto puede tener el efecto de conseguir la duración mantenida en circulación. Otros medios adecuados 40 para la introducción de la molécula deseada incluyen dispositivos de administración del fármaco implantables.

45 En una forma de realización, se puede formular una composición farmacéutica para inhalación. Por ejemplo, se puede formular una molécula de MK61 como un polvo seco para inhalación. Se pueden formular también soluciones de inhalación del polipéptido MK61 o la molécula de ácido nucleico de MK61 con un propelente para la administración en aerosol. En otra forma de realización adicional, las soluciones se pueden nebulizar. Se describe además la administración pulmonar en la solicitud PCT nº PCT/US94/001875, que describe la administración pulmonar de las proteínas químicamente modificadas.

50 Se contempla también que se pueden administrar algunas formulaciones por vía oral. En una forma de realización de la presente invención, se pueden formular moléculas de MK61 que se administran de esta manera con o sin aquellos excipientes habitualmente usados en la composición de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas por ejemplo, se puede diseñar una cápsula para liberar la porción activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en el que se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Se pueden incluir agentes adicionales para facilitar la absorción de la molécula de MK61. Se pueden emplear también diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes suspensores, comprimidos de agentes desintegrandes, y ligantes.

55 Otra composición farmacéutica puede implicar una cantidad eficaz de moléculas de MK61 en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua estéril, u otro excipiente adecuado, se pueden preparar soluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, diluyentes inertes, tales como carbonato de calcio, carbonato o bicarbonato de sodio, lactosa, o fosfato de calcio; o agentes ligantes, tales como almidón, gelatina, o acacia; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, o talco.

60 Serán evidentes composiciones farmacéuticas de MK61 adicionales para aquellas personas expertas en la técnica, incluyendo las formulaciones que implican polipéptidos MK61 en formulaciones de administración mantenida o controlada. Las personas expertas en la técnica conocen también las técnicas para formular una variedad de diferentes medios de administración mantenida o controlada, tales como vehículos d liposomas, micropartículas bioerosionables

o perlas porosas y depósitos de inyección. Véase por ejemplo, la Solicitud PCT N° PCT/US93/00829 que describe la liberación controlada de micropartículas poliméricas porosas para la administración de composiciones farmacéuticas. Los ejemplos adicionales de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, *por ejemplo*, películas, o microcápsulas. Las matrices de liberación mantenida 5 pueden incluir poliésteres, hidrogeles, poliláctidos (documentos U.S. 3.773.919 y EP 058.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y col., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poli (2-hidroxietilmacrilato) (Langer y col., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981) y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), acetato de etilén vinilo (Langer y col., *más arriba*) o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988). Las composiciones de 10 liberación mantenida pueden incluir también liposomas, que se pueden preparar mediante cualquiera de los diversos procedimientos conocidos en la técnica, Véanse por ejemplo, Eppstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU*, 82: 3688-3692 (1985); EP 036.676; EP 088.046 y EP 143, 949.

La composición farmacéutica de MK61 que se va a usar para la administración *in vivo* debe normalmente ser estéril. Esto se puede llevar a cabo mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición se liofiliza, la esterilización que usa este procedimiento se puede llevar a cabo tanto antes como después de la liofilización y la reconstitución. Se puede almacenar la composición para administración parenteral en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales en general se colocan en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Una vez se ha formulado la composición farmacéutica, ésta se puede almacenar en viales estériles en forma de solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o en forma de polvo deshidratado o liofilizado. Se pueden almacenar dichas formulaciones en una forma lista para su uso (*por ejemplo*, liofilizada) que requiere la reconstitución antes de la administración.

En una forma de realización específica, la presente invención se dirige a kits para producir una unidad de administración en dosis única. Cada uno de estos kits puede contener un primer contenedor que tiene una proteína seca y un segundo contenedor que tiene una formulación acuosa. Incluidos también dentro del alcance de esta invención están los kits que contienen jeringas prerrellenas de cámara simple y múltiple (*por ejemplo*, jeringas para líquidos y liojeringas).

La cantidad eficaz de una composición farmacéutica de MK61 que se puede emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, del contexto y los objetivos terapéuticos. Una persona experta en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación 35 para la que se está usando la molécula de MK61, la ruta de administración, y el tamaño (peso corporal, superficie corporal o tamaño del órgano) y el estado (la edad y la salud general) del paciente. De acuerdo con esto, el médico puede valorar la dosificación y modificar la ruta de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación óptima puede oscilar entre aproximadamente 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta aproximadamente 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En otras formas de realización, la dosificación puede oscilar entre 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  40 hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta aproximadamente 100 mg/kg; o 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta aproximadamente 100 mg/kg.

La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de la molécula de MK61 en la formulación usada. Normalmente, un médico administrará la composición hasta que se alcance una dosificación que 45 consiga el efecto deseado. Se puede por tanto administrar la composición en forma de dosis única, o de dos o más dosis (que pueden contener o no la misma cantidad de la molécula deseada) en el tiempo, o en forma de infusión continua mediante un dispositivo o catéter de implante. Las personas normalmente expertas en la técnica realizan el refinamiento adicional de la dosificación apropiada de manera rutinaria y está comprendido dentro del ámbito de las tareas llevadas a cabo normalmente por ellos. Se pueden establecer las dosificaciones apropiadas mediante el uso de 50 datos de dosis-respuesta apropiados que se obtienen de manera rutinaria.

La ruta de administración de la composición farmacéutica está de acuerdo con los procedimientos conocidos (*por ejemplo*, por vía oral, mediante rutas de inyección intravenosa, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimal), intra-cerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, o intralesional; mediante sistemas de liberación mantenida o mediante dispositivos de implante. Cuando se desea, se pueden administrar las composiciones mediante inyección de bolo o continuamente mediante infusión, o mediante dispositivo de implante).

Alternativa o adicionalmente, se puede administrar la composición localmente mediante implante de una membrana, esponja u otro material apropiado sobre el que la molécula deseada se ha absorbido o encapsulado. Cuando se usa 60 un dispositivo de implante, se puede implantar el dispositivo en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de la molécula deseada puede ser mediante difusión, liberación de bolo mantenida en el tiempo, o administración continua.

En algunos casos, puede ser deseable usar composiciones farmacéuticas de MK61 de una manera *ex vivo*. En dichos 65 ejemplos, las células, tejidos u órganos que se han retirado de un paciente se exponen a composiciones farmacéuticas de MK61 tras las cuales, las células, tejidos y/u órganos se vuelven a implantar posteriormente en el paciente.

En otros casos, se puede administrar un polipéptido MK61 implantando algunas células que se han diseñado mediante ingeniería genética, usando procedimientos tales como los descritos en el presente documento, para expresar y segregar el polipéptido. Dichas células pueden ser células animales o humanas, y pueden ser autólogas, heterólogas, o xenogénicas. Opcionalmente, se pueden inmortalizar las células. Con el fin de disminuir la posibilidad de una respuesta inmunológica, se pueden encapsular las células para evitar la infiltración en los tejidos circundantes. Los materiales de encapsulación son normalmente espacios o membranas poliméricos biocompatibles semipermeables que permiten la liberación del(de los) producto(s) de la proteína, pero que evitan la destrucción de las células por el sistema inmune del paciente o por otros factores perjudiciales de los tejidos que las rodean.

Las formas de realización adicionales de la presente invención se refieren a células y procedimientos (por ejemplo, recombinación homóloga y/u otros procedimientos de producción recombinantes) para la producción *in vitro* de polipéptidos terapéuticos y para la producción y administración de polipéptidos terapéuticos mediante terapia génica o terapia celular. Se pueden usar homólogos y otros procedimientos de recombinación para modificar una célula que contiene un gen MK61 normalmente silenciado en la transcripción, o un gen infraexpresado, y producir por tanto una célula que expresa cantidades terapéuticamente eficaces de los polipéptidos MK61.

La recombinación homóloga es una técnica originalmente desarrollada para dirigir genes para que induzcan o corrijan mutaciones en genes transcripcionalmente activos (Kucherlapati, Prog. en Nucl. Acid Res. & Mol. Biol., 36: 301, (1989)). La técnica básica se desarrolló como un procedimiento para introducir mutaciones específicas en regiones específicas de un genoma de mamíferos (Thomas y col., Cell, 44: 419-428 (1986); Thomas y Capecchi, Cell, 51: 503-512 (1987); Doetschman y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 85: 8583-8587 (1988)) o para corregir mutaciones específicas en el interior de genes defectivos (Doetschman y col., Nature, 330: 576-578 (1987)). Se describen las técnicas de recombinación homóloga a modo de ejemplo en la Patente de los Estados Unidos Nº 5.272.071 (documento EP 9193051, Publicación EP Nº 505500 y documento PCT/US90/07642, Publicación Internacional Nº WO 91/09955).

Mediante la recombinación homóloga, se puede dirigir la secuencia de ADN que se va a insertar en el genoma de una región específica del gen de interés mediante la unión con su ADN diana. El ADN dirigido es una secuencia de nucleótidos que es complementaria (homóloga) de una región del ADN genómico. Pequeñas piezas del ADN dirigido que son complementarias de una región específica del genoma se ponen en contacto con la cadena parental durante el proceso de replicación del ADN. Es una propiedad general del ADN que se ha insertado en una célula que se hibride y por tanto, se recombine con otras piezas del ADN endógeno mediante regiones homólogas compartidas. Si esta cadena complementaria se une a un oligonucleótido que contiene una mutación o una secuencia diferente o un nucleótido adicional, éste se incorpora también en la cadena sintetizada de nuevo como resultado de la recombinación. Como resultado de la función de corrección, es posible que la nueva secuencia de ADN sirva como plantilla. De esta manera, el ADN transferido se incorpora al genoma.

Unidas a estas piezas del ADN dirigido están las regiones del ADN que pueden interactuar con o controlar la expresión de un polipéptido MK61, *por ejemplo*, las secuencias de flanqueo. Por ejemplo, se inserta un elemento promotor/potenciador, un supresor o un elemento exógeno modulador de la transcripción en el genoma de la célula huésped pretendida en la cercanía y orientación suficiente para influenciar la transcripción del ADN que codifica el polipéptido MK61 deseado. El elemento de control controla una porción del ADN presente en el genoma de la célula huésped. De esta manera, se puede conseguir la expresión del polipéptido MK61 deseado no mediante la transfección del ADN que codifica el gen MK61 por sí misma, sino en su lugar mediante el uso de ADN dirigido (que contiene las regiones de homología con el gen endógeno de interés), acoplado a los segmentos reguladores del ADN que proporcionan la secuencia del gen endógeno con señales reconocibles para la transcripción de un gen MK61.

En un procedimiento a modo de ejemplo, la expresión de un gen diana en una célula (*es decir*, un gen celular endógeno deseado) se altera mediante la recombinación homóloga en el genoma celular en un emplazamiento preseleccionado mediante la introducción de ADN que incluye al menos una secuencia reguladora, un exón y un emplazamiento donante de corte y empalme. Estos componentes se introducen en el ADN cromosómico (genómico) de tal manera que éste, en efecto, da como resultado la producción de una nueva unidad de transcripción (en la que la secuencia reguladora, el exón y el emplazamiento donante de corte y empalme presentes en el constructo de ADN se unen de manera operativa al gen endógeno). Como resultado de la introducción de estos componentes en el ADN cromosómico, se altera la expresión del gen endógeno deseado.

La expresión del gen alterado, tal como se describe en el presente documento, abarca la activación (o hace que se exprese) de un gen que es normalmente silencioso (no expresado) en la célula que se obtiene, así como un aumento de la expresión de un gen que no se expresa a niveles fisiológicamente significativos en la célula que se obtiene. Las formas de realización abarcan además el cambio del modelo de regulación o inducción de tal manera que es diferente del modelo de regulación o inducción que se produce en la célula que se obtiene, y la reducción (que incluye la eliminación) de la expresión de un gen que se expresa en la célula que se obtiene.

Un procedimiento por el cual se puede usar la recombinación homóloga para aumentar, o producir la producción del polipéptido MK61 a partir de un gen MK61 endógeno de una célula implica en primer lugar usar la recombinación homóloga para colocar una secuencia de recombinación en un sistema de recombinación específico del emplazamiento (por ejemplo, Cre/loxP, FLP/FRT) (véase, Sauer, Current Opinion In Biotechnology, 5: 521-527 (1994) y Sauer, Methods In Enzymology, 225: 890-900 (1993)) en la dirección 5' (esto es, 5' respecto de) de la región de codificación

del polipéptido MK61 genómico endógeno de la célula. Se introduce un plásmido que contiene un emplazamiento de recombinación homólogo al del emplazamiento que se coloca justo en la dirección 5' de la región de codificación del polipéptido MK61 genómico en la línea celular modificada junto con el enzima recombinasa apropiado. Este enzima recombinasa hace que el plásmido se integre, mediante el emplazamiento de recombinación del plásmido, en el emplazamiento de recombinación localizado justo en la dirección 5' de la región de codificación del polipéptido MK61 genómico en la línea celular (Baubonis y Sauer, Nucleic Acids Res., 21: 2025-2029, 1993 y O'Gorman y col., Science, 251: 1351-1355 (1991)). Cualquier secuencia de flanqueo conocida por aumentar la transcripción (por ejemplo, potenciador/promotor, intrón o potenciador traduccional), si se posiciona apropiadamente en este plásmido, se integraría de tal manera que crearía una unidad transcripcional nueva o modificada dando como resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido MK61 a partir del gen MK61 endógeno de la célula.

Un procedimiento adicional para usar la línea celular en la que la secuencia de recombinación específica del emplazamiento se ha colocado justo en la dirección 5' de la región que codifica el polipéptido MK61 genómico endógeno es usar la recombinación homóloga para introducir un segundo emplazamiento de recombinación en otra parte del genoma de la línea celular. A continuación se introduce el enzima recombinasa apropiado en el segundo emplazamiento de recombinación de la línea celular, produciendo un episodio de recombinación (delección, inversión, o translocación) (Sauer, Current Opinion In Biotechnology, más arriba (1994) y Sauer, Methods In Enzymology, más arriba, (1993)) que crearía una unidad transcripcional nueva o modificada dando como resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido MK61 a partir del gen MK61 endógeno de la célula.

Una solución adicional para aumentar, o producir, la expresión del polipéptido MK61 a partir de un gen MK61 endógeno de la célula implica aumentar, o producir, la expresión de un gen o genes (*por ejemplo*, los factores de transcripción) y/o disminuir la expresión de un gen o genes (*por ejemplo*, los represores transcripcionales) de una manera que de como resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido MK61 a partir del gen MK61 endógeno de la célula. Este procedimiento incluye la introducción de un polipéptido que no se produce naturalmente (*por ejemplo*, un polipéptido que comprende una región de unión al ADN específica de el emplazamiento fusionada a una región del factor transcripcional) de tal manera que de cómo resultado la producción *de novo* o aumentada del polipéptido MK61 a partir del gen MK61 endógeno de la célula.

La presente invención se refiere además a constructos de ADN útiles en el procedimiento de alterar la expresión de un gen diana. En algunas formas de realización, los constructos de ADN a modo de ejemplo comprenden: (a) una o más secuencias diana; (b) una secuencia reguladora; (c) un exón y (d) un emplazamiento donante de corte y empalme no emparejado. La secuencia diana en el constructo de ADN dirige la integración de los elementos (a)-(d) en un gen diana en una célula de tal manera que los elementos (b)-(d) se unen de manera operativa a las secuencias del gen diana endógeno. En otra forma de realización, los constructos de ADN comprenden: (a) una o más secuencias diana, (b) una secuencia reguladora, (c) un exón, (d) un emplazamiento donante de corte y empalme, (e) un intrón y (f) un emplazamiento aceptor de corte y empalme, en el que la secuencia diana dirige la integración de los elementos (a)-(f) de tal manera que los elementos de (b)-(f) se unen de manera operativa al gen endógeno. La secuencia diana es homóloga con el emplazamiento preseleccionado en el ADN cromosómico con cuya recombinación homóloga se produce éste. En el constructo, el exón es en general el 3' de la secuencia reguladora y el emplazamiento donante de corte y empalme es el 3' del exón.

Si se conoce la secuencia de un gen concreto, tal como la secuencia del ácido nucleico del polipéptido MK61 presentada en el presente documento, se puede sintetizar una pieza de ADN que sea complementaria de una región seleccionada del gen u obtenerse de otra manera, tal como mediante la restricción apropiada del ADN natural en los emplazamientos de reconocimiento específicos que se unen a la región de interés. Esta pieza sirve como una(s) secuencia(s) diana tras la inserción en la célula en la que hibridará con su región homóloga en el interior del genoma. Se piensa convencionalmente que si se produce esta hibridación durante la replicación del ADN, esta pieza de ADN, y a cualquier secuencia adicional unida a la anterior, actuará como un fragmento Okazaki y se incorporará en la cadena hija de ADN sintetizada de nuevo. La presente invención, por tanto, incluye los nucleótidos que codifican un polipéptido MK61, cuyos nucleótidos se pueden usar como secuencias diana.

Se contempla también la terapia celular del polipéptido MK61, por ejemplo, el implante de células que produce polipéptidos MK61. Esta forma de realización implica implantar células capaces de sintetizar y segregar una forma biológicamente activa del polipéptido MK61. Dichas células que producen el polipéptido MK61 pueden ser células que sean productoras naturales de polipéptidos MK61 o pueden ser células recombinantes cuya capacidad para producir polipéptidos MK61 se ha aumentado mediante transformación con un gen que codifica el polipéptido MK61 deseado o con un gen que aumenta la expresión del polipéptido MK61. Se puede llevar a cabo dicha modificación por medio de un vector adecuado para administrar el gen así como promoviendo su expresión y secreción. Co el fin de minimizar una reacción inmunológica potencial en pacientes a los que se está administrando un polipéptido MK61, como puede producirse con la administración de un polipéptido de una especie extraña, se prefiere que las células naturales que producen el polipéptido MK61 sean de origen humano y produzcan el polipéptido MK61 humano. Igualmente, se prefiere que las células recombinantes que producen el polipéptido MK61 se transformen con un vector de expresión que contenga un gen que codifique un polipéptido MK61 humano.

Se pueden encapsular las células implantadas para evitar la infiltración en el tejido circundante. Se pueden implantar células animales humanas o no humanas en pacientes con espacios poliméricos biocompatibles semipermeables o en membranas que permitan la liberación del polipéptido MK61 pero eviten la destrucción de las células por el sistema

inmune del paciente o por otros factores perjudiciales procedente del tejido que la rodea. Alternativamente, las propias células del paciente, transformadas para producir los polipéptidos MK61 *ex vivo*, se pueden implantar directamente en el paciente sin dicha encapsulación.

5 Se conocen en la técnica las técnicas para la encapsulación de células vivas, y se puede llevar a cabo de manera rutinaria la preparación de las células encapsuladas y su implante en pacientes. Por ejemplo, Baetge y col. (documentos WO 95/05452 y PCT/US94/C9299) describen cápsulas de membranas que contienen células diseñadas mediante ingeniería genética para la administración eficaz de moléculas biológicamente activas. Las cápsulas son biocompatibles y fácilmente recuperables. Las cápsulas encapsulan las células transfectadas con moléculas de ADN recombinante que 10 comprenden secuencias de ADN que codifican moléculas biológicamente activas unidas de manera operativa a promotores que no están sujetos a la infraregulación *in vivo* tras el implante en un huésped de mamíferos los dispositivos proporcionan la administración de las moléculas de las células vivas en emplazamientos específicos en el interior de un huésped. Además, Véanse las Patente de los Estados Unidos N°s 4.892.538, 5.011.472 y 5.106.627. Se describe un sistema para encapsular células vivas en la Solicitud PCT n° PCT/US91/00157 de Aebischer y col. Véanse también, la 15 Solicitud PCT n°. PCT/US91/00155 de Aebischer y col.; Winn y col., Exper. Neurol., 113: 322-329 (1991), Aebischer y col., Exper. Neurol., 111: 269-275 (1991); y Tresco y col., ASAIO, 38: 17-23 (1992).

Se prevee también la administración de terapia génica *in vitro* e *in vivo* de polipéptidos MK61. Un ejemplo de una 20 técnica de terapia génica es el uso del gen MK61 (tanto con ADN genómico como con ADNc y/o ADN sintético) que codifica un polipéptido MK61 que se puede unir de manera operable a un promotor constitutivo o inducible para formar un “constructo de ADN de terapia génica”. El promotor puede ser homólogo o heterólogo para el gen MK61 endógeno, proporcionando que éste sea activo en el tipo de célula o tejido en el que se inserta el constructo. Otros componentes del constructo de ADN de terapia génica pueden incluir opcionalmente moléculas de ADN diseñadas para la integración específica del emplazamiento (*por ejemplo*, secuencias endógenas útiles para la recombinación 25 homóloga); promotor específico del tejido, potenciador(es) o silenciador(es); moléculas de ADN capaces de proporcionar una ventaja selectiva sobre la célula parental; moléculas de ADN útiles como marcas para identificar las células transformadas; sistemas de selección negativa; agentes de unión específica a células (como, por ejemplo, para hacer diana en la célula); factores de internalización específicos de células; y factores de transcripción para potenciar la expresión mediante un vector, así como factores para permitir la fabricación del vector.

30 Se puede introducir un constructo de ADN de terapia génica en las células (tanto *ex vivo* como *in vivo*) usando vectores víricos o no víricos. Un medio para introducir el constructo de ADN de terapia génica es por medio de vectores víricos tal como se describe en el presente documento. Algunos vectores, tales como los vectores retrovíricos, administrarán el constructo de ADN en el ADN cromosómico de las células, y el gen se puede integrar en el ADN 35 cromosómico. Otros vectores funcionarán como episomas, y el constructo de ADN de terapia génica permanecerá no integrado.

En otras formas de realización adicional, se pueden incluir elementos reguladores de la expresión controlada del 40 gen MK61 en la célula diana. Dichos elementos se excitan en respuesta a un efecto apropiado. De esta manera, se puede expresar un polipéptido terapéutico cuando se deseé. Un medio de control convencional implica el uso de moléculas pequeñas dimerizadoras o rapálogos (tal como se describe en los documentos WO9641865 (PCT/US96/099486); WO9731898 (PCT/US97/03137) y WO9731899 (PCT/US95/03157)) usados para dimerizar proteínas quiméricas que 45 contienen una región de unión a moléculas pequeñas y una región capaz de iniciar el proceso biológico, tal como la proteína de unión al ADN o una proteína de activación transcripcional. Se puede usar la dimerización de las proteínas para iniciar la transcripción del transgen.

Una tecnología de regulación alternativa usa un procedimiento de almacenamiento de proteínas expresadas a través 50 del gen de interés en el interior de la célula como un agregado o clúster. El gen de interés se expresa como una proteína de fusión que incluye una región de agregación condicional que da como resultado la retención de la proteína agregada en el retículo endoplásmico. Las proteínas almacenadas son estables e inactivas en el interior de la células. Se puede liberar las proteínas, sin embargo, administrando un fármaco (por ejemplo, una pequeña molécula de ligando) que 55 elimina la región de agregación condicional y por tanto rompe específicamente los agregados o clústeres de tal manera que se pueden segregar las proteínas a partir de las células. Véanse, Science 287: 816-817 y 826-830 (2000).

55 Otros medios de control adecuados o cambios génicos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes sistemas. Se usa mifepristona (RU486) como un antagonista de progesterona. La unión de una región de unión al ligando del receptor de una progesterona modificada con el antagonista de la progesterona activa la transcripción formando un dímero de dos factores de transcripción que a continuación pasan en el núcleo para unirse al ADN. La región de unión al ligando 60 está modificada para eliminar la capacidad del receptor de unirse al ligando natural. Se describe además el sistema del receptor de la hormona esteroidea modificada en los documentos U.S. 5.364.791; WO9649911 y WO9710337.

Otro sistema de control más usa ecdisoma (una hormona esteroidea de la mosca de la fruta) que se une a y activa 65 un receptor de la ecdisoma (receptor citoplásmico). A continuación el receptor se transloca en el núcleo para unirse al elemento de respuesta específico del ADN (gen sensible a la ecdisoma procedente del promotor. El receptor de la ecdisoma incluye una región de transactivación/regexpión de unión al ADN/regexpión de unión al ligando para iniciar la transcripción. Se describe además el sistema de la ecdisoma en la Patente de los Estados Unidos N° 5.514.578; y los documentos WO9738117; WO9637609; y WO9303162.

Otro medio de control usa un transactivador controlable de la tetraciclina positiva. Este sistema implica una región de unión al ADN de la proteína del represor tet mutado (cambios en los aminoácidos R-4 tet mutados que dan como resultado una proteína del transactivador regulado por la tetraciclina inversa, *es decir*, ésta enlaza con un operador tet en presencia de tetraciclina) unida a un polipéptido que activa la transcripción. Se describen dichos sistemas en las 5 Patentes de los Estados Unidos N°s 5.464.758; 5.650.298, y 5.654.168.

Se describen sistemas de control de la expresión y constructos de ácido nucleico adicionales en las patentes de los Estados Unidos N°s 5.741.679 y 5.834.186, de Innovir Laboratories Inc.

10 Se puede llevar a cabo la terapia génica *in vivo* introduciendo el gen que codifica un polipéptido MK61 en las células mediante inyección local de una molécula de ácido nucleico de MK61 o mediante otros vectores de administración víricos o no víricos apropiados (Hefti, *Neurobiology*, 25: 1418-1435 (1994)). Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido MK61 puede estar contenida en un vector vírico adenoasociado (AAV) para la administración en las células diana (por ejemplo, Johnson, Publicación Internacional N° WO95/34670 y Solicitud 15 Internacional N° PCT/US95/07178). El genoma de AAV recombinante contiene normalmente repeticiones terminales invertidas que flanquean una secuencia de ADN que codifica un polipéptido MK61 unido de manera operable a un promotor funcional y las secuencias de poliadenilación.

20 Los vectores víricos adecuados alternativos incluyen, pero no se limitan a, los vectores víricos de retrovirus, adenovirus, virus del herpes simple, lentivirus, virus de la hepatitis, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alfavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramixovirus y virus del papiloma. La Patente de los Estados Unidos N° 5.672.344 describe un sistema de transferencia génica mediado por virus *in vivo* que implica un vector VHS-1 neurotrófico recombinante. La Patente de los Estados Unidos n° 5.399.346 proporciona ejemplos de un procedimiento para proporcionar una proteína terapéutica a un paciente mediante la administración de células humanas que se han tratado *in vitro* para insertar 25 un segmento de ADN que codifica una proteína terapéutica. Se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 5.631.236 los procedimientos y los materiales adicionales para la práctica de las técnicas de terapia génica que implican vectores adenovíricos. La Patente de los Estados Unidos n° 5.672.510 implica vectores retrovíricos; y la Patente de los Estados Unidos N° 5.635.399 implica vectores retrovíricos que expresan citoquinas.

30 Los procedimientos de administración no víricos incluyen, pero no se limitan a, transferencia mediada por liposomas, administración de ADN desnudo (inyección directa), transferencia mediada por el receptor (complejo ligando-ADN), electroporación, precipitación con fosfato de calcio, y bombardeo de micropartículas (*por ejemplo*, cañón de genes). Los materiales y procedimientos de terapia génica pueden incluir también el uso de promotores inducibles, 35 promotores potenciadores específicos del tejido, secuencias de ADN diseñadas para la integración específica en el emplazamiento, secuencias de ADN capaces de proporcionar una ventaja selectiva sobre la célula parental, marcas para identificar las células transformadas, sistemas de selección negativa y sistemas de control de la expresión (medidas de seguridad), agentes de unión específicos de célula (para hacer diana en la célula), factores de internalización específicos de célula, y factores de transcripción para potenciar la expresión por un vector así como los procedimientos 40 de fabricación del vector. Dichos procedimientos y materiales adicionales para la práctica de las técnicas de la terapia génica se describen en la Patente de los Estados Unidos N° 4.970.154 que implica técnicas de electroporación; el documento WO96/40958 implica ligandos nucleares; la Patente de los Estados Unidos n° 5.679.559 describe un sistema que contiene una lipoproteína para la administración del gen; la Patente de los Estados Unidos n° 5.676.954 implica vehículos de liposomas; la Patente de los Estados Unidos N° 5.593.875 se refiere a los procedimientos para la transfección con fosfato de calcio; y la Patente de los Estados Unidos N° 4.945.050 en la que las partículas biológicamente activas se impulsan a las células a una velocidad a la cual las partículas penetran la superficie de las células y 45 se vuelven a incorporar en el interior de las células.

50 Se contempla también que la terapia génica o la terapia celular de MK61 puede incluir además la administración de uno o más polipéptido(s) adicional(es) en la misma o diferente(s) célula(s). Dichas células se pueden introducir separadamente en el paciente, o las células pueden estar contenidas en un dispositivo implantable único, tal como en una membrana de encapsulación descrita anteriormente, o las células se pueden modificar separadamente por medio de vectores víricos.

55 Un medio para aumentar la expresión endógena del polipéptido MK61 en una célula mediante terapia génica es insertar uno o más elemento(s) potenciador(es) en el promotor del polipéptido MK61, en el que el(los) elemento(s) potenciador(es) puede(n) servir para aumentar la actividad transcripcional del gen MK61. El(los) elemento(s) potenciador(es) usado(s) se seleccionará(n) en función del tejido en el que se desea activar el(los) gen(es); se seleccionará(n) el(los) elemento(s) potenciador(es) conocido(s) por conferir la activación del promotor en este tejido. Por ejemplo, si 60 un gen que codifica un polipéptido MK61 se “excita” en las células T, se puede usar el elemento potenciador promotor Ick. Aquí, se puede insertar la porción funcional del elemento transcripcional que se va a añadir en un fragmento de ADN que contiene el promotor del polipéptido MK61 (y opcionalmente, insertarse en un vector y/o en la(s) secuencia(s) de flanqueo 5' y/o 3', etc) usando las técnicas de clonación estándar. Este constructo, conocido como “constructo de recombinación homóloga”, se puede introducir a continuación en las células deseadas tanto *ex vivo* como *in vivo*.

65 Se puede usar también la terapia génica para disminuir la expresión del polipéptido MK61 modificando la secuencia de nucleótidos del(de los) promotor(es) endógeno(s). Dicha modificación se lleva a cabo normalmente mediante los procedimientos de recombinación homóloga. Por ejemplo, se puede diseñar mediante ingeniería una molécula de ADN que contenga todo o una porción del promotor del(de los) gen(es) MK61 seleccionados(s) para la inactivación,

para eliminar y/o sustituir las piezas del promotor que regula la transcripción. Por ejemplo, se pueden eliminar la secuencia TATA y/o el emplazamiento de unión de un activador transcripcional del promotor usando técnicas de biología molecular estándar; dicha delección puede inhibir la actividad del promotor reprimiendo por tanto la transcripción del gen MK61 correspondiente. Se puede llevar a cabo la delección de la secuencia TATA o el emplazamiento de unión al activador de la transcripción en el promotor generando un constructo de ADN que comprenda todo o la porción relevante del(de los) promotor(es) del polipéptido MK61(a partir de la misma o una especie relacionada con el(los) gen(es) MK61 que se va(n) a regular) en la que una o más de la secuencia TATA y/o los nucleótidos del emplazamiento de unión al activador transcripcional están mutados mediante sustitución, delección y/o inserción de uno o más nucleótido. Como resultado, la secuencia TATA y/o el emplazamiento de unión al activador ha disminuido la actividad o se vuelve completamente inactivo. El constructo contendrá normalmente al menos aproximadamente 500 bases de ADN que corresponde a las secuencias 5' y 3'de ADN naturales (endógenas) adyacentes al segmento del promotor que se ha modificado. Se puede introducir el constructo en las células apropiadas (tanto *ex vivo* como *in vivo*) tanto directamente como mediante un vector vírico tal como se describe en el presente documento. Normalmente, la integración del constructo en el ADN genómico de las células será mediante recombinación homóloga, en las que las secuencias 5' y 3' del ADN en el constructo del promotor puede servir para ayudar a integrar la región del promotor modificado mediante hibridación en el ADN cromosómico endógeno.

#### *Usos adicionales de ácidos nucleicos y polipéptidos de MK61*

20 Se pueden usar las moléculas de ácido nucleico de la presente invención (incluyendo aquellas que no codifican por sí mismas polipéptidos biológicamente activos) para mapear las localizaciones del gen MK61 y los genes relacionados en los cromosomas. Se puede llevar a cabo el mapeado mediante técnicas conocidas en la técnica, tal como la amplificación de la PCR y la hibridación *in situ*.

25 Las moléculas de ácido nucleico de MK61 (incluyendo aquellas que no codifican por sí mismas polipéptidos biológicamente activos), pueden ser útiles como sondas de hibridación para ensayar en ensayos diagnósticos, tanto cualitativa como cuantitativamente, la presencia de un ADN de MK61 o el ARN correspondiente en muestras de tejido o fluido corporal de mamíferos.

30 La presente invención proporciona de esta manera reactivos para uso en aplicaciones diagnósticas. Se ha localizado el gen MK61 humano en la banda del cromosoma 19q13. Más específicamente, el gen se localiza en una región en el interior, o cercana a, 19q13.1. Se han localizado varios otros genes de interés en esta región del cromosoma 19, incluyendo el clúster del receptor del leucocito humano (LRC) que se ha demostrado que contiene 19 genes que codifican los receptores expresados por el leucocito de la superfamilia de la inmunoglobulina (Ig), el gen Kir2.4 humano que rectifica hacia dentro el canal del potasio (KCNJ14), el gen KIR103 humano del receptor del inhibidor de la célula asesina, el gen de la proteína ribosómica S19, la prostasa, y el Tipo 1 de la Serina Proteasa. MK61 es un candidato para las enfermedades y trastornos reseñados en el presente documento que incluyen cistinuria, síndrome nefrítico congénito, síndrome nefrótico familiar, glomeruloesclerosis segmental focal familiar, tumor FWT2 de Wilms familiar, síndrome hemofagocítico asociado a linfoma de células B, enfermedad de Camurati-Engelmann, displasia diafisal progresiva, paraplejia espástica hereditaria, asma, defectos del corazón, desarrollo del ojo, lupus sistémico eritematoso (hSLE1), microcefalia primaria (MCPH2), disistosis espondilocostal recesiva autosómica, locus modificador de la fibrosis cística para fíleo meconio, leucemia mielógena aguda, linfoma de células B asociado con síndrome hemofagocítico, mieloma múltiple, tumores de células germinales testiculares, glioma maligno, hipercalcemia benigna familiar, el gen MK61, se puede usar una sonda que comprenda el ADN o el ARN de MK61 para determinar si el gen MK61 está presente en el cromosoma 19, o si se ha producido una mutación. Las aberraciones cromosómicas detectables en el locus de gen MK61 incluyen, pero no se limitan a, aneuploidía, cambios en el número de copias del gen, inserciones, delecciones, cambios en el emplazamiento de restricción y redisposiciones: Se pueden producir estas aberraciones en el interior de la secuencia de codificación, en el interior de intrones, o en el interior de secuencias de flanqueo, que incluyen el promotor y las regiones reguladoras en la dirección 5', y se pueden manifestar como alteraciones físicas en el interior de una secuencia de codificación o cambios en el nivel de expresión del gen. Las sondas analíticas tendrán generalmente al menos 20 nucleótidos de longitud, aunque se pueden usar sondas algo más cortas (14-17 nucleótidos). Los cebadores de la PCR tienen al menos 5 nucleótidos de longitud, preferiblemente 15 o más nucleótidos, más preferiblemente 20-30 nucleótidos de longitud. Se pueden usar polinucleótidos cortos cuando una pequeña región del gen es la diana del análisis. Para análisis grueso de genes, una sonda de polinucleótido puede comprender un exón completo o más. Las sondas comprenderán generalmente un polinucleótido unido a un resto que genera señal tal como un radionucleótido. En general, estos procedimientos diagnósticos comprenden las etapas de (a) obtener una muestra genética de un paciente; (b) incubar la muestra genética con una sonda o cebador de polinucleótido tal como se describe anteriormente, en condiciones en que el polinucleótido se hibridará con la secuencia complementaria del polinucleótido para producir un primer producto de reacción; y (c) comparar el primer producto de reacción con un producto de reacción de control. Una diferencia entre el primer producto de reacción y el producto de control es indicativa de una anomalía genética en el paciente. Las muestras genéticas para uso dentro de la presente invención incluyen ADN genómico, ADNc, y ARN. La sonda o cebador de polinucleótido puede ser ARN o ADN, y comprenderá una porción de la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15, el complemento de la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15 o un ARN equivalente de la misma. Los procedimientos de ensayo adecuados a este respecto incluyen técnicas genéticas moleculares conocidas por aquellas personas expertas en la técnica, tales como el análisis del polimorfismo de longitud del fragmento de restricción (RFLP), el análisis de repetición en tandem corto (STR) que

emplea técnicas de la PCR, reacción de la cadena de ligadura (Barany, PCR Methods and Applications 1:5-16 (1991)), ensayos de protección de la ribonucleasa, y otras técnicas genéticas de análisis de la unión conocidas en la técnica. Véase Sambrook y col., Id.; Ausubel y col., Id., y A. J. Marian, Chest 108: 255-65 (1995). Los ensayos de protección de la ribonucleasa (Ausubel y col., Id., cap. 4) comprenden la hibridación de una sonda de ARN en una muestra de un ARN de un paciente, tras lo cual se expone el producto de reacción (ARN-ARN) a la RNasa. Las regiones hibridadas del ARN se protegen de la digestión. Dentro de los ensayos de la PCR, se incuba una muestra genética de un paciente con un par de cebadores de oligonucleótidos, y se amplifica y recupera la región entre los cebadores. Cambios en el tamaño, la cantidad, o la secuencia del producto recuperado son indicativos de mutaciones en el paciente. Otra técnica basada en la PCR que se puede emplear es el análisis del polimorfismo conformacional de cadena única (SSCP). Véase 5 Hayashi, PCR Methods and Application 1: 34-38 (1991).

10 Se pueden usar los ensayos de la proteína MK61 en suero para detectar las enfermedades y trastornos reseñados en el presente documento. Las personas expertas en la técnica reconocerán que se puede conseguir el tratamiento de las dolencias relacionadas con la infraexpresión o la sobreexpresión de MK61 mediante la manipulación terapéutica 15 de los niveles de la proteína MK61.

15 Se pueden usar los polipéptidos MK61 (simultánea o secuencialmente) en combinación con una o más citoquinas, factores de crecimiento, antibióticos, agentes antiinflamatorios y/o quimioterapéuticos según sea apropiado para la indicación que se está tratando.

20 Se pueden emplear también otros procedimientos cuando sea deseable inhibir la actividad de uno o más polipéptidos MK61. Se puede efectuar dicha inhibición mediante moléculas de ácido nucleico que sean complementarias a y que se hibriden con las secuencias control de la expresión (formación en triple hélice) o el ARNm de MK61. Por ejemplo, se pueden introducir moléculas de ADN o ARN de sentido contrario, que tengan una secuencia que sea 25 complementaria de al menos una porción del(de los) gen(es) MK61 (seleccionado(s) en la célula. Se pueden diseñar sondas de sentido contrario mediante las técnicas disponibles usando la secuencia del polipéptido MK61 descrita en el presente documento. Normalmente, cada una de dichas moléculas de sentido contrario será complementaria respecto del emplazamiento de inicio (extremo 5') de cada gen MK61 seleccionado. Cuando la molécula de sentido contrario se hibrida a continuación con el ARNm de MK61 correspondiente, se evita o reduce la traducción de este ARNm. Los inhibidores de sentido contrario proporcionan información relacionada con la disminución o ausencia de un polipéptido 30 MK61 en una célula u organismo.

35 Alternativamente, se puede emplear la terapia génica para crear un inhibidor dominante negativo de uno o más polipéptidos MK61. En esta situación, se puede preparar el ADN que codifica un polipéptido mutante de cada polipéptido MK61 seleccionado e introducirse en las células de un paciente usando procedimientos tanto víricos como no víricos tal como se describe en el presente documento. Se diseña normalmente cada uno de dichos mutantes para competir con polipéptido endógeno en su papel biológico.

40 Además, un polipéptido MK61, tanto biológicamente activo como no, se puede usar como inmunógeno, esto es, el polipéptido contiene al menos un epitopo contra el cual se pueden estimular anticuerpos. Se pueden usar agentes de unión selectiva que se unen a un polipéptido MK61 (tal como se describe en el presente documento) para objetivos de diagnóstico *in vivo* e *in vitro*, que incluyen, pero no se limitan a, el uso en forma marcada para detectar la presencia del polipéptido MK61 en una muestra de fluido corporal o celular. Se pueden usar también anticuerpos para evitar, tratar o diagnosticar numerosas enfermedades o trastornos, incluyendo aquellos reseñados en el presente documento. 45 Se pueden unir los anticuerpos a un polipéptido MK61 con el fin de disminuir o bloquear al menos una actividad característica de un polipéptido MK61, o se pueden unir a un polipéptido para aumentar al menos una actividad característica de un polipéptido MK61 (incluyendo aumentar la farmacocinética del polipéptido MK61).

50 Se pretenden los siguientes ejemplos únicamente a efectos de ilustración y no deberían tomarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

#### Ejemplo 1

##### 55 *Aislamiento de clones de ADNc de MK61 humano*

Se llevó a cabo la investigación de un perfil familiar del receptor de TNF en la base de datos EST de Amgen. Se identificó una secuencia EST humana (G-0042-B7) como posible miembro de la familia del receptor de TNF nombrado como MK61. Se amplificó mediante la PCR el clon humano de longitud completa procedente de una biblioteca 60 de nódulos linfoides humanos usando los siguientes cebadores: cebador de sentido directo de MK61 humano (5'-GGTGACCACCTCGTGGCAACGTCT-3'; SEC DE ID Nº: 21), cebador de sentido contrario (5'-GCCAATTAG GATTGTACAAGAAG-3; SEC DE ID Nº: 22) en las condiciones estándar conocidas en la técnica. Se transcribió de manera inversa el ARN poli (A)+ procedente del nódulo linfoides humano, y se sintetizaron los ADNc usando el kit de amplificación de ADNc Smart RACE (Clontech, Palo Alto, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 65 Se clonó el ADNc de longitud completa del gen MK61 humano en el vector pcADN3 para la expresión en células de mamíferos (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenció usando procedimientos estándar. El nombre del clon es pcdna3huMK61#5 y contiene la isoforma MK61 T1 del ADNc humano.

La secuencia del ADNc de MK61 humano tiene 1668 nucleótidos (SEC DE ID N°: 1) y codifica un polipéptido de 355 aminoácidos (SEC DE ID N°: 2). El polipéptido (denotado en el presente documento como hMK61T1; véase la Figura 1) contiene un péptido señal que extiende los restos 1-23, una región rica en cisteína que extiende los restos 26-60 que se corresponde con la firma de la región rica en cisteína de la superfamilia TNFR (Madry y col. 5 INTERNATIONAL IMMUNOLOGY. 10:1693-1702, 1998, y las referencias en dicho presente documento, una región transmembrana que expande los restos 157-158, y una larga región intracelular. La alineación cuidadosa de todos los MK61 humanos disponibles que se corresponden con el ADNc y las secuencias genómicas disponibles en las bases de datos públicas, bases de datos propias de Amgen, y la base de datos de Celera, identificó cinco isoformas adicionales 10 MK61 humano de longitud completa (denotadas en el presente documento como MK61T2, MK61T3, MK61T4, MK61T5, y MK61T6 humanas).

La secuencia del polinucleótido hMK61T2 tiene 1525 nucleótidos (SEC DE ID N°: 3) y codifica un polipéptido de 85 aminoácidos (SEC DE ID N°: 4) que contiene un péptido señal (restos 1-23) pero no una región transmembrana predicha, sugiriendo que esta isoforma puede codificar un polipéptido segregado (Figura 2). hMK61T2 contiene la región 15 rica en cisteína que expande los restos 26-51 que muestran una correspondencia imperfecta (5 de 6 emparejamientos de cisteínas) con la firma de la región rica en cisteína de la superfamilia TNFR. La secuencia del polinucleótido hMK61T3 tiene 1289 nucleótidos (SEC DE ID N°: 5) y codifica un polipéptido de 136 restos de aminoácidos (SEC 20 DE ID N°: 6) que contiene un péptido señal (restos 1-23) pero que no contiene una región transmembrana predicha, sugiriendo que esta isoforma puede codificar un polipéptido segregado (Figura 3). hMK61T3 contiene una región rica en cisteína que expande los restos 26-60 que se corresponden con la firma de la región rica en cisteína de la superfamilia TNFR. La secuencia del polinucleótido hMK61T4 tiene 1164 nucleótidos (SEC DE ID N°: 7) y codifica un polipéptido con 187 restos de aminoácidos (SEC DE ID N°: 8) que contiene un péptido señal (restos 1-23) pero no una región transmembrana predicha, sugiriendo que esta isoforma puede codificar un polipéptido segregado (Figura 4). hMK61T4 contiene una región rica 25 en cisteína que expande los restos 26-51 que muestran una correspondencia imperfecta (5 de 6 emparejamientos de cisteína) con la firma de la región rica en cisteína de la superfamilia TNFR. La secuencia del polinucleótido hMK61T5 tiene 1483 nucleótidos (SEC DE ID N°: 9) y codifica un polipéptido con 71 restos de aminoácidos (SEC DE ID N°: 10) con un péptido señal (restos 1-23) pero no una región transmembrana 30 predicha, sugiriendo que esta isoforma puede codificar un polipéptido segregado (Figura 5). hMK61T5 contiene una región rica en cisteína que expande los restos 26-57 que se corresponden con la firma de la región rica en cisteína de la superfamilia TNFR pero que varía ligeramente de la de hMK61T1. La secuencia del polinucleótido hMK61T6 tiene 1104 nucleótidos (SEC DE ID N°: 11) y codifica un polipéptido con 167 restos de aminoácidos (SEC DE ID N°: 12) que contiene un péptido señal (restos 1-23) pero no una región transmembrana predicha, sugiriendo que esta isoforma 35 puede codificar un polipéptido segregado (Figura 6). hMK61T6 contiene la región rica en cisteína que expande los restos 26-51 que muestran una correspondencia imperfecta (5 de 6 emparejamientos de cisteína) con la firma de la región rica en cisteína de la superfamilia TNFR.

De manera interesante, todas las isoformas MK61 humanas contienen una región rica en cisteína de tipo TNFR completa o parcial que puede constituir parte de la región de unión al ligando. Por tanto, Aunque hMK61T1 parece codificar un receptor superficial celular miembro de la familia TNFR novedoso bona fide, las isoformas hMK61T2-40 T6 humanas parecen codificar receptores segregados. Los receptores segregados pueden funcionar como receptores señuelo que evitan la que el ligando de MK61 desconocido interactúe con su receptor, tal como se ha demostrado anteriormente para la Osteoprotegerina (OPG). El ligando de la osteoprotegerina es una citoquina que regula la diferenciación y activación de los osteoclastos. (Lacey y col. Cell: 93: 165-176, 1998). Además, las isoformas MK61T1-T6 pueden unirse y regular la señalización inversa del ligando de MK61 desconocido.

45

## Ejemplo 2

### *Aislamiento del clon de ADNc de MK61 de murino*

50

Se llevó a cabo la investigación del perfil familiar de un receptor de TNF en la base de datos EST de Amgen tal como se describe anteriormente en el Ejemplo 1. Se identificó una secuencia EST humana (G-0042-B7) como un posible miembro de la familia del receptor TNF nombrado como MK61. Se amplificó mediante la PCR el clon MK61 de murino de longitud completa a partir de una biblioteca de células A20 de ratón usando los siguientes cebadores: 55 cebador de sentido directo de ratón (5'CGGACGCGTGGCGGACGCGTGGG-3' SEC DE ID N°: 23) cebador de sentido contrario (5'-AGCAAACCTCTGACTCAGCCAAGTT-3'; SEC ID N°: 24) en condiciones estándar conocidas en la técnica. Se transcribió de manera inversa el ARN poli (A)+ de la línea A20 de células B de linfoma de ratón, y se sintetizó el ADNc usando el kit de amplificación de ADNc Smart RACE (Clontech, Palo Alto, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se clonó el ADNc de longitud completa del gen de ratón en el vector pcADN3 para la expresión celular en mamíferos (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenció usando los procedimientos estándar.

60

La secuencia del polinucleótido MK61 de murino tiene 1202 nucleótidos (SEC DE ID N°: 13) y codifica un polipéptido de 345 aminoácidos (SEC DE ID N°: 14). El polipéptido MK61T1 de murino es un receptor superficial celular que tiene una secuencia señal que expande los restos 1 a 21 y una región transmembrana (Figura 7).

65

## Ejemplo 3

*Distribución de ARNm de hMK61 en tejidos*

5 Se determinó la distribución de ARNm de MK61 mediante análisis de inmunotransferencia Northern y la PCR cuantitativa. Se purificaron células T de sangre periférica, células B y monocitos humanos mediante el cóctel de enriquecimiento Rosette Sep (Stem Cell Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron células de Linfoma de Burkitt, células Raji, células T de linfoma, células Jurkat, células K562 y células U937 humanas de la ATCC (Rockville, MD). Se aisló el ARN total de estas células mediante el kit RNeasy (Quiagen, Valencia, CA) 10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se llevaron a cabo los análisis de inmunotransferencias Northern usando las condiciones estándar conocidas en la técnica. Se adquirieron los ADNc de múltiples tejidos y las inmunotransferencias Northern de múltiples tejidos de Clontech (Palo Alto, CA): Se hibridaron las inmunotransferencias Northern con sondas radioactivas de ser humano y 15 ratón cebadas aleatoriamente durante 3 horas a 55°C y a continuación se lavaron con algunos cambios de SSC X2/SDS al 0,1% seguido por SSC 0,1X/SDS al 0,1% durante 30 minutos.

20 El análisis de inmunotransferencia Northern demostró que hMK61 se expresó predominantemente en órganos linfoides periféricos, bazo, nódulos linfoides, timo, médula ósea, en leucocitos de sangre periférica, así como en hígado fetal. (Véanse las figuras 13 y 14). Se expresaron algunas isoformas MK61 diferentes en aquellos órganos pero el transcripto principal tenía 1,6 pkb.

25 Se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real en diversos tejidos y líneas celulares humanas. Este ensayo usa una sonda fluorógena y cebadores de la PCR para permitir la detección de un producto de la PCR específico. Los cebadores de la PCR y la sonda se diseñaron usando el software Primer Express de PE Biosystems y que fueron 30 sintetizados por Amgen Boulder a petición. Se usaron cebadores de oligonucleótidos específicos y las sondas de MK61 humano (Sonda nº 2288-23 ETT CCC AGT TTT TCA TCT GCA CTG CCA X (SEC DE ID Nº: 40); cebador 5' nº 2288-22 TGC TGG ACC CAA CAC AAA TG (SEC DE ID Nº: 41); cebador 3' nº 2288-24 TGC CAT CCA ACC ACT CAG TC (SEC DE ID Nº: 42)) y la ciclofilina humana (Sonda nº 2661-91 ECT GCC TGC TGC CTG GTC CAC CTX (SEC DE ID Nº: 43), cebador 5' nº 2661-90 ACA CCT GGC CGC AAG ATA TG (SEQ ID Nº: 44); cebador 3': nº 2661-91 GAC TCG GCC TCA GCG AAT AG (SEC DE ID Nº: 45)) como cebadores de Taqman. Siguiendo el protocolo estándar de PE Biosystems, se llevaron a cabo las reacciones Taqman de la PCR en un equipo ABI PRISM 7700 y se analizaron los datos mediante el software Sequence Detection System de PE Biosystems (véase la Figura 15).

35 La expresión del ARNm de MK61 humano fue la mayor en células monocíticas, células B, nódulos linfoides, bazo y células T. Se detectaron niveles intermedios de la expresión del ARNm de MK61 humano en hígado, médula ósea, timo, amígdala e hígado fetal. Se detectaron niveles bajos del ARNm de MK61 en pulmón, placenta y células Jurkat. De manera interesante, la expresión del ARNm de MK61 humano fue mayor en las células B, células T y células 40 monocíticas primarias que en las líneas celulares Raji, K562 y U937 tumorales correspondientes. Este modelo de expresión sería consistente con la noción de que la expresión de MK61 es linfóide específica y se puede infrarregular en células tumorales.

## 45 Ejemplo 4

*Preparación del constructo de fusión mMK61-Fc*

50 Se subclonó la porción extracelular predicha de 175 aminoácidos de Smi12.00051-f3 en el vector PEFBOS (pEF-BOS; un potente vector de expresión en mamíferos; Mizushima y col. Nuc. Acids Res. 18: 5322, 1990), y se unió una porción Fc en el extremo del gen. La secuencia de nucleótidos que codifica el mMK61-Fc se define en la SEC DE ID Nº: 15: Se llevó a cabo la transfección usando Citofecteno de Bio-Rad como reactivo de transfección. El medio acondicionado se recogió 48 horas después de la transfección, y el CM 10X se concentró mediante 10 columnas Centricon (Millipore Corp., Bedford, MA). Las muestras introducidas en las hileras 6, 7, y 8 fueron los medios concentrados 55 acondicionados (véase la Figura 9).

60 Se detectó la proteína de fusión mMK61 Fc (SEC DE ID Nº: 16) mediante una IgG(Fc) anti-humana (Pierce), a una dilución de 1:3000, y a continuación se visualizó mediante luminiscencia química potenciada (ECL). El tiempo de exposición fue de 15 segundos. Se usaron 2933 lisados celulares como control positivo y se prepararon como sigue: se suspendieron 293 células (disponibles bajo número de acceso CRL-1573 de la ATCC) en 2,00 µl de tampón de carga SDS 2X, y se calentaron. A continuación, los lisados celulares (5 µl) se introdujeron en cada hilera. La transferencia Western (Figura 9) indica que se segregó la proteína de fusión MK61-Fc y que es detectable en los medios celulares acondicionados.

## Ejemplo 5

*Producción y purificación de proteínas de fusión MK61-Fc recombinante*5 *A. Clonación y expresión bacteriana de la proteína MK61-Fc humana*

Se usó la amplificación de la PCR empleando los pares de cebadores y plantillas descritos a continuación para generar diversas formas de proteínas MK61 humanas. Un cebador de cada pareja introdujo un codón de inicio (TAA) y un único emplazamiento XhoI tras el término carboxi del gen. El otro cebador de cada pareja introdujo un único emplazamiento NdeI, una metionina N-terminal, y se optimizaron los codones de la porción aminoterminal del gen. Se llevó a cabo la PCR y el termociclado usando la metodología del ADN recombinante estándar. Se purificaron los productos de la PCR, se digirió con restricción, y se insertaron en los emplazamientos NdeI y XhoI únicos del vector pAMG21 (nº de acceso de la ATCC 98113). Posteriormente, se transformaron las cepas 393 ó 2596 fotótrofas de *E. coli* con el vector. Son también adecuados para la expresión otros vectores de expresión de *E. coli* y células huéspedes comúnmente usados. Tras la transformación, se seleccionaron los clones, se aisló el ADN plásmido y se confirmó la secuencia del inserto de proteína de MK61.

20 *1. pAMG21-M61 21-160 His humano*

Se diseñó mediante ingeniería el constructo pAMG21-h MK61 21-160 His para que tuviera 147 aminoácidos de longitud y que tuviera los siguientes restos N terminal y C terminal: NH<sub>2</sub>-Met-Glu-Ala-Ser-Gln-----Gln-Ala-Trp-Pro-Asn-His-His-His-His-His-COOH (SEC DE ID Nº: 25). Se usó la siguiente pareja de cebadores de oligonucleótidos (nº 2609-87 y nº 2609-88) para la PCR y la clonación de este constructo génico (2609-87: 5'-GAG GAA TAA CAT ATG GAA GCC TCT CAG TAT TGC GGC CGC-3' (SEC DE ID Nº: 26); 2609-88: 5'-CGG CCG ATC CTC GAG TTA ATG ATG ATG ATG ATG ATT CGG CCA GGC CTG CTG-3' (SEC DE ID Nº: 27)).

30 *2. pAMG21-MK61 21-160 Fc humano (IgG1 humana)*

Se diseñó mediante ingeniería el constructo pAMG21-MK61 21-160 Fc humano para que tuviera 373 aminoácidos de longitud y que tuviera los siguientes restos N terminal y C terminal: NH<sub>2</sub>-Met-Glu-Ala-Ser-Gln-----Ser-Pro-Gly-Lys-COOH (SEC DE ID Nº: 28). Se insertó un ligante compuesto de cinco restos de glicina entre el término C de la proteína MK61 y el término B de la IgG1 Fc humana. La secuencia de la unión de MK61-Fc fue como sigue Gln-Ala-Trp-Pro-Asn-Gly-Gly-Gly-Asp-Lys-Thr-His (SEC DE ID Nº: 29). Se llevó a cabo la amplificación de la PCR de este constructo en dos etapas. En la primera etapa, se amplificaron las porciones MK61 y Fc del gen. Los oligos con nºs 2609-87 (5'-GAG GAA TAA CAT ATG GAA GCC TCT CAG TAT TGC GGC CGC-3' SEC DE ID Nº: 30); y nºs 2609-97 (5'-ACA TGT GTG AGT TTT GTC ACC ACC ACC ACC ATT CGG CCA GGC CTG CTG-3' SEC DE ID Nº: 31) se usaron para amplificar la porción de MK61. Los oligos con nºs 2609-98 (5'-can CAG GCC TGG CCG AAT GGT GGT GGT GGT GAC AAA ACT CAC ACA TGT-3' SEC DE ID Nº: 32) y nºs 2293-10 (5'-CCG CGG ATC CTC GAG TTA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG-3' SEC DE ID Nº: 33) se usaron para amplificar la porción de la IgG1 fc. En la segunda etapa, se purificaron en gel los productos de reacción de la primera amplificación y se usaron como plantilla para crear el constructo MK61::fc final. Los oligos con nºs 2609-87 (SEC DE ID Nº: 30) y nºs 2293-10 (SEC DE ID Nº: 33) se usaron para la amplificación de la PCR de este constructo.

Tras la confirmación de la secuencia de ADN, se hizo crecer la *E. coli* transformada a 37°C hasta la mitad de la fase logarítmica y se trató con homoserina lactona (HSL) a una concentración final de 250 ng/ml para inducir la expresión de la proteína de fusión MK61-Fc. Tras la inducción, se hicieron crecer las células a 37°C durante algunas horas y se cosecharon posteriormente mediante centrifugación y se congelaron a -80°C. Se llevaron a cabo el crecimiento de *E. coli* transfectada, la inducción de la expresión de la proteína MK61-Fc y el aislamiento de los cuerpos de inclusión que contenían MK61-Fc de acuerdo con el procedimiento descrito en la Solicitud de Patente con Nº de Serie 08/577.788 presentada el 22 de diciembre de 1995.

55 Se llevó a cabo la purificación y el plegado de la proteína de fusión MK61-Fc expresada en *E. coli* usando los siguientes procedimientos. Para solubilizar la proteína de fusión MK61-Fc, se rompieron las células bacterianas en un microfluidizador y se centrifugaron a 12.000 g durante 1 hora. Se lavaron los cuerpos de inclusión resultantes con agua y se centrifugaron a 12.000 g durante 1 hora. A continuación se solubilizó el residuo durante 1 hora en Tris 50 mM, GuHCl 8 M y DTT 7 mM (pH 8,5) y se centrifugó a 12.000 g durante 1 hora.

60 Para replegar la proteína de fusión MK61-Fc, se diluyó el sobrenadante 1:20 con Tris 50 mM, Urea 2 M, arginina 0,2 M (pH 8,5) y se incubó a 4°C hasta que el test de Elman fue negativo para el tiol libre (aproximadamente 4 días). A continuación se concentró el sobrenadante 20 veces y se diafiltró con 4 volúmenes de Tris 50 mM (pH 8,5). El sobrenadante diluido se precipitó en ácido diluyendo la solución 10 veces con Tris 25 mM (pH 8,5) y disminuyendo el pH a 5,0. A continuación se agitó la solución diluida durante 5 minutos y se centrifugó a 12.000 g durante 30 minutos.

## ES 2 327 102 T3

Para la purificación, se introdujo el sobrenadante en una columna SP de alto rendimiento y se hizo correr a un gradiente 0-600 mM de NaCl en presencia de NaOAC (pH 5,0) sobre volúmenes de 60 columnas. La proteína de fusión eluyó a aproximadamente 500 mM de NaCl. Se valoraron las fracciones combinadas a pH 7,0 hasta una concentración de 1 M en sulfato de amonio (SA) y se centrifugaron a 12.000 g durante 30 minutos. A continuación se introdujo el sobrenadante en una columna de butilo de alto rendimiento y se hizo correr a 1 gradiente de 1 M de SA a 0M de SA en presencia de NaPi 10 mM (pH 7,0) sobre volúmenes de 50 columnas. La proteína de fusión eluyó aproximadamente a 20 mM de SA. Las fracciones vertidas se diafiltraron en PBS.

### 10 B. Clonación, expresión y purificación de MK61-Fc en un cultivo de células de mamíferos

Se amplificó un fragmento de ADNc que codificaba los aminoácidos 1 a 53 de MK61-Fc humano mediante la PCR usando pcdna3huMK61#5 como plantilla y los cebadores nº 2623-81 (CAG CCC AAG CTT TAG ACC ACC ATG GGG CCT GGACGA TGC; SEC DE ID Nº: 34) y 2623-83 (CAG GTC GAC AGG CTC AGG GGT CCT; SEC DE ID Nº: 35). Se insertaron estos cebadores en los emplazamientos HindIII y SalI en los extremos 5' y 3' del gen respectivamente. Se purificó el producto de la PCR, se digirió con HindIII y SalI y se ligó en el vector huOPG194 Fc delta C, (descrito en el documento WO 01/18203 y en el documento EP1127117), se digirió con HindIII y SalI y se desfosforiló. Se transformaron los productos de la ligadura en células competentes DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se plaquearon sobre placas de ampicilina LB+.

20 Se hicieron crecer ocho colonias de las células competentes DH $\alpha$  transformadas para aislar el ADN usando la técnica mini-prep (Qiagen). Se seleccionó el ADN aislado mediante digestión con NotI y PvuI. Cinco de los clones generaron un fragmento de 1512 pares de bases tal como se esperaba. Los clones 1 y 7 de los clones positivos se amplificaron en preparaciones de 500 ml, se aisló el ADN y se secuenció usando los procedimientos estándar.

25 El ADN aislado del clon 7 fue la secuencia correcta. La secuencia de aminoácidos de MK61-Fc se muestra en la Figura 24 como la SEC DE ID Nº: 36. Se linealizó el ADN del clon 7 (15  $\mu$ g) con PvuI y se transfeció en células AM-1/D. AM-1/D son células de Ovario de Hámster Chino desprovistas de DHFR (Urlaub y Chasin 1980 PNAS vol 77 4216-4220) adaptadas a condiciones libres de suero (descritas en la Patente de los Estados Unidos Nº 6.210.924). 30 Se generaron clones estables basados en el marcador de selección DHFR (dihidrofolato reductasa). Se expandieron nueve clones estables para el análisis de la expresión. Se determinó la expresión de MK61-Fc mediante transferencia Western usando anticuerpos IgG1 Fc anti-humano (Pierce) Se seleccionó un clon de elevada expresión y se expandió haciendo crecer las células en botellas cilíndricas usando los procedimientos estándar.

35 Para purificar la proteína de fusión MK61 Fc humana se introdujeron medios acondicionados CHO-MK61-Fc en una columna de proteína G equilibrada en PBS. Se lavó la columna con 20 volúmenes de columna de PBS y se eluyó la proteína de fusión con Glicina 100 mM (pH 2,6), y se neutralizaron las fracciones vertidas con Tris 1 M (pH 8,5) y se diafiltraron en PBS.

### 40 C. Producción de proteína de fusión MK61/Fc delta C de murino

Se amplificó del ADNc de MK61 de murino que codificaba la región extracelular de la proteína a partir del ADNc de muMK61 de longitud completa (SEC DE ID Nº: 13) usando los cebadores nº 2664-83 (CAG CCC AAG CTT TAG ACC ACC ATG GGG CCC AGC TGG CTT; SEC DE ID Nº: 37) y nº 2664-84 (CAG GTC GAC CTC ATT CTT GGT TGT; SEC DE ID Nº: 38). Se insertaron estos cebadores en los emplazamientos HindIII y SalI en los extremos 5' y 3' del gen respectivamente. Se purificó el producto de la PCR, se digirió con HindII y SalI y se ligó en el vector huOPG194 Fc delta C digerido con HindIII y SalI y se desfosforiló. Se transformó el producto de la ligadura en las células competentes DH5 $\alpha$  y se plaqueó sobre placas de ampicilina LB+.

50 Se hicieron crecer dieciséis colonias de células competente DH $\alpha$  para aislar su ADN mediante la técnica mini-prep. Se seleccionó el ADN aislado mediante la digestión con MSC1 (único enzima para MK61) y PvuI (único enzima para los vectores pDSR $\alpha$ ). Quince de los clones generaron un fragmento de 1523 pares de bases tal como se esperaba. Se amplificaron los clones 2 y 4 de estos clones positivos en preparaciones de 500 ml; se aisló el ADN y se secuenció usando los procedimientos estándar.

60 El ADN aislado de ambos clones 2 y 4 tuvo la secuencia correcta para la expresión de una proteína de fusión MK61-Fc (Figura 25; SEC DE ID Nº: 39): Se linealizó el ADN del clon 2 (15  $\mu$ g) con PvuI y se transfeció en las células AM-1/D que se derivaron de la línea de células de Ovario de Hámster Chino (CHO). Se generaron clones estables basados en el marcador de selección DHFR [¿QUÉ SIGNIFICA EL DHFR?]. Se expandieron nueve clones para el análisis de la expresión. Se determinó la expresión de MK61-Fc mediante transferencia Western, usando anticuerpos Fc anti-humanos.

## ES 2 327 102 T3

### Ejemplo 6

#### *Unión de MK61-Fc tal como se determinó mediante el análisis FACS*

5 Se detectó la unión de las proteínas MK61-Fc en células humanas mediante selector celular activado por fluorescencia (FACS). Se obtuvieron células Raji, Molt-4, U937, K562, A20 y Jurkat de la ATCC. Se recogieron las células y se incubaron a temperatura ambiente con 1 µg/ml de MK61-Fc humano en tampón de unión (medio DMEM que contenía tampón HEPES 10 mM, suero de cabra al 2%, suero de conejo al 5%, 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal CD16/CD32 anti-ratón (PharMingen, San Diego, CA)) durante 30 minutos seguido por 3 lavados con PBS que  
10 contenía FBS al 2%. Se ensayó la unión de las proteínas de fusión MK61-Fc a la superficie celular mediante tinción inmunofluorescente usando anticuerpo secundario IgG Fc anti-humano conjugado con FITC (PharMingen, San Diego, CA). Se detectó la fluorescencia usando un FACStar (Becton y Dickinson, Mountain View, CA).

15 Se detectó la unión MK61-Fc en células U937 y Jurkat (Véase la Figura 16). Para potenciar la unión MK61-Fc se trataron las células U937 y Jurkat con interferón gamma humano (10 ng/ml) durante 24 horas antes del análisis. El pretratamiento con interferón gamma potenció la unión MK61-Fc. (Véase la Figura 17). La unión de las proteínas de fusión MK61-Fc con estas células indica que el ligando de MK61 existe sobre la superficie celular de las células monocíticas (U937) y T (Jurkat).

20 25 La existencia de un ligando de MK61 desconocido sobre la superficie de las células inmunes sugiere que las formas solubles de unión del ligando de MK61 (tales como la proteína de fusión MK61-Fc) pueden actuar como “reactivos positivos” que activan la ruta de señalización del receptor MK61. Se puede llevar a cabo esto mediante la unión de los reactivos positivos con el(los) ligando(s) de MK61 aún desconocido(s) localizado(s) sobre la superficie de las células inmunes y que estimula(n) por tanto la señalización inversa a través del ligando: Dicha señalización sería el episodio regulador del sistema inmune que da como resultado la expansión de los linfocitos y la producción de inmunoglobulina.

### Ejemplo 7

#### *Producción de inmunoglobulina inhibida por MK61-Fc en esplenocitos primarios*

30 Se aislaron células de bazo totales de ratones BA120 DE usando la centrifugación del medio de separación de linfocitos (ICN, Aurora, OH). Se cultivaron los esplenocitos *in vitro* con 150 ng/ml de lipopolisacárido (LPS) durante 72-96 horas en presencia de la proteína de fusión delta C MK61-Fc delta de ratón o humana. Posteriormente, se retiraron los sobrenadantes del cultivo de las células tratadas después de 4 días para analizar la producción de diversos isótipos de Ig (PharMingen, CA).

35 40 El tratamiento con las proteínas de fusión MK61-Fc de murino y humana produjo una disminución dependiente de la dosis en la producción de IgA e IgG en los cultivos de esplenocitos de ratón (véase la Figura 18). Se consiguió la máxima inhibición cuando se usó MK61-Fc a una concentración de 100 ng/ml. Estos datos indican que la proteína de fusión MK61-Fc es un potente inhibidor del sistema inmune. Estos datos sugieren también que el receptor MK61 activa la ruta de señalización del sistema inmune que se puede antagonizar mediante “reguladores negativos” tales como la proteína de fusión MK61-Fc soluble.

45 50 55 Para determinar si la inhibición de la producción de inmunoglobulina inducida por la proteína de fusión MK61-Fc fue debida a la inhibición de la proliferación de células B, se midió el efecto de la proliferación de células B sobre MK61-Fc. Se purificaron células B de ratón mediante selección negativa de bazos de ratones C57B1/6 usando una columna de recuperación de células B de ratón (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canadá). Las células aisladas mediante este procedimiento fueron positivas en más de un 90% para la tinción B220 tal como se determinó mediante el análisis FACS. Se sembraron 1 x 10<sup>6</sup>/ml en placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos en el medio (RPMI-1640, FBS al 5%, 5 x 10<sup>-5</sup> M 2 ME, 2 µg/ml de IgM anti-ratón F(ab')<sub>2</sub> de cabra purificada mediante afinidad). A continuación se incubaron las células B con 100 ng/ml de proteína MK61-Fc humana o de ratón en presencia o ausencia de cantidades aumentadas de CD40L, APRIL o TALL-1 durante 72 horas. Se cuantificó la síntesis de ADN midiendo la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina. Se añadieron 0,5 µ Ci de [<sup>3</sup>H]timidina 18 horas antes de cosechar las células y contando la incorporación de la [<sup>3</sup>H]timidina. El tratamiento con las proteínas de fusión MK61-Fc no afectó la proliferación de células B en este ensayo.

### Ejemplo 8

#### *Efecto del tratamiento con proteína de fusión MK61-Fc sobre las respuestas de las células B in vivo*

60 65 Para caracterizar la significancia funcional del polipéptido MK61, se usaron proteínas MK61-Fc delta C para tratar los ratones.

Inicialmente, se trataron ratones Balb/c (hembras de 8-12 semanas de edad, Charles River Laboratories) intraperitonealmente con 5 mg/Kg de MK61-Fc una vez al día durante siete días consecutivos comenzando en el día 0. Se

trataron los ratones control con 5 mg/Kg de IgG1 Fc o solución salina tal como anteriormente. Se sacrificaron los ratones un día después de la última inyección de MK61-Fc, es decir, en el día 7. Se diseccionaron los bazos para el examen histológico, el análisis FACS y para las medidas de Ig en suero.

5

#### A. Análisis histológico

Para el examen histológico, se fijaron los bazos en formalina, se incluyeron en parafina siguiendo los procedimientos estándar y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El tratamiento con la proteína de fusión MK61-Fc aumentó el peso del bazo en un 75% en comparación con la Fc o la solución salina control (Figura 19, panel superior). El aumento del peso del bazo refleja un aumento comparable en el número de linfocitos del bazo (Figura 19, panel inferior). Se determinó el número total de linfocitos usando un Contador Technicon H.I.E (Bayer Co. Diagnostic Division, Northwood, MD) siguiendo el procedimiento estándar recomendado por el fabricante. El examen histológico de los bazos de los ratones tratados con MK61-Fc indicó la presencia de hiperplasia linfoide, caracterizada por (1) aumento en el número de centros germinales foliculares moderadamente a bien desarrollados, así como un (2) aumento en el número de células en plasma que se localizaron usualmente en acumulaciones focales en la interfase entre la médula blanca y roja (véase la Figura 20). No se observó hiperplasia linfoide en los ratones tratados con proteína Fc o solución salina.

20

#### B. Análisis FACS

Para el análisis FACS, se recogieron los bazos en solución salina y se homogeneizaron para dar como resultado una suspensión celular. Se obtuvo el número total de linfocitos con un contador celular, a la vez que se derivaban los porcentajes del subconjunto de linfocitos mediante tinción de doble inmunofluorescencia y citometría de flujo. La proteína de fusión MK61-Fc aumentó el número total de linfocitos de bazo en comparación con la Fc o la solución salina control en un 90% (Fig. 21 panel superior). MK61-Fc aumentó proporcionalmente las células T, B y no T, no B. de hecho, MK-61-Fc aumentó los números absolutos de células CD3<sup>+</sup> (células T), CD3-/B220+ (células B), y CD3-/B220- (células no T y no B) pero no afectó significativamente los porcentajes de estas células (Fig. 21 panel inferior). MK61-Fc modificó las proporciones de los subconjuntos de células B. De hecho, MK61-Fc disminuyó el porcentaje de células CD19+/CD5+ pero siguió aumentando su número absoluto (Fig. 21).

35

#### C. Medidas de inmunoglobulinas en suero

Se midieron las inmunoglobulinas en suero mediante ELISA tipo sándwich tal como se describió anteriormente (Guo y col. J. Immunol. 166: 5578-84, 2001). En comparación con Fc control, MK61.Fc aumentó las concentraciones en suero de las IgG, IgG1 e IgG2b totales pero no modificó significativamente las concentraciones del resto de tipos y subtipos de Ig (Fig. 22) El aumento de IgG1 fue el más pronunciado de todos los subtipos de IgG (en aproximadamente 6 veces).

#### Ejemplo 8

##### 45 Efectos adicionales del tratamiento con proteína de fusión MK61-Fc sobre la respuesta *in vivo* de las células T

En otro experimento *in vivo*, se inmunizaron los ratones en el día 0, antes de la primera inyección de la proteína de fusión MK61-Fc de murino o la proteína Fc control, con el antígeno Pneumovax independiente de células T (115 µg, Merck, West Point, PA) o con el antígeno de la hemocianina de lapa californiana dependiente de células T (KLH, Pierce, Rockford, IL en adyuvante de Freund completo (CFA)). Tras el pretratamiento, se trataron los animales tal como se describe en el Ejemplo 7. Se sangraron los ratones en los días 7 y 14 para obtener suero para medir los anticuerpos específicos de antígeno.

55 Se midieron IgG e IgM de anti-KLH y anti-Pneumovax en suero mediante ELISA tal como se ha descrito anteriormente (Yu y col. Nature Immunol. 1: 252-256, 2000). De manera breve, para la medida de anti-KLH, se recubrieron las placas con KLH en PBS, se bloquearon, y se añadieron diversas diluciones de muestras patrón y de ensayo. Se revelaron las IgG e IgM de anti-KLH capturado usando anticuerpos anti-IgG o anti-IgM biotinilados y HRP conjugada con neutravidina (peroxidasa de rábano picante) Para la medida de IgM de anti-Pneumovax se recubrieron las placas con Pneumovax usando poli-L-lisina, se bloquearon y se añadieron diversas diluciones de muestras patrón y de ensayo. Se reveló la IgM de anti-Pneumovax capturado usando un anticuerpo anti-IgM biotinilado y HRP conjugada con neutravidina.

65 En comparación con la proteína Fc control, la proteína MK61-Fc no cambió la concentración del suero de los anticuerpos anti-Pneumovax (IgN; no se muestran los datos); pero cambió la de los anticuerpos anti-KLH de algunos tipos y subtipos de Ig (Véase la Figura 23). En los días 7 y/o 14 de la inmunización, la proteína de fusión MK61-Fc aumentó las concentraciones en suero de la IgG de anti-KLH, total y de todos los subtipos, y anti-IgE (Fig. 23).

# ES 2 327 102 T3

Los estudios *in vivo* de los Ejemplos 8 y 9 muestran que el polipéptido MK61 regula la inmunidad, con referencia particular a la inmunidad adaptativa. La perturbación de la interacción entre MK61 y su(s) ligando(s) todavía desconocido(s) usando una presunta forma soluble de unión al ligando de la molécula (proteína de fusión MK61-Fc) da como resultado la expansión de los linfocitos y la producción de Ig. Esto indica que la perturbación de esta interacción 5 usando “reactivos negativos” (tales como la proteína de fusión MK61-Fc, moléculas derivadas similares a MK61 o anticuerpos antagonistas dirigidos contra MK61 o su(s) ligando(s) puede conducir a la inmunoestimulación. A la vez, la creación artificial de esta interacción usando “reactivos positivos” (tales como formas solubles de unión a MKg1 del(de los) ligando(s) de MK61), anticuerpos agonistas de MK61 u otras moléculas que activan el receptor de MK61) puede conducir a la inmunosupresión.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo 5 constituido por:

- (a) la secuencia de nucleótidos que se define en la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15;
- (b) la porción que codifica el polipéptido MK61 de la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15;
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16; y
- (d) una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquiera de (a)-(c).

2. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo 20 constituido por:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta al menos un 90 por ciento de identidad con el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, en la que el polipéptido codificado tiene al menos 200 residuos de aminoácidos y tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta al menos un 90 por ciento de identidad con el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 12, en la que el polipéptido codificado tiene al menos 150 residuos de aminoácidos y tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 12;
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta al menos un 90 por ciento de identidad con el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 14, en la que el polipéptido codificado tiene al menos 150 residuos de aminoácidos y tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 14;
- (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta al menos un 90 por ciento de identidad con el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 16, en la que el polipéptido codificado tiene al menos 150 residuos de aminoácidos y tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 16; y
- (e) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a) - (d).

3. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo 45 constituido por:

- (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2 con una sustitución conservativa de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
- (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, con una inserción de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2 con una delección interna de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
- (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, que tiene un truncamiento en C y/o en N terminal, en la que el polipéptido tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido codificado que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
- (e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, con una modificación de uno a 50 aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por sustituciones de aminoácido, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2; y

# ES 2 327 102 T3

(f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a)-(e).

4. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- 5 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14, con una sustitución conservativa de uno a 50 aminoácidos, en la que los polipéptidos codificados tienen la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14;
- 10 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14, con una inserción de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14;
- 15 (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14, con una delección interna de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14;
- 20 (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14 que tiene un truncamiento en C y/o en N terminal de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14;
- 25 (e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 14, con una modificación de uno a 50 aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por sustituciones de aminoácido, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora que se define en la SEC DE ID N°: 14; y
- (f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a)-(e).

30 5. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:

- 35 (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 16, con una sustitución conservativa de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 16;
- 40 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 16, con una inserción de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 16;
- (c) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 16, con una delección interna de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 16;
- 45 (d) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 16 que tiene un truncamiento en C y/o en N terminal de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 16;
- 50 (e) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 15, con una modificación de uno a 50 aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por sustituciones de aminoácido, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora que se define en la SEC DE ID N°: 16; y
- (f) una secuencia de nucleótidos complementaria a cualquiera de (a)-(e).

6. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

7. Una célula huésped aislada que comprende el vector de la reivindicación 6.

60 8. La célula huésped de la reivindicación 7 que es una célula eucariota.

9. La célula huésped de la reivindicación 7 que es una célula procariota.

65 10. Un procedimiento para producir un polipéptido MK61 codificado por un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 16 a 32, que comprende cultivar la célula huésped de la reivindicación 7 en condiciones adecuadas para expresar el polipéptido.

# ES 2 327 102 T3

11. El procedimiento de la reivindicación 10, que comprende además el aislamiento del polipéptido MK61 del cultivo.
12. Un polipéptido MK61 aislado codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre el grupo constituido por:
- la secuencia de nucleótidos que se define en la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15;
  - la porción que codifica el polipéptido MK61 de la SEC DE ID Nº: 1, SEC DE ID Nº: 3, SEC DE ID Nº: 5, SEC DE ID Nº: 7, SEC DE ID Nº: 9, SEC DE ID Nº: 11, SEC DE ID Nº: 13, o SEC DE ID Nº: 15;
  - una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16;
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta al menos un 90 por ciento de identidad con el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, en la que el polipéptido codificado tiene al menos 200 residuos de aminoácidos y tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta al menos un 90 por ciento de identidad con el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 12, en la que el polipéptido codificado tiene al menos 150 residuos de aminoácidos y tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 12;
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta al menos un 90 por ciento de identidad con el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 14, en la que el polipéptido codificado tiene al menos 150 residuos de aminoácidos y tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 14;
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que presenta al menos un 90 por ciento de identidad con el polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 16, en la que el polipéptido codificado tiene al menos 150 residuos de aminoácidos y tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 16, y
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, con una sustitución conservativa de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, con una inserción de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, con una delección interna de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2;
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, que tiene un truncamiento en C y/o en N terminal de uno a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido codificado que se define en la SEC DE ID Nº: 2; y
  - una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, con una modificación de uno a 50 aminoácidos seleccionados entre el grupo constituido por sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal en la que el polipéptido codificado tiene la actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2.
13. El procedimiento de la reivindicación 10 u 11, en el que la molécula de ácido nucleico comprende un promotor de ADN diferente del promotor de ADN del polipéptido MK61 natural unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido MK61.
14. Un procedimiento para identificar los inhibidores candidatos de la actividad o producción del polipéptido MK61 que comprende exponer una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que expresa el polipéptido MK61 codificado por un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 16 a 32 para los inhibidores candidatos, midiendo la actividad o producción del polipéptido MK61 en dicha célula, y comparando la actividad del polipéptido MK61 en las células expuestas al inhibidor candidato con la actividad en las células no expuestas al inhibidor candidato.

## ES 2 327 102 T3

15. Un procedimiento para identificar los estimulantes candidatos de la actividad o producción de MK61 que comprende exponer una célula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 que expresa el polipéptido MK61 para los estimulantes candidatos, midiendo la actividad del polipéptido MK-61 en dicha células, y comparando la actividad del polipéptido MK61 en las células al estimulante candidato con la actividad en las células no expuestas 5 al estimulante candidato, en el que el polipéptido MK61 está codificado por un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 16 a 32.

16. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16. 10

17. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: 15

(a) una secuencia de aminoácidos que comprende la forma madura del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16, y que comprende además opcionalmente una metionina amino 20 terminal;

(b) una secuencia de aminoácidos para un ortólogo de la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16, en la que el ortólogo tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16; 25

(c) una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 por ciento de indentidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16; y 30

(d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16 que comprende al menos 25 residuos de aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad reguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16, y 35

(e) una secuencia de aminoácidos para una variante alélica o variante de corte y empalme de cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se definen en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16, o de (a)-(c) en la que el polipéptido codificado tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 4, SEC DE ID N°: 6, SEC DE ID N°: 8, SEC DE ID N°: 10, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14 o SEC DE ID N°: 16. 40

18. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por: 50

(a) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16 con sustituciones conservativas de 1 a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16; 55

(b) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16 con una inserción de 1 a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16; 60

(c) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16 con una delección de 1 a 50 aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16; 65

(d) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID N°: 2 que tiene un truncamiento en C y/o N terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID N°: 2, SEC DE ID N°: 12, SEC DE ID N°: 14, o SEC DE ID N°: 16, y

5 (e) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16, con 1 a 50 modificaciones constituidas por sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.

10 19. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 38 de la SEC DE ID Nº: 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 es cisteína, serina o alanina.

15 20. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 39 de la SEC DE ID Nº: 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 es cisteína, serina o alanina.

20 21. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 51 de la SEC DE ID Nº: 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 es cisteína, serina o alanina.

25 22. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 60 de la SEC DE ID Nº: 2, o 6 es cisteína, serina o alanina.

26 23. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 76 de la SEC DE ID Nº: 2, o 6, es cisteína, serina o alanina.

30 24. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 41 de la SEC DE ID Nº: 14, o 16, es cisteína, serina o alanina.

35 25. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 42 de la SEC DE ID Nº: 14, o 16, es cisteína, serina o alanina.

40 26. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 54 de la SEC DE ID Nº: 14, o 16, es cisteína, serina o alanina.

45 27. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 63 de la SEC DE ID Nº: 14, o 16, es cisteína, serina o alanina.

50 28. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 79 de la SEC DE ID Nº: 14, o 16, es cisteína, serina o alanina.

55 29. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 171 de la SEC DE ID Nº: 2 es leucina, norleucina, isoleucina, valina, metionina, alanina o fenilalanina.

30 30. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 172 de la SEC DE ID Nº: 2 es leucina, norleucina, isoleucina, valina, metionina, alanina o fenilalanina.

35 31. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 178 de la SEC DE ID Nº: 14 es leucina, norleucina, isoleucina, valina, metionina, alanina o fenilalanina.

40 32. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las reivindicaciones 17(a), 17(b), 17(c), 17(e), 18(a), o 18(b), en la que el aminoácido en la posición 180 de la SEC DE ID Nº: 14 es leucina, norleucina, isoleucina, valina, metionina, alanina o fenilalanina.

45 33. Un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

50 (a) una secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14.

55 (b) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el ortólogo tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;

# ES 2 327 102 T3

5 (c) una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad immunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14; y

10 (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 que comprende al menos 25 residuos de aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad immunorreguladora de los polipéptidos que se definen en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14; y

15 (e) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica o variante de corte y empalme de cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se definen en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, o de (a)-(c) en la que el polipéptido codificado tiene una actividad immunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14.

20 34. El anticuerpo de la reivindicación 33 que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento del mismo.

35. Un hibridoma que produce un anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por:

25 (a) una secuencia que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;

30 (b) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el ortólogo tiene una actividad immunorreguladora del polipéptido que se define en SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;

35 (c) una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad immunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, y

40 (d) un fragmento de la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 que comprende al menos 25 residuos de aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad immunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14; y

45 (e) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica o variante de corte y empalme de cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se definen en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, o de (a)-(c) en la que el polipéptido codificado tiene una actividad immunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14.

50 36. Un procedimiento para detectar o cuantificar la cantidad de polipéptido MK61 codificado por un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 16 a 32 en una muestra que comprende poner en contacto una muestra sospechosa de contener el polipéptido MK61 con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti-MK61 de cualquiera de las reivindicaciones 33 ó 34 y detectar dicha unión de dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

37. El anticuerpo de la reivindicación 33 ó 34 que es un anticuerpo humanizado.

60 38. El anticuerpo de la reivindicación 33 ó 34 que es un anticuerpo humano o un fragmento del mismo.

39. El anticuerpo de la reivindicación 33 ó 34 que es un anticuerpo policlonal o un fragmento del mismo.

40. El anticuerpo de la reivindicación 33 ó 34 que es un anticuerpo químérico o un fragmento del mismo.

65 41. El anticuerpo de la reivindicación 33 ó 34 que es un anticuerpo injertado a una región determinante de la complementariedad (CDR) o un fragmento del mismo.

# ES 2 327 102 T3

42. Un anticuerpo antiidiotípico que se une al anticuerpo de la reivindicación 34.
43. El fragmento de la reivindicación 33 ó 34 que es un fragmento de la región variable del anticuerpo.
- 5 44. El fragmento de la región variable de la reivindicación 43 que es un fragmento Fab o un Fab'.
45. Un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región determinante de la complementariedad con especificidad por un polipéptido constituido por la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14.
- 10 46. El anticuerpo de la reivindicación 37 o un fragmento del mismo que se une a una marca detectable.
47. El anticuerpo de la reivindicación 39 o un fragmento del mismo que es un antagonista o agonista de la actividad biológica del polipéptido MK61, en el que el polipéptido MK61 está codificado por un ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 16 a 32.
- 20 48. Uso del anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33 ó 34 o un fragmento del mismo para la preparación de un medicamento para tratar, evitar o mejorar una dolencia, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa.
- 25 49. Una composición que comprende el polipéptido de las reivindicaciones 16, 17, ó 18 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.
- 50 50. La composición de la reivindicación 49 en la que el agente de formulación farmacéuticamente aceptable es un vehículo, adyuvante, solubilizante, estabilizante o antioxidante.
- 30 51. La composición de la reivindicación 47 en la que el polipéptido comprende la forma madura del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, o SEC DE ID Nº: 16.
- 35 52. Un polipéptido que comprende un derivado químicamente modificado del polipéptido de las reivindicaciones 16, 17, ó 18.
53. El polipéptido de la reivindicación 52 que está modificado covalentemente con un polímero soluble en agua.
- 40 54. El polipéptido de la reivindicación 53, en el que el polímero soluble en agua se selecciona entre el grupo constituido por polietilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa, poli-(N-vinilpirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados, y alcohol polivinílico.
- 45 55. Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un agente de formulación farmacéuticamente aceptable.
56. La composición de la reivindicación 55, en la que dicha molécula de ácido nucleico está contenida en un vector vírico.
- 50 57. Un vector vírico que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
58. Un polipéptido que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 16, 17, ó 18 fusionado con una secuencia de aminoácidos heteróloga.
- 55 59. El polipéptido de fusión de la reivindicación 58 en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga es una región constante IgG o un fragmento de la misma.
- 60 60. Un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 36.
61. Un polipéptido de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 39.
62. Uso de un antagonista seleccionado entre el grupo constituido por un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33 ó 34 o un oligonucleótido de sentido contrario para la preparación de un medicamento para tratar, evitar o mejorar una dolencia médica, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa, en la que dicho oligonucleótido es capaz de unirse a una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, ó 3.

63. Uso del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 16, 17, ó 18 o el polipéptido codificado por el ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para preparar un medicamento para tratar, evitar o mejorar una dolencia médica, en la que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa.

5

64. Un procedimiento para diagnosticar en un sujeto una dolencia patológica o una susceptibilidad a una dolencia patológica, en el que la dolencia patológica se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa que comprende:

10 (a) determinar la presencia o la cantidad de expresión del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 16, 17, ó 18 o el polipéptido codificado por la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en una muestra, y

15 (b) comparar el nivel del polipéptido en una muestra biológica, de tejido o celular procedente de sujetos normales o del sujeto en un momento diferente, en el que la susceptibilidad a la dolencia patológica se basa en la presencia o la cantidad de expresión del polipéptido.

65. Un dispositivo que comprende:

20 (a) una membrana adecuada para el implante; y

(b) células encapsuladas en el interior de dicha membrana, en el que dichas células segregan un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 16, 17 ó 18, y en el que dicha membrana es permeable a dicha proteína.

25 66. Un procedimiento para identificar un compuesto que se une a un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 16, 17, ó 18 que comprende:

(a) poner en contacto el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 16, 17 ó 18 con un compuesto; y

30 (b) determinar la extensión de la unión del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 16, 17, ó 18 con el compuesto.

67. Uso de la molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para preparar un medicamento para el tratamiento de una dolencia patológica, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa.

68. Uso de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, SEC DE ID Nº: 16, SEC DE ID Nº: 36 y SEC DE ID Nº: 39 para preparar un medicamento para el tratamiento de una dolencia patológica, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa.

69. Uso de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, SEC DE ID Nº: 14, SEC DE ID Nº: 16, SEC DE ID Nº: 36 y SEC DE ID Nº: 39 para el tratamiento de una dolencia patológica, en el que la dolencia patológica se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa.

70. Uso de un regulador negativo de la señalización del receptor de MK61 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia patológica, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa, en el que el regulador negativo es un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33 ó 34.

71. Uso de un regulador negativo de una señalización del receptor de MK61 para preparación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia patológica, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa, en el que el regulador negativo es una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 16, SEC DE ID Nº: 36 o SEC DE ID Nº: 39.

72. Uso de un regulador positivo de la señalización del receptor de MK61 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia patológica, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa, en el que el regulador positivo es un anticuerpo agonista de MK61 o un polipéptido de MK61 que comprende:

(a) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;

## ES 2 327 102 T3

- (b) la forma madura del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, y que comprende opcionalmente además una metionina amino terminal;
- 5 (c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el ortólogo tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- 10 (d) una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- 15 (e) un fragmento de la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 que comprende al menos 25 residuos de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- 20 (f) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica o variante de corte y empalme de cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se definen en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- 25 (g) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 con 1 a 50 sustituciones conservativas de aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- 30 (h) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 con 1 a 50 inserciones de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- 35 (i) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 con 1 a 50 delecciones de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- 40 (j) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2 que tiene un truncamiento en C y/o en N terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- 45 (k) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, con 1 a 50 modificaciones constituidas por sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14.

50 73. Uso de un regulador positivo del señalador inverso del ligando de MK61 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia patológica, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa, en el que el regulador positivo es un anticuerpo agonista de MK61 o un polipéptido de MK61 que comprende:

- 60 (a) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- (b) la forma madura del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, y que comprende opcionalmente además una metionina amino terminal;
- 65 (c) una secuencia de aminoácidos de un ortólogo de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el ortólogo tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;

# ES 2 327 102 T3

- (d) una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 70 por ciento de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- (e) un fragmento de la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 que comprende al menos 25 residuos de aminoácidos en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- (f) una secuencia de aminoácidos de una variante alélica o una variante de corte y empalme de cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se definen en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 4, SEC DE ID Nº: 6, SEC DE ID Nº: 8, SEC DE ID Nº: 10, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- (g) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 con 1 a 50 sustituciones conservativas de aminoácidos, en la que el polipéptido codificado tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- (h) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 con 1 a 50 inserciones de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- (i) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14 con 1 a 50 delecciones de aminoácidos, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14;
- (j) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2 que tiene un truncamiento en C y/o en N terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14; o
- (k) la secuencia de aminoácidos que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14, con 1 a 50 modificaciones constituidas por sustituciones de aminoácidos, inserciones de aminoácidos, delecciones de aminoácidos, truncamiento C terminal, y truncamiento N terminal, en la que el polipéptido tiene una actividad inmunorreguladora del polipéptido que se define en la SEC DE ID Nº: 2, SEC DE ID Nº: 12, o SEC DE ID Nº: 14.

74. Uso de un regulador negativo del señalador inverso del ligando de MK61 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una dolencia patológica, en el que la dolencia se selecciona entre el grupo constituido por una enfermedad asociada a TNF, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad autoinmune, y una enfermedad linfoproliferativa, en el que el regulador negativo es un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 33 ó 34 o una proteína de fusión que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC DE ID Nº: 16, SEC DE ID Nº: 36 o SEC DE ID Nº: 39.

75. Uso de una proteína de fusión MK61-Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, un anticuerpo anti-MK61 de cualquiera de las reivindicaciones 33, 34, o 37 a 47 o un oligonucleótido de sentido contrario, para la preparación de un medicamento para tratar el trastorno linfoproliferativo de células B y T en un mamífero, en el que dicho oligonucleótido es capaz de unirse a una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

76. El uso de la proteína de fusión MK61-Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, el anticuerpo anti.MK61 de cualquiera de las reivindicaciones 33, 34, o 37 a 47 o el oligonucleótido de sentido contrario, de la reivindicación 75, en el que el trastorno linfoproliferativo es leucemia, mieloma, linfoma B, o linfoma no de Hodgkins.

77. Uso de una proteína de fusión MK61-Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, un anticuerpo anti-MK61 de cualquiera de las reivindicaciones 33, 34, o 37 a 47 o un oligonucleótido de sentido contrario, para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad autoinmune en un mamífero, en el que dicho oligonucleótido es capaz de unirse a una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

78. El uso de la proteína de fusión MK61-Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, e anticuerpo anti.MK61 de cualquiera de las reivindicaciones 33, 34, o 37 a 47 o el oligonucleótido de sentido contrario, de la reivindicación 77, en el que la enfermedad autoinmune es artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso (LSE), enfermedad intestinal del intestino, o enfermedad de Crohn.

# ES 2 327 102 T3

79. Uso de una proteína de fusión MK61-Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, un anticuerpo anti-MK61 de cualquiera de las reivindicaciones 33, 34, o 37 a 47 o un oligonucleótido de sentido contrario, para la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad inflamatoria en un mamífero, en el que dicho oligonucleótido es capaz de unirse a una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.

5

80. El uso de la proteína de fusión MK61-Fc de una cualquiera de las reivindicaciones 58 a 61, el anticuerpo anti-MK61 de cualquiera de las reivindicaciones 33, 34, o 37 a 47 o el oligonucleótido de sentido contrario de la reivindicación 79, en el que la enfermedad inflamatoria es artritis reumatoide, septicemia, enfermedad intestinal del intestino, o enfermedad de Crohn.

10

81. Un fragmento de polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 26-60 de la región rica en cisteína de la SEC DE ID N°: 36.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

Secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID N°: 1) y secuencia de aminoácidos (SEC DE ID N°: 2) que codifican MK61T1 humano (hMK61T1)

Secuencia de ácido nucleico

```

1  GTAAAGATGG GGTTTCATTT TGTTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTTGGCCTCC CAAAGTGTG GGATTACAGG
101  CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTTA CTTCTAATGA CGGTTCTAAT
151  TCTCCACAAT AACCCCTATGA GACAGGTGCT ATCATTGTCT TATTTTAGGG
201  ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251  ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTG
301  GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351  TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTTCCCCCAC ATCACCGCGT
401  CCTTTCTTCT GCCCCATTTC CCCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451  GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCTCCT
501  GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCCTGGCGCC ACCGCCGGAA GCCTCCAGT
551  ACTGCGGCCG CCTTGAATAC TGGAAACCCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601  TGCCTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCTGTC CCGGACTATG AGTTCCGGGA
651  AAACTGCGGA CTCAAATGACC ACGGCGATT CGTAACGCC CCGTTCCGAA
701  AGTGTTCCTTC TGGGCAGTGC AACCCCGACG GCGCGGAGCT ATGTAGCCCC
751  TGCGGCGGCG GAGCCGTGAC CCCTACTCCC GCCGCGGGCG GGGGCAGAAC
801  CCCGTGGCGC TGCAGAGAGA GGCCGGTCCC TGCCAAGGGG CACTGCCCCC
851  TCACACCTGG AAACCCAGGC GCCCCTAGCT CCCAGGAGCG CAGCTCACCA
901  GCAAGTTCCA TTGCCCTGGAG GACCCCTGAG CCTGTCCCTC AGCAGGCCG
951  GCCGAATTTC CTTCCGCTCG TGGTGCTGGT CCTGCTCCTG ACCTTGGCGG
1001  TGATAGCGAT CCTCCTGTT ATTCTGCTCT GGCATCTCTG CTGGCCCAAG
1051  GAGAAAGCCG ACCCCTATCC CTATCCTGGC TTGGTCTGCG GAGTCCCCAA
1101  CACCCACACC CCTTCCTCCT CGCATCTGTC CTCCCCAGGC GCCCTGGAGA
1151  CAGGGGACAC ATGGAAGGAG GCCTCACTAC TTCCACTCCT GAGCAGGGAA
1201  CTGTCCAGTC TGGCGTCACA ACCCCTGTCT CGCCTCCTGG ATGAGCTGGA
1251  GGTGCTGGAA GAGCTGATTG TACTGCTGGA CCTGAGCCT GGGCCAGGTG
1301  GGGGTATGGC CCATGGCACT ACTCGACACC TGGCCGCAAG ATATGGGCTG
1351  CCTGCTGCCT GGTCCACCTT TGCCTATTG TGAGGCCGA GTCGCTCGCC
1401  GCTGCGGGCT CTGATTGAGA TGGTGGTGGC AAGGGAGCCC TCTGCCTCCC
1451  TGGGCCAGCT TGGCACACAC CTCGCCCCAGC TAGGGCGGGC AGATGCATTG
1501  CGGGTGCTGT CCAAGCTTGG CTCATCTGGG GTTGTGGG CTTAACACCC
1551  AATAAAAGAAC TTGCTGACT ACTAAGCCCA GTATACAATT AGCACTGAAG
1601  TACTTCTTGA AGTACAATCC TAATTGGGCA AAGACCCAAC AGATAGCCTC
1651  ACTGCTCTTC GCCCTAGA

```

Secuencia de aminoácidos

```

1  MGPGRCLLTA LLLLALAPPP EASQYCGRLIE YWNPDNKCCS SCLQRFGPPP
51  CPDYEFRENC GLNDHGDFVT PPFRKCSSGQ CNPDGAELCS PCGGGAVTPT
101  PAAGGGRTPW RCRERPVPACK GHCPPLPGNP GAPSSQERSS PASSIAWRTP
151  EPVPQQAWPN FLPLVVLVLL LTLAVIAILL FILLWHLWP KEKADPYYP
201  GLVCGVPNTH TPSSSHLSSP GALETGDTWK EASLLPLLSR ELSSLASQPL
251  SRLLDELEVL EELIVLLDPE PGPGGGMAHG TTRHLAARYG LPAAWSTFAY
301  SLRPSRSPLR ALIEMVVARE PSASLGQLGT HLAQLGRADA LRVLSKLGSS
351  GVCWA

```

Figura 2

Secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID N°: 3) y secuencia de aminoácidos (SEC DE ID N°: 4) que codifican MK61T2 humano (hMK61T2)

Secuencia de ácido nucleico

```

1  GTAAAGATGG GGTTTCATTG TGTTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTTGGCCTCC CAAAGTGTG GGATTACAGG
101  CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTTA CTTCTAAATGA CGGTTCTAAT
151  TCTCCACAAT AACCCCTATGA GACAGGTGCT ATCATTGTCT TATTTTAGGG
201  ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251  ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTG
301  GGCTTCTCTG ATAAACCGGT CAGTTGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351  TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTTCCCCAC ATCACCGCGT
401  CCTTTCTTCT GCCCCGATTTC CCCGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451  GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCTCCT
501  GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCCTGGCGCC ACCGCCGGAA GCCTCCCAGT
551  ACTCGGGCCG CCTTGAATAC TGGAACCCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601  TGCCTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCTGC CGGGGTGAGA ATCCGAGACC
651  GAGCCTTGCT TGGGCGGAGC TTGCAGAGGC CGGTCCCTGC CAAGGGGCAC
701  TGCCCCCTCA CACCTGGAAA CCCAGGCGCC CCTAGCTCCC AGGAGCGCAG
751  CTCACCAGCA AGTTCCATTG CCTGGAGGAC CCCTGAGCCT GTCCCTCAGC
801  AGGCCTGGCC GAATTTCCTT CCGCTCGTGG TGCTGGTCCT GCTCCTGACC
851  TTGGCGGTGA TAGCGATCCT CCTGTTTATT CTGCTCTGGC ATCTCTGCTG
901  GCCCAAGGAG AAAGCCGACC CCTATCCCTA TCCTGGCTTG GTCTGCGGAG
951  TCCCCAACAC CCACACCCCT TCCTCCTCGC ATCTGTCTC CCCAGGCGCC
1001  CTGGAGACAG GGGACACATG GAAGGGAGCC TCACTACTTC CACTCCTGAG
1051  CAGGGAACTG TCCAGTCTGG CGTCACAAACC CCTGTCTCGC CTCCTGGATG
1101  AGCTGGAGGT GCTGGAAGAG CTGATTGTAC TGCTGGACCC TGAGCCTGGG
1151  CCAGGTGGGG GTATGGCCA TGGCACTACT CGACACCTGG CCGCAAGATA
1201  TGGGCTGCCT GCTGCCTGGT CCACCTTGC CTATTCGCTG AGGCCGAGTC
1251  GCTCGCCGCT GCGGGCTCTG ATTGAGATGG TGGTGGCAAG GGAGCCCTCT
1301  GCCTCCCTGG GCCAGCTGG CACACACCTC GCCCAGCTAG GGCAGGGCAGA
1351  TGCATTGCGG GTGCTGTCCA AGCTTGGCTC ATCTGGGGTT TGCTGGGCTT
1401  AACACCCAAT AAAGAACTTT GCTGACTACT AAGCCCAGTA TACAATTAGC
1451  ACTGAAGTAC TTCTTGAAGT ACAATCCTAA TTGGGCAAAG ACCAACAGA
1501  TAGCCTCACT GCTCTTCGCC CTAGA

```

Secuencia de aminoácidos

```

1  MGPGRCLLTA LLLLALAPP EASQYCCRLE YWNPDNKCCS SCLQRFGPPP
51  CPGENPRPSL AWAELAEAGP CQGALPPHTW KPRRP*

```

Figura 3

Secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID N°: 5) y secuencia de aminoácidos (SEC DE ID N°: 6) que codifican MK61T3 humano (hmK61T3)

Secuencia de ácido nucleico

```

1  GTAAAGATGG GGTTTCATTT TGTTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTTGGCCTCC CAAAGTGTG GGATTACAGG
101  CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTTA CTTCTAATGA CGGTTCTAAT
151  TCTCCACAAT AACCTATGA GACAGGTGCT ATCATTGTCT TATTITAGGG
201  ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251  ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTG
301  GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351  TCCCAGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTTCCCCCAC ATCACCGCGT
401  CCTTTCTTCT GCCCGATTTC CCCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451  GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCTCCT
501  GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCCTGGCGCC ACCGCCGGAA GCCTCCAGT
551  ACTGCGGCCG CCTTGAATAC TGGAAACCCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601  TGCCTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCTGC CCGGACTATG AGTTCCGGGA
651  AAACTGCGGA CTCAATGACC ACGGCAGATT CGTAACGCC CCGTTCCGAA
701  AGTGTTCCTTC TGGGCAGTGC AACCCCCACG GCGCGGAGCT ATGTAGCCCC
751  TGCAGGGCG GAGCCGTGAC CCCTACTCCC GCGCGGGCG GGGGCAGAAC
801  CCCGTGGCGC TGCAAGAGAGA ACTGTCCAGT CTGGCGTCAC AACCCCTGTC
851  TCGCCTCCTG GATGAGCTGG AGGTGCTGGA AGAGCTGATT GTACTGCTGG
901  ACCCTGAGCC TGGGCCAGGT GGGGGTATGG CCCATGGCAC TACTCGACAC
951  CTGGCCGCAA GATATGGGCT GCCTGCTGCC TGGTCCACCT TTGCTTATTG
1001  GCTGAGGCCG AGTCGCTCGC CGCTGGGGC TCTGATTGAG ATGGTGGTGG
1051  CAAGGGAGCC CTCTGCCTCC CTGGGCCAGC TTGGCACACA CCTCGCCCAG
1101  CTAGGGCGGG CAGATGCATT GCAGGTGCTG TCCAAGCTTG GCTCATCTGG
1151  GGTTTGCTGG GCTTAACACC CAATAAAGAA CTTTGCTGAC TACTAAGCCC
1201  AGTATAACAAT TAGCACTGAA GTACTTCTTG AAGTACAATC CTAATTGGGC
1251  AAAGACCCAA CAGATAGCCT CACTGCTCTT CGCCCTAGA

```

Secuencia de aminoácidos

```

1  MGPGRCLLTA LLLLALAPPP EASQYCGRLLE YWNPDNKCCS SCLQRFGPPP
51  CPDYEFRENC GLNDHGDFVT PPFRKCSSGQ CNPDGAELCS PCGGGAVTPT
101  PAAGGGRTPW RCRENCPVWR HNPCLASWMS WRCWKS*

```

Figura 4

Secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID N°: 7) y secuencia de aminoácidos (SEC DE ID N°: 8) que codifican MK61T4 humano (hMK61T4)

Secuencia de ácido nucleico

```

1  GTAAAGATGG GGTTTCATTT TGGTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTTGGCCTCC CAAAGTGTG GGATTACAGG
101  CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCCCTGTTA CTTCTAATGA CGGTTCTAAT
151  TCTCCACAAT AACCCCTATGA GACAGGTGCT ATCATTGTCT TATTTTAGGG
201  ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251  ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTG
301  GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351  TCCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTTCCCCCAC ATCACCGCGT
401  CCTTTCTTCT GCCCCATTTC CCCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451  GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCTCCT
501  GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCCCCTGGCG ACCGCCGAA GCCTCCAGT
551  ACTGCAGGGCG CTTGAATAC TGGAAACCCAG ACAACAAAGT CTGCAGGAGC
601  TGCCTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCCTGC CCGGGCGCCC TGGAGACAGG
651  GGACACATGG AAGGAGGGCT CACTACTTCC ACTCCTGAGC AGGGAACTGT
701  CCAGTCTGGC GTCACAAACCC CTGTCTCGCC TCCTGGATGA GCTGGAGGTG
751  CTGGAAGAGC TGATTGTACT GCTGGACCCCT GAGCCCTGGGC CAGGTGGGGG
801  TATGGCCCAT GGCACTACTC GACACCTGGC CGCAAGATAT GGGCTGCCTG
851  CTGCCTGGTC CACCTTTGCC TATTCGCTGA GGCCGAGTCG CTCGCCGCTG
901  CGGGCTCTGA TTGAGATGGT GGTGGCAAGG GAGCCCTCTG CCTCCCTGGG
951  CCAGCTTGGC ACACACCTCG CCCAGCTAGG GCGGGCAGAT GCATTGCGGG
1001  TGCTGTCCAA GCTTGGCTCA TCTGGGGTTT GCTGGCTTA ACACCCAATA
1051  AAGAACTTTG CTGACTACTA AGCCCAAGT ACAATTAGCA CTGAAGTACT
1101  TCTTGAAGTA CAATCCTAAT TGGGCAAAGA CCCAACAGAT AGCCTCACTG
1151  CTCTTCGCCCC TAGA

```

Secuencia de aminoácidos

```

1  MGPGRCLLTA LLLLALAPPP EASQYCGRLE YWNPDNKCCS SCLQRFGPPP
51  CPGALETGDT WKEASLLPLL SRELSSLASQ PLSRLLDELE VLEELIVLLD
101  PEPGPGGGMA HGTTRHLAAR YGLPAAWSTP AYSLRPSRSP LRALIEMVVA
151  REPSASLGQL GTHLAQLGRA DALRVLSKLG SSGVCWA*

```

Figura 5

Secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID N°: 9) y secuencia de aminoácidos (SEC DE ID N°: 10) que codifican MK61T5 humano (hMK61T5)

Secuencia de ácido nucleico

```

1  GTAAAGATGG GGTTTCATTT TGTTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTTGGCCTCC CAAAGTGTG GGATTACAGG
101  CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTTA CTTCTAATGA CGGTTCTAAT
151  TCTCCACAAAT AACCTATGA GACAGGTGCT ATCATTGTCT TATTTAGGG
201  ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251  ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTG
301  GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351  TCCCGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTCCCCCAC ATCACCGCGT
401  CTTTCTTCT GCCCGATTTC CCCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTT
451  GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCTCCT
501  GACGGCCTG TTGCTTCTGG CCCTGGCGCC ACCGCCGGAA GCCTCCAGT
551  ACTGCGGCCG CCTTGAATAC TGGAAACCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601  TGCCTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCTGC CCGGAGGCCG GTCCCTGCCA
651  AGGGGCACTG CCCCCCTCACA CCTGGAAACC CAGGCGCCCC TAGCTCCCAG
701  GAGCGCAGCT CACCAGCAAG TTCCATGCC TGAGGGACCC CTGAGCCTGT
751  CCCTCAGCAG GCCTGGCCGA ATTTCCCTCC GCTCGTGGTG CTGGCTCTGC
801  TCCTGACCTT GGCGGTGATA GCGATCCTCC TGTTTATTCT GCTCTGGCAT
851  CTCTGCTGGC CCAAGGAGAA AGCCGACCCC TATCCCTATC CTGGCTTGGT
901  CTGCGGAGTC CCCAACACCC ACACCCCTTC CTCCCTCGCAT CTGTCCTCCC
951  CAGGCGCCCT GGAGACAGGG GACACATGGA AGGAGGCCTC ACTACTCCA
1001  CTCCTGAGCA GGGAACTGTC CAGTCTGGCG TCACAACCCC TGTCTGCCT
1051  CCTGGATGAG CTGGAGGTGC TGGAAAGAGCT GATTGTACTG CTGGACCCCTG
1101  AGCCTGGGCC AGGTGGGGGT ATGGCCCATG GCACTACTCG ACACCTGGCC
1151  GCAAGATATG GGCTGCCTGC TGCCTGGTCC ACCTTTGCCT ATTCCGCTGAG
1201  GCCGAGTCGC TCGCCGCTGC GGGCTCTGAT TGAGATGGTG GTGGCAAGGG
1251  AGCCCTCTGC CTCCCTGGGC CAGCTTGGCA CACACCTCGC CCAGCTAGGG
1301  CGGGCAGATG CATTGCGGGT GCTGTCCAAG CTTGGCTCAT CTGGGGTTTG
1351  CTGGGCTTAA CACCCAATAA AGAACTTTGC TGACTACTAA GCCCAGTATA
1401  CAATTAGCAC TGAAGTACTT CTTGAAGTAC AATCCTAATT GGGCAAAGAC
1451  CCAACAGATA GCCTCACTGC TCTTCGCCCT AGA

```

Secuencia de aminoácidos

```

1  MGPGRCLLTA LLLLALAPP EASQYCGRLE YWNPDNKCCS SCLQRFGPPP
51  CPEAGPCQGA LPPHTWKPRR P*

```

**Figura 6**

Secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID N°: 11) y secuencia de aminoácidos (SEC DE ID N°: 12) que codifican MK61T6 humano (hMK61T6)

Secuencia de ácido nucleico

```

1  GTAAAGATGG GGTTTCATTT TGTTGTCCAG GCTGATCTCT CGAACTCCTG
 51  GGCTCAAGTG ATCCTCCTGT CTTGGCCTCC CAAAGTGTG GGATTACAGG
101  CATGAGCCAC CACACCCAGC CCCTGCTTTA CTTCTAATGA CGGTTCTAAT
151  TCTCCACAAT AACCCCTATGA GACAGGTGCT ATCATTGTCT TATTTTAGGG
201  ATGGAAAAGG GAGGGTGGGT GGGTGAGGAC ACGGCAGAGG TGGGATATGC
251  ATTCTTGCAA TCTAGATCCG CAGCCCTGTT AGTCCCCTAG TGGCCTTGTG
301  GGCTTCTCTG ATAACCGGCT CAGTTGGGGG ATGAGGGCTC GGGGGTAGAT
351  TCCCAGGCTTC CGAAGAGGCG TGAGAATTCT GTTCCCCCAC ATCACCGCGT
401  CCTTTCTTCT GCCCCGATTTG CCCGGAAAGT GTAGCAGAGG CGCTGTGTTT
451  GGAAGTCCCG CTATCACGGC CCCCCCAGATG GGGCCTGGAC GATGCCCTCCT
501  GACGGCCTTG TTGCTTCTGG CCCTGGCGCC ACCGCCGGAA GCCTCCCAGT
551  ACTGCGGCCG CCTTGAATAC TGGAACCCAG ACAACAAGTG CTGCAGCAGC
601  TGCCTGCAAC GCTTCGGGCC GCCCCCCTGC CCGGAACTGT CCAGTCTGGC
651  GTCACAACCC CTGTCCTGCC TCCCTGGATGA GCTGGAGGTG CTGGAAGAGC
701  TGATTGTACT GCTGGACCT GAGCCTGGGC CAGGTGGGGG TATGGCCCAT
751  GGCACTACTC GACACCTGGC CGCAAGATAT GGGCTGCCTG CTGCCTGGTC
801  CACCTTGCC TATTGCTGA GGCGGAGTCG CTCGCCGCTG CGGGCTCTGA
851  TTGAGATGGT GGTGGCAAGG GAGCCCTCTG CCTCCCTGGG CCAGCTTGGC
901  ACACACCTCG CCCAGCTAGG GCGGGCAGAT GCATTGCGGG TGCTGTCAA
951  GCTTGGCTCA TCTGGGGTTT GCTGGGTTA ACACCCAATA AAGAACTTTG
1001 CTGACTACTA AGCCCAGTAT ACAATTAGCA CTGAAGTACT TCTTGAAGTA
1051 CAATCCTAAT TGGGCAAAGA CCCAACAGAT AGCCTCACTG CTCTTCGCC
1105 TAGA

```

Secuencia de aminoácidos

```

1  MGPGRCLLTA LLLLALAPPP EASQYCGRLLE YWNPDNKCCS SCLQRFGPPP
 51  CPELSSLASQ PLSRLLDELE VLEELIVLLD PEPGPGGGMA HGTTRHLAAR
101  YGLPAAWSTF AYSLRPSRSP LRALIEMVVA REPSASLGQL GTHLAQLGRA
151  DALRVLSKLG SSGVCWA*

```

Figura 7

Secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID N°: 13) y secuencia de aminoácidos (SEC DE ID N°: 14) que codifican MK61 de ratón (mMK61; Smil2-00051-F3)

Secuencia de ácido nucleico

```

1  CGGACCGCTG  GGCGGACGCG  TGGGTGGTC  TGCAC TGAAA  CAGTGTGGGT
51  GGAAGTGGTC  ACAGCCCTCA  AGCTGCAGGC  TCTGCTGAGA  TGGGGCCAG
101 CTGGCTTCTC  TGGACAGTGG  CGGTGGCAGT  GCTGCTCTG  ACCCGGGCTG
151 CGTCAATGGA  AGCCTCTAGC  TTCTGTGGCC  ACCTTGAGTA  CTGGAACTCT
201 GACAAGAGGT  GCTGCAGCCG  CTGCCCTGCAA  CGCTTTGGC  CTCCCTGCATG
251 TCCTGATCAC  GAGTTCACCG  AAAACTGCGG  GCTCAATGAC  TTCGGCGATA
301 CTGTAGCACA  TCCTTTCAA  AAGTGTTC  CTGGGTATTG  CAACCCCAAT
351 GGCACAGAGC  TGTGTAGCCA  GTGTAGCAGC  GGAGCCGCCG  CAGCCCCAGC
401 TCACGTGGAG  AGCCCTGGTA  GAACCCACAA  GCAGTGTAGA  AAGAAGCCCC
451 TCCCTCCCAA  GGATGTCTGT  CCTCTTAAAC  CTGAAGACGC  AGGTGCCTCT
501 AGCTCACCTG  GGAGGTGGAG  CCTTGGGCAG  ACAACCAAAGA  ATGAGGTCTC
551 CAGCCGACCA  GGTTTTGTCT  CAGCCTCAGT  GCTGCCTCTG  GCAGTGTGTC
601 CACTGTTGCT  GGTGCTGCTT  CTGATATTGG  CAGTGGCTT  GCTCTCTTTG
651 TTCAAGAGAA  AAGTCCGTT  CCGTCCTGGT  TCCAGCTCAG  CTTTTGGAGA
701 TCCCAGCACC  TCTCTACATT  ACTGGCCCTG  CCCAGGTACC  CTGGAGGTAT
751 TGGAAAGTAG  AAACAGAGGG  AAAGCTAATC  TGCTGCAGCT  CTCAAGCTGG
801 GAGCTTCAGG  GTCTGGCCTC  TCAGCCCCTC  TCCCTCTGC  TGGATGAGCT
851 GGAAGTTCTG  GAGGAGCTGA  TTATGCTATT  GGACCCCTGAG  CCTGGGCCGA
901 GCGGGAGCAC  GGCTTATGGT  ACCACACGAC  ACCTGGCTGC  AAGATACTGGG
951 CTGCCTGCCA  CCTGGTCTAC  CTTCGCCTAC  TCACTTCGGC  CCAGTCGCTC
1001 ACCCCTGCGG  GCCCTGATTG  AGATGGTTGT  GGCAAGGGAG  CCTTCTGCTA
1051 CTCTGGGTCA  ATT CGGCACA  TATTGGCTC  AGCTAGGTCTG  CACAGATGCT
1101 CTGCAGGTGC  TATCTAAACT  TGGCTGAGTC  AGAGTTGCT  GGGGCTTA
1151 ACTCCATCAA  TAAAGTTTCC  CTTGAAGCCA  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA
1201 AA

```

Secuencia de aminoácidos

```

1  MGPSWLLWTV AVAVLLLTRA ASMEASSFCG HLEYWNSDKR CCSRCLQRFG
51  PPACPDHEFT ENCGLNDFGD TVAHPFKKCS PGYCNPNNGTE LCSQCSSGAA
101 AAPAHVESPG RTHKQCRKKP VPPKDVCPLK PEDAGASSSP GRWSLGQTTK
151 NEVSSRPGFV SASVLPLAVL PLLLVLLLIL AVVLLSLFKR KVRSPGSSS
201 AFGDPSTS LH YWPCPGTLEV LESRNRGKAN LLQLSSWELQ GLASQPLSLL
251 LDELEVLEEL IMLLDPEPGP SGSTAYGTTR HLAARYGLPA TWSTFAYSLR
301 PSRSPLRALI EMVVAREPSA TLGQFGTYLA QLGRTDALQV LSKLG*

```

Figura 8

Secuencia de ácido nucleico (SEC DE ID N°: 15) y secuencia de aminoácidos (SEC DE ID N°: 16) que codifican el polipéptido de fusión mMK61-Fc de ratón (mMK61-Fc)

Secuencia de ácido nucleico

```

1  CCACCATGGG GCCCAGCTGG CTTCTCTGGA CAGTGGCGGT GGCAGTGCTG
51  CTCCTGACCC GGGCTCGCTC AATGGAAGCC TCTAGCTTCT GTGGCCACCT
101 TGAGTACTGG AACTCTGACA AGAGGGTCTG CAGCCGCTGC CTGCAACGCT
151 TTGGGCCTCC TGCATGTCT GATCACGAGT TCACGGAAAA CTGCGGGCTC
201 AATGACTTCG GCGATACTGT AGCACATCCT TTCAAAAAGT GTTCCCCTGG
251 GTATTGCAAC CCCAATGGCA CAGAGCTGTG TAGCCAGTGT AGCAGCGGAG
301 CCGCCGCAGC CCCAGCTCAC GTGGAGAGCC CTGGTAGAAC CCACAAGCAG
351 TGTAGAAAGA AGCCCGTCCC TCCCAAGGGAT GTCTGTCTC TTAAACCTGA
401 AGACGCAGGT GCCTCTAGCT CACCTGGGAG GTGGAGCCTT GGGCAGACAA
451 CCAAGAATGA GGTCGCGGGCC GCTCGTCGTG CATCAGTAGA GCCCAAATCT
501 TGTGACAAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCACCTG AACTCCTGGG
551 GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCCC AAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA
601 TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
651 GACCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA
701 TGCCAAGACA AAGCCGCAGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG
751 TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC
801 AAGTGCAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT
851 CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAAC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC
901 CATCCCGGA TGAGCTGACC AAGAACCGAG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
951 AAAGGCTTCT ATCCCAGCGA CATGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA
1001 GCGGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCCTCC CGTGTGGAC TCCGACGGCT
1051 CCTTCTTCCT CTACAGGAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
1101 GGGAAAGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
1151 CACGCAGAAC AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAAAGAAGA GCTAGTCTCC
1201 ATCATCATCA TCATCATTGA TAAGTCGAC

```

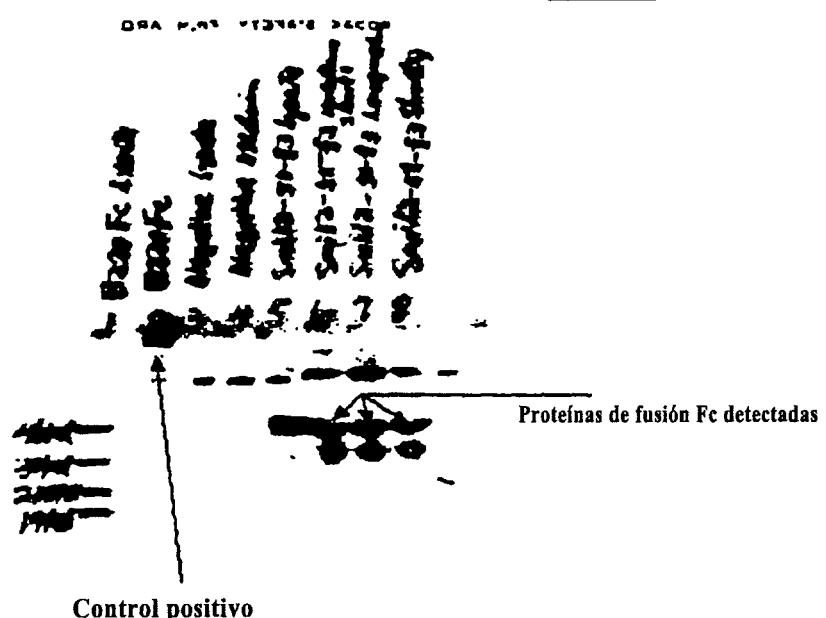
Secuencia de aminoácidos

```

1  MGPSWLLWTV AVAVLLLTRA ASMEASSFCG HLEYWNSDKR CCSRCLQRFG
51  PPACPDHEFT ENGLNDFGD TVAHPFKKCS PGYCNPNNGTE LCSQCSSGAA
101 AAPAHVESPG RTHKQCRKKP VPPKDVCPLK PEDAGASSSP GRWSLGQTTK
151 NEVAAAARRAS VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS
201 RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE OYNSTYRVVS
251 VLTVLHODWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS
301 RDELTKNOVS LTCLVKGFP SDIAVEWESN GOPENNYKTT PPVLDSDGSF
351 FLYSKLTVDK SRWOOGNVFS CSVMHEALHN HYTOKSLSLS PGKRRASLHH
401 HHHH** 

```

Figura 9



Hilera 1: lisado de control positivo

Hilera 2: medio de control positivo (la proteína detectada es de 300 kd)

Hilera 3: lisado de control negativo

Hilera 4: medio de control negativo

Hilera 5: lisado celular transfectado Smil2-00051-f3Fc

Hilera 6: medio celular transfectado Smil2-00051-f3Fc (muestra 1)

Hilera 7: medio celular transfectado Smil2-00051-f3Fc (muestra 2)

Hilera 8: medio celular transfectado Smil2-00051-f3Fc (muestra 3)

Figura 10

Comparación de la secuencia de aminoácidos de mMK61 (SEC DE ID Nº: 14),  
(mMK61) con la secuencia de aminoácidos de un receptor  
de OPG, Mrank, un miembro conocido de la familia TNFR (SEC DE ID Nº: 17)

	10	20	30	40	50	60
Mrank	MAPRARRRQLPAPLLALCVLLVPLQVTLQVT	PPCTQERHYEHLGRCCSRCEPGKYLSSK				
	: :    : ::::::   : ::::       ::					
mMK61	MGPSWLLWTVAVAVLLLTRAASMEASSFCGHLEYWNSDKRCCSRCLQ	-RFGPPA				
	10	20	30	40	50	
	70	80	90	100	110	
Mrank	CTPTSDSVCLPCGPDEYLDTWNEE	-DKCLLHKVCDAGKALVA	-VDPGNHTAP			
	:    :: :    :      : :   :					
mMK61	C-PDHE-FTENCGLNDFGDTVAHPFKCSPGYCNPGTELCSQCSSGAAAAP					
	60	70	80	90	100	

Figura 11

Figura 12

Comparación de la secuencia de aminoácidos de mMK61 (SECDE ID N°: 14),  
(mMK61) con la secuencia de aminoácidos de un receptor conocido  
de la linfotoxina-beta de ratón, Tnfrc, (SEC DE ID N°: 19)

Tnfrc		90	100	110			
mMK61		EHWNYLTICQLCRPCDPVMGLEEIAP--CT					
		:                  :  :					
		EYWNSDKRC--CSRC----LQRFGPPACP					
		40	50				
		120	130	140	150	160	
Tnfrc	SKRKTO-C-----RCQPGMFCAAWELECTHCELLSDCPGTEAEKLDEVGK						
mMK61	:DHEFTENCGLNDFGDTVAHPFKKCSPL-YCNP----NGTELCSQCSSGAAAAAPAHVESP						
		60	70	80	90	100	
		170	180	190	200	210	220
Tnfrc	GNNHCVPCKAGHFQNTSSPSARCQPHTRCENQGLVEAAPGTAQSDTTCKNPLEPLPPEMS						
mMK61	GRTHK-QCR----KRPVPPKDVC-P-LKPEDAG-ASSSPGRWSLGQTTKNEVSSRPGFVS						
		110	120	130	140	150	160
		230	240	250	260	270	
Tnfrc	GTMLMLAVL-LPLAFFLLLATVFSCIWK---SHPSLCKLG---SLLKRRPQGEGPNPV						
mMK61	ASVLPLAVLPLLLVLILAVVLLSLFKRKVVRSPGSSSAFGDPSTSLHYWPC-PGTLEV						
		170	180	190	200	210	
		280	290	300	310	320	330
Tnfrc	AGSWEPPKAHPYFPDLVQ-PLLPISGDVS-PVSTGLPAAPVLEAGVPQQQSPLDLTREPO						
mMK61	LESRNRGKA----NLLQLSSWEQGLASQPLSLLLDELEVLEE-----LIMLLDP-						
		230	240	250	260		
		340					
Tnfrc	LEPGEQSQVAHGTN						
mMK61	:::: :  :						
		-EPGPSSGSTAYGTT					
		270					

Figura 13

Expresión del ARNm de MK61 humano en tejidos humanos,  
tal como se determinó mediante la inmunotransferencia Northern

**1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8.**



- 1. Bazo**
- 2. Timo**
- 3. Próstata**
- 4. Testículo**
- 5. Ovario**
- 6. Intestino delgado**
- 7. Colon**
- 8. Leucocitos  
de sangre periférica**

Figura 14

Expresión del ARNm de MK61 humano en tejidos linfoides humanos,  
tal como se determinó mediante la inmunotransferencia Northern

1. 2. 3. 4. 5. 6.



- 1. Bazo**
- 2. Nódulo linfático**
- 3. Timo**
- 4. Leucocitos  
de sangre periférica**
- 5. Médula ósea**
- 6. Hígado fetal**

Figura 15  
Expresión del ARNm de MK61 humano en tejidos humanos y líneas celulares, tal como  
se determinó mediante la PCR cuantitativa

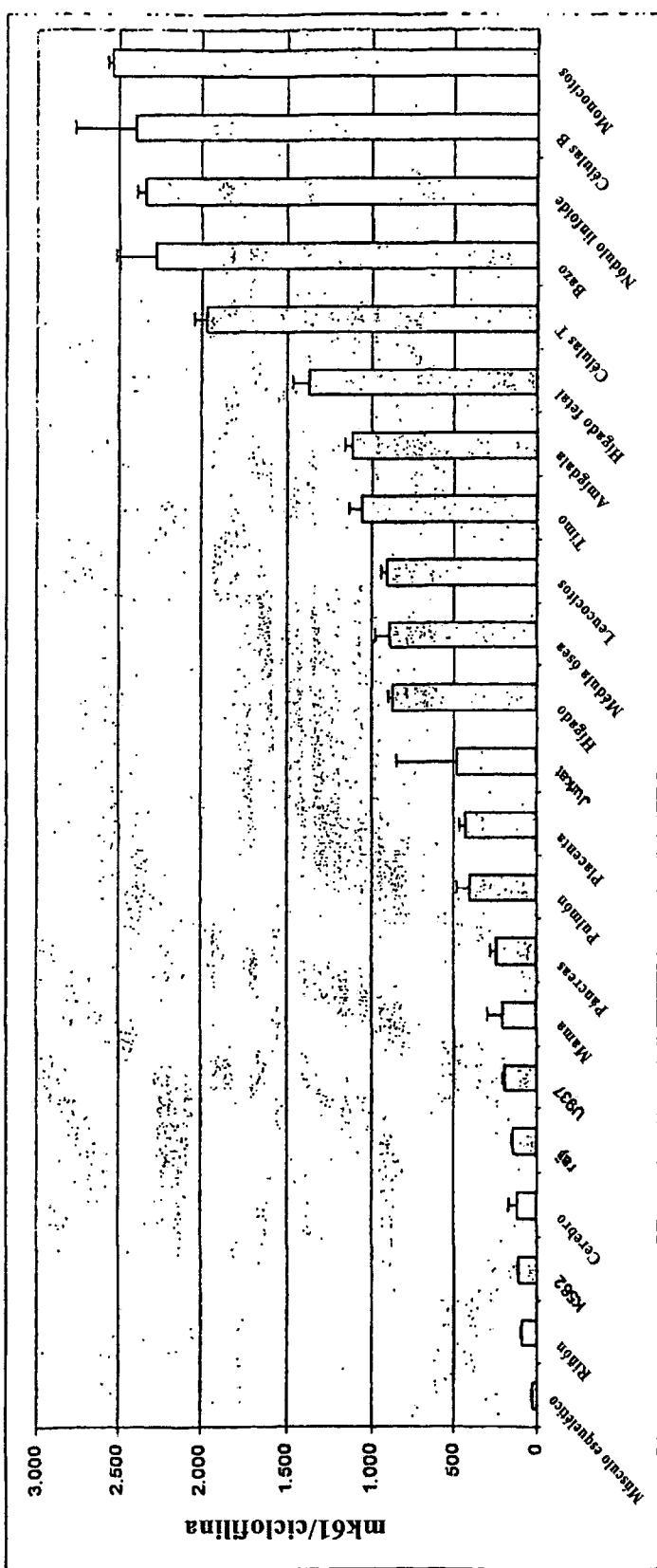


Figura 16  
Unión de MK61-Fc con las líneas celulares, tal como se determinó mediante el análisis FACS

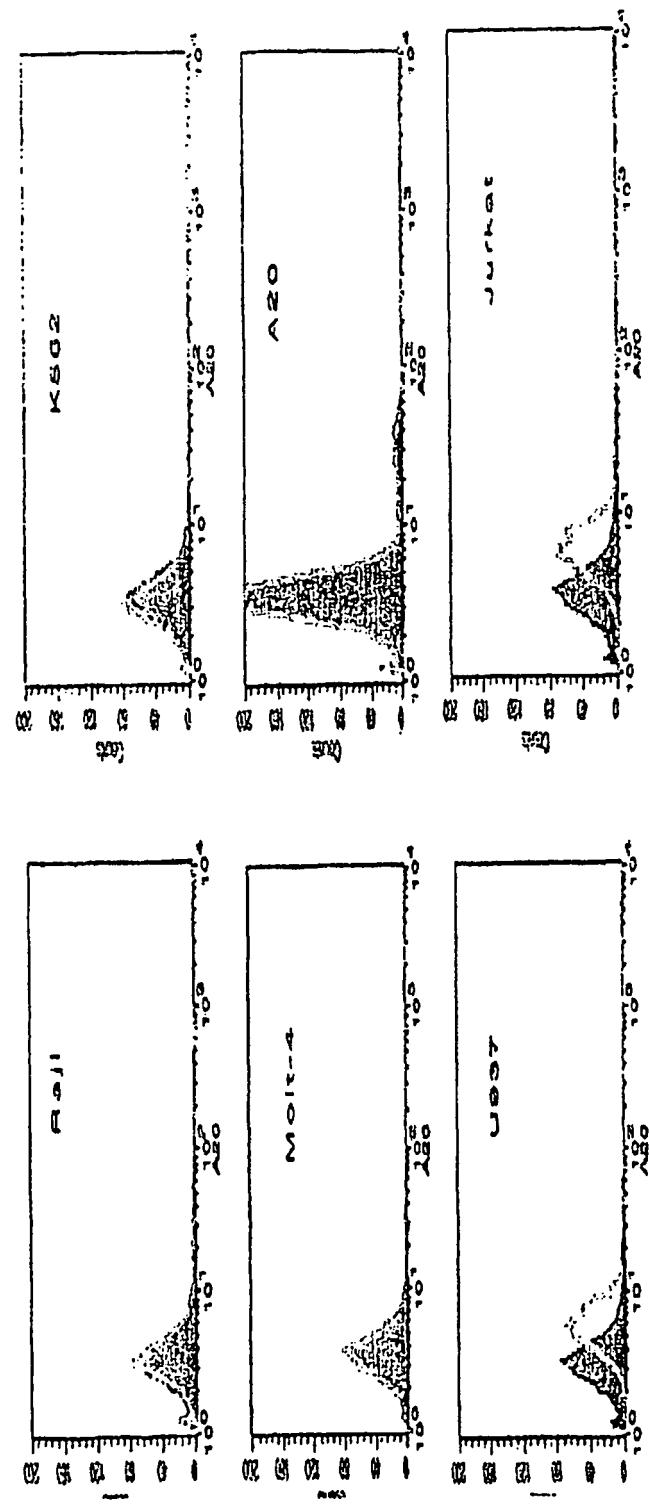


Figura 17

Unión de MK61-Fc con líneas de células T y monocíticas con y sin pretratamiento con gamma interferón, tal como se determinó mediante el análisis FACS

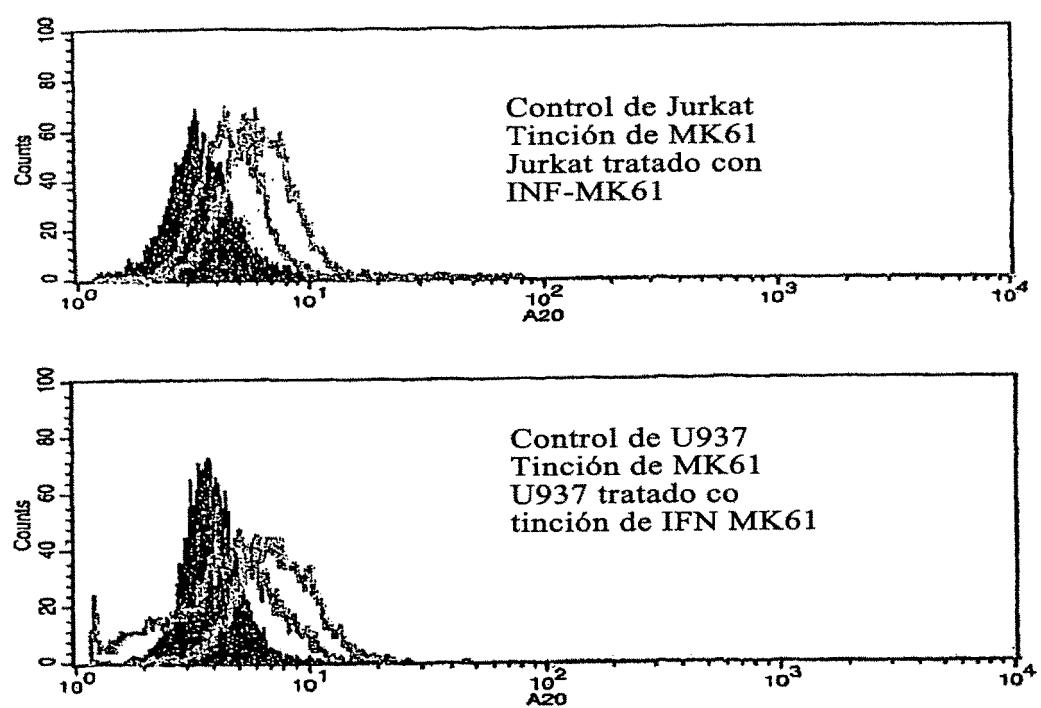


Figura 18

El efecto de MK61-Fc sobre LPS (150 ng/ml) indujo la producción de IgG e IgA en cultivos de esplenocitos de ratón

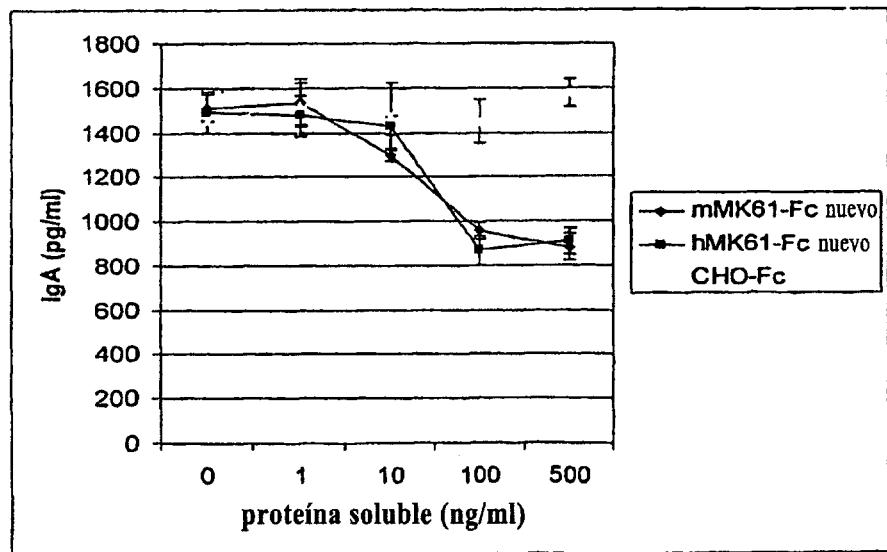
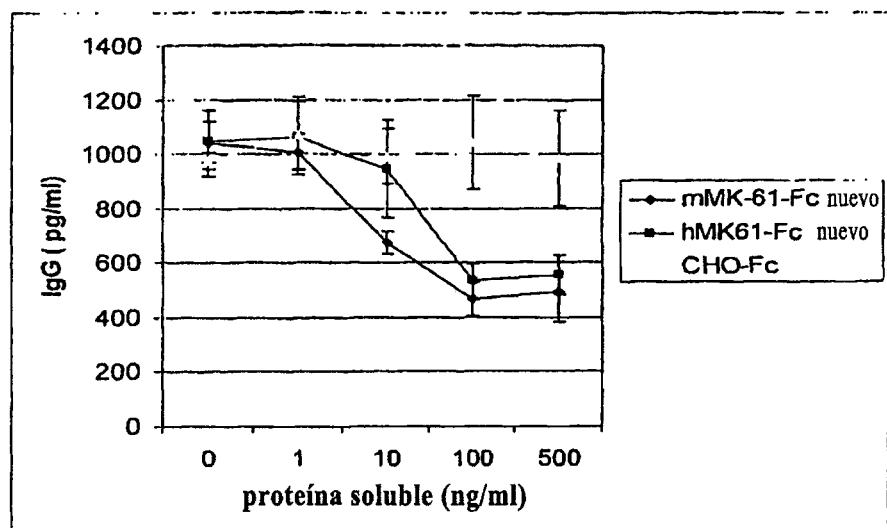


Figura 19

Efecto del tratamiento de MK61-Fc sobre los números de linfocitos *in vivo*

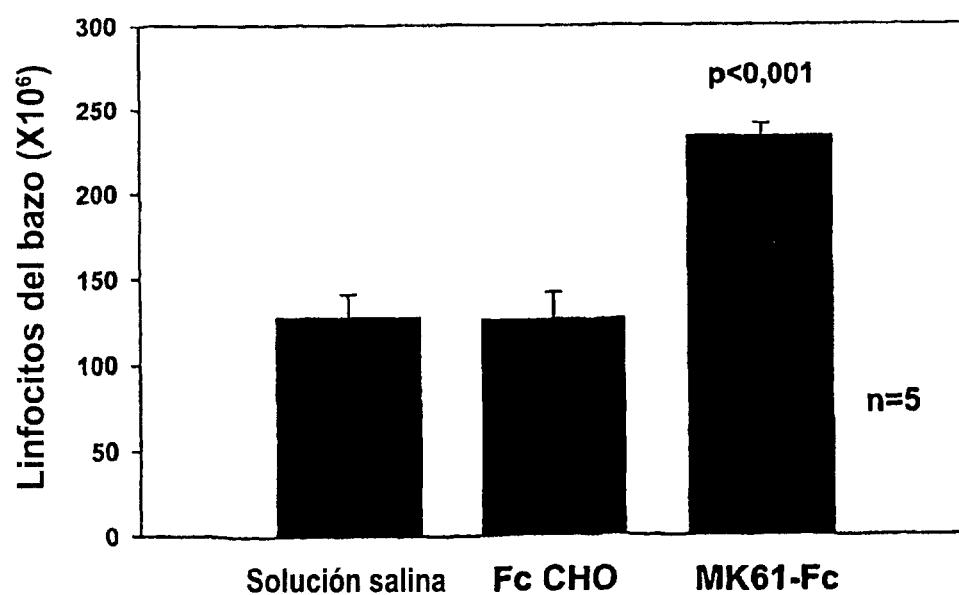
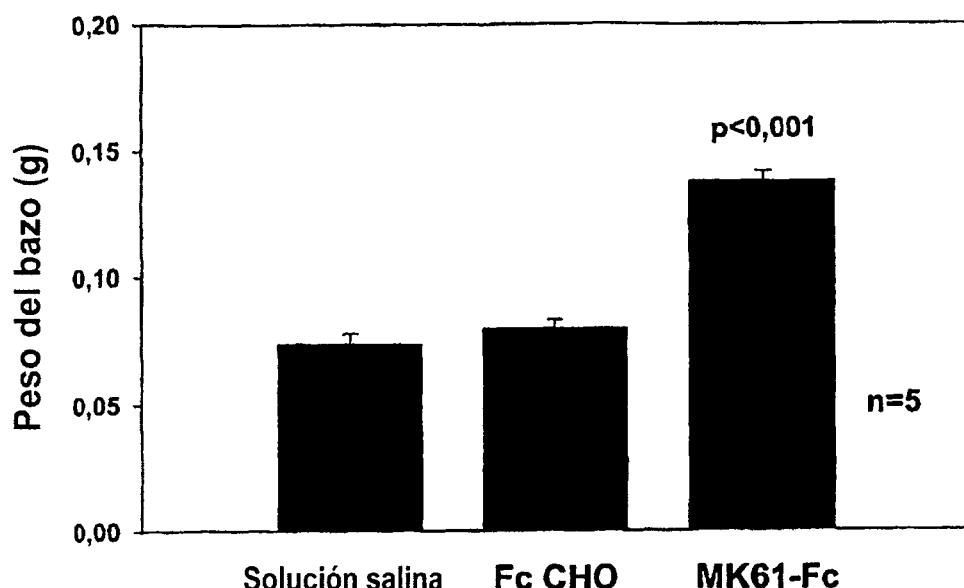


Figura 20

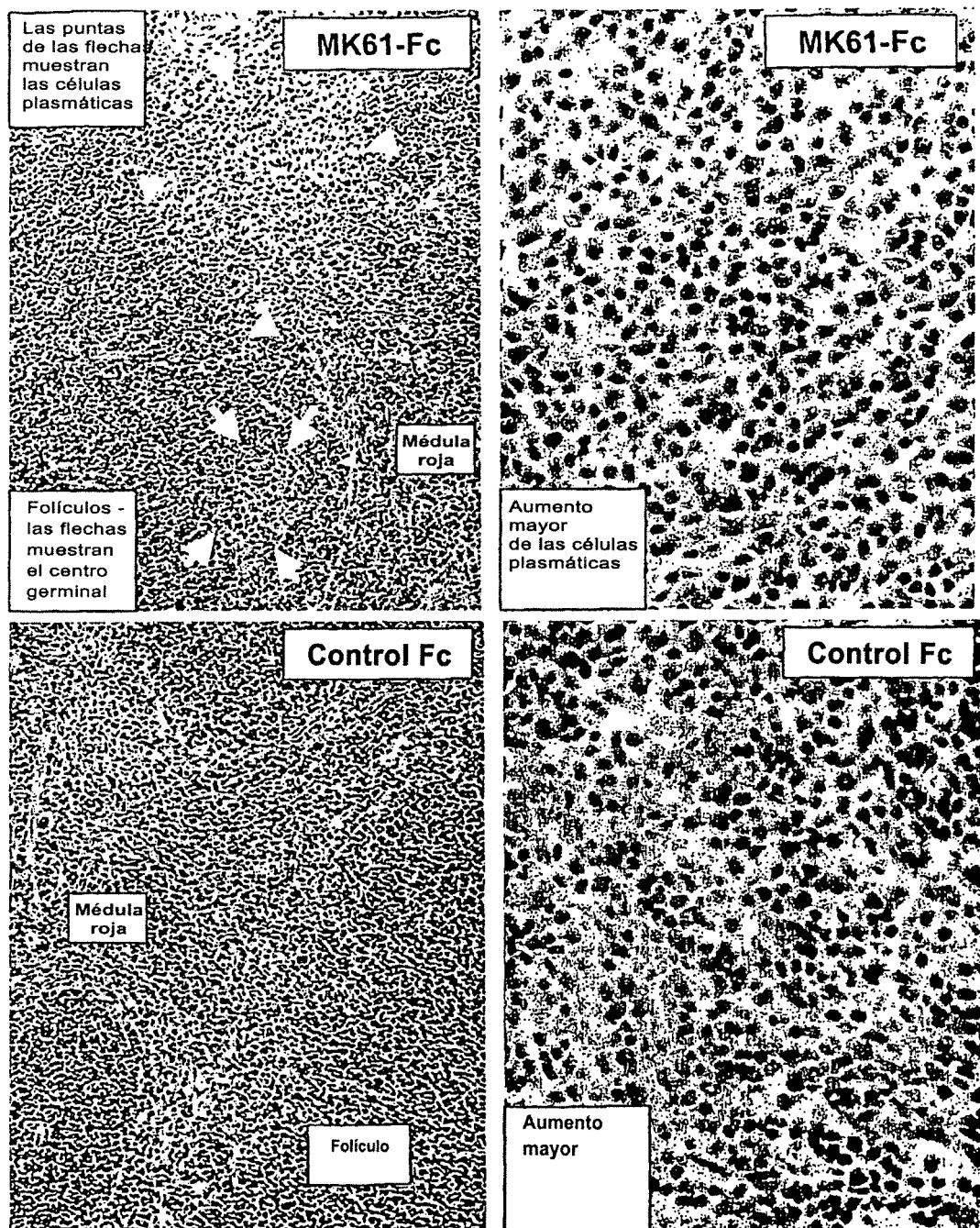
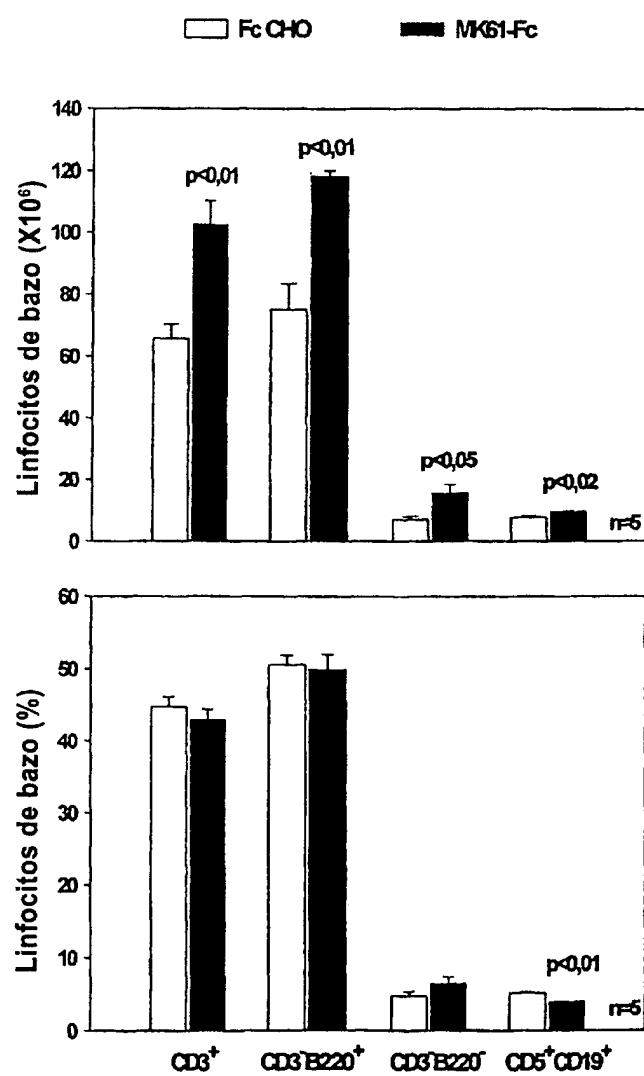


Figura 21  
Efecto del tratamiento de MK61-Fc sobre los números de células B y T de bazo *in vivo*



**Figura 22**  
**Efecto del tratamiento de MK61-Fc**  
**sobre los niveles de inmunoglobulina de plasma**

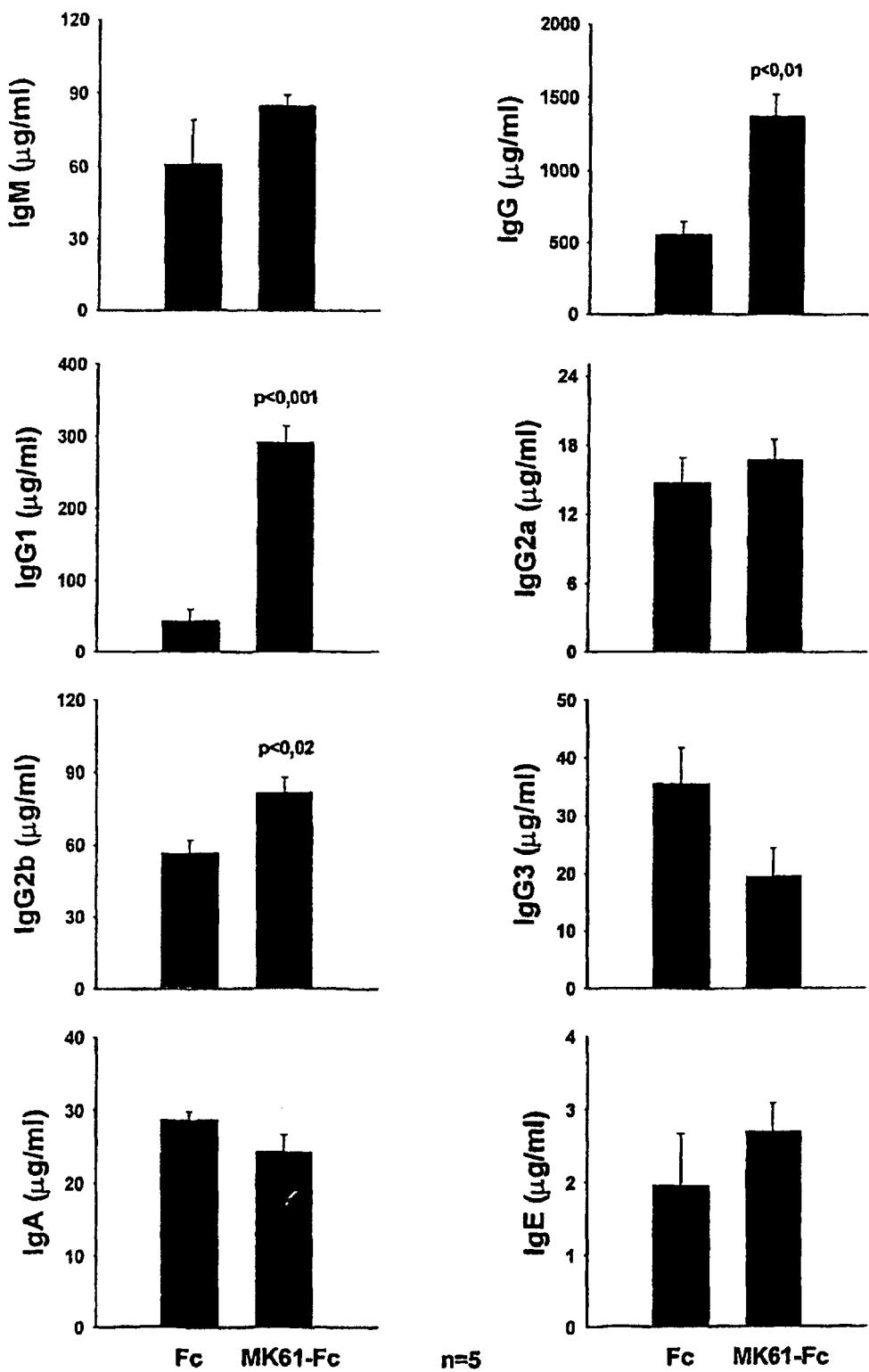
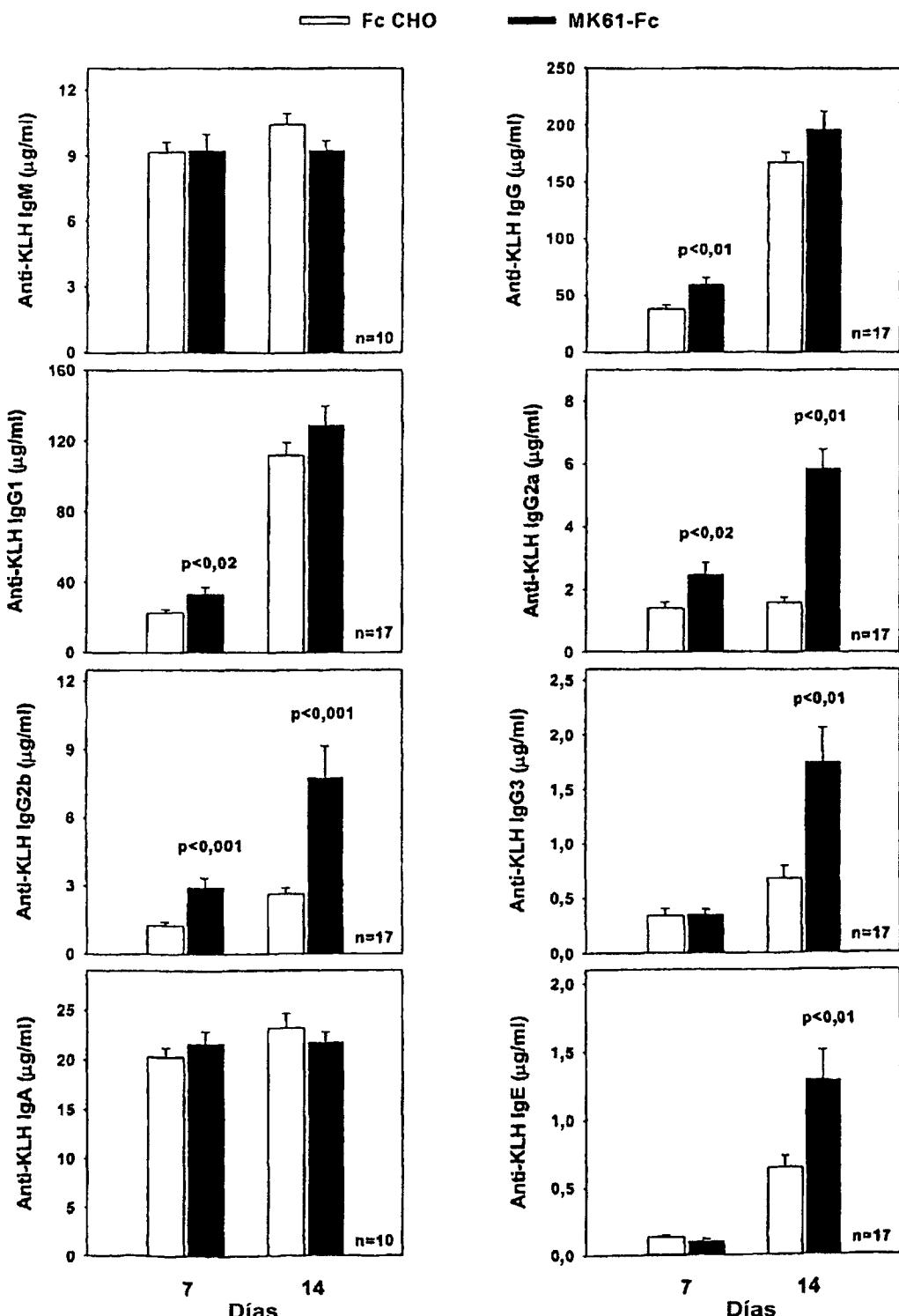


Figura 23  
**Efecto del tratamiento de MK61-Fc sobre la generación  
de anticuerpos anti-KLH específicos *in vivo***



**Figura 24**  
Secuencia de aminoácidos de MK61-deltaFc CHO humano

```

1 MGPGRCLLTA LLLLALAPP EASQYCGRL E YWNPDNKCCS SCLQRFGPPP
51 CPDYEFRENC GLNDHGDFVT PPFRKCSSGQ CNPDGAEILCS PCGGGAVTPT
101 PAAGGGRTPW RCRERPVPAK GHCPPLTPGNP GAPSSQERSS PASSIAWRTP
151 EPVDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPKPK KDTLMSRTP EVTCVVVDVS
201 HEDPEVKENW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
251 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
301 LVKGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
351 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

**Figura 25**  
Secuencia de aminoácidos de MK61-Fc CHO humano

```

1 MGPSWLLWTV AVAVLLTRA ASMEAASSFCG HLEYWNSDIKR CCSRCLQRFG
51 PPACPDHEFT ENCGIINDFGD TVAHPFKKCS PGYCNPNNGTE LCSQCSSGAA
101 AAPAHVESPG RTHKQCRKKP VPPKDVCPPLK PEDAGASSSP GRWSLQQTIK
151 NEVDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPKPK KDTLMSRTP EVTCVVVDVS
201 HEDPEVKENW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
251 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
301 LVKGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
351 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

```

# ES 2 327 102 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> AMGEN Inc

5 <120> MOLÉCULAS SIMILARES AL RECEPTOR DE TNF Y USOS DE LAS MISMAS

<130> 01017/37677

<150> US 60/230.191

<151> 09-05-2000

10 <160> 45

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

15 <211> 1668

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 1

gtaaagatgg ggtttcattt tgggtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg 60

25 atcctcctgt ctggccctcc caaaagtgttg ggattacagg catgagccac cacacccagc 120

ccctgcttta cttctaatga cggttctaat tctccacaat aaccctatga gacaggtgct 180

atcattgtct tatttttaggg atggaaaagg gagggtgggt gggtgaggac acggcagagg 240

30 tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtcccctag tggccttgc 300

ggcttcctcg ataaccggct cagttggggg atgagggctc ggggttagat tcccggttc 360

35 cgaagaggcg tgagaattct gttcccccac atcaccgcgt cttttttctt gcccatttc 420

cccgaaagt gtagcagagg cgctgtgttt ggaagtcccg ctatcacggc ccccccagatg 480

gggcctggac gatgcctcct gacggcccttg ttgcctctgg ccctggcgcc accgcccggaa 540

40 gcctcccaagt actgcggccg ctttgaatac tggAACCCAG acaacaagtg ctgcagcagc 600

tgcctgcaac gtttcgggcc gccccctgc ccggactatg agttccggga aaactgcgga 660

45

50

55

60

65

# ES 2 327 102 T3

	ctcaatgacc acggcgattt cgtaacgccc ccgttccgaa agtgttcttc tgggcagtgc	720
5	aaccccgacg ggcgcggagct atgttagcccc tgcggcggcg gagccgtgac ccctactccc	780
	gccgcggcg ggggcagaac cccgtggcgc tgcagagaga ggccggtccc tgccaagggg	840
10	cactgcccccc tcacacacctgg aaacccaggc gcccctagct cccaggagcg cagctcacca	900
	gcaagttcca ttgcctggag gaccctgag cctgtccctc agcaggcctg gccgaatttc	960
	cttccgctcg tggtgctggt cctgctcctg accttggcg tgatagcgat cctcctgttt	1020
15	attctgtctt ggcatctctg ctggcccaag gagaagccg acccctatcc ctatcctggc	1080
	ttggtctgctg gagtccccaa cacccacacc ctttcctctt cgcacatctgtc ctccccaggc	1140
	gccctggaga caggggacac atggaaggag gcctcaactac ttccactcct gagcagggaa	1200
20	ctgtccagtc tggcgtcaca acccctgtct cgcctcctgg atgagctgga ggtgctggaa	1260
	gagctgattt tactgctgga ccctgagct gggccagggtg ggggtatggc ccatggca	1320
	actcgacacc tggccgcaag atatggctg cctgctgcct ggtccaccc ttgcctattcg	1380
25	ctgaggccga gtcgctcgcc gctgcgggct ctgattgaga tggtggtggc aaggagccc	1440
	tctgcctccc tgggccagct tggcacacac ctcgcccagc tagggcgggc agatgcattt	1500
30	cgggtgtgtt ccaagcttgg ctcatctggg gttgctggg cttAACACCC aataaagaac	1560
	tttgctgact actaagccca gtatacaatt agcaactgaag tacttcttga agtacaatcc	1620
	taattggca aagacccaaac agatagcctc actgctcttc gcccctaga	1668

35

<210> 2  
 <211> 355  
 40 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 2

50

Met	Gly	Pro	Gly	Arg	Cys	Leu	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu
1				5					10					15	

55

Ala	Pro	Pro	Pro	Glu	Ala	Ser	Gln	Tyr	Cys	Gly	Arg	Leu	Glu	Tyr	Trp
20					25				30						

60

Asn	Pro	Asp	Asn	Lys	Cys	Cys	Ser	Ser	Cys	Leu	Gln	Arg	Phe	Gly	Pro
35					40				45						

Pro	Pro	Cys	Pro	Asp	Tyr	Glu	Phe	Arg	Glu	Asn	Cys	Gly	Leu	Asn	Asp
50					55				60						

65

ES 2 327 102 T3

His Gly Asp Phe Val Thr Pro Pro Phe Arg Lys Cys Ser Ser Gly Gln  
65 70 75 80

5 Cys Asn Pro Asp Gly Ala Glu Leu Cys Ser Pro Cys Gly Gly Ala  
85 90 95

10 Val Thr Pro Thr Pro Ala Ala Gly Gly Arg Thr Pro Trp Arg Cys  
100 105 110

15 Arg Glu Arg Pro Val Pro Ala Lys Gly His Cys Pro Leu Thr Pro Gly  
115 120 125

20 Asn Pro Gly Ala Pro Ser Ser Gln Glu Arg Ser Ser Pro Ala Ser Ser  
130 135 140

25 Ile Ala Trp Arg Thr Pro Glu Pro Val Pro Gln Gln Ala Trp Pro Asn  
145 150 155 160

30 Phe Leu Pro Leu Val Val Leu Val Leu Leu Leu Thr Leu Ala Val Ile  
165 170 175

35 Ala Ile Leu Leu Phe Ile Leu Leu Trp His Leu Cys Trp Pro Lys Glu  
180 185 190

40 Lys Ala Asp Pro Tyr Pro Tyr Pro Gly Leu Val Cys Gly Val Pro Asn  
195 200 205

45 Thr His Thr Pro Ser Ser His Leu Ser Ser Pro Gly Ala Leu Glu  
210 215 220

50 Thr Gly Asp Thr Trp Lys Glu Ala Ser Leu Leu Pro Leu Leu Ser Arg  
225 230 235 240

55 Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Arg Leu Leu Asp Glu  
245 250 255

55 Leu Glu Val Leu Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp Pro Glu Pro Gly  
260 265 270

60 Pro Gly Gly Gly Met Ala His Gly Thr Thr Arg His Leu Ala Ala Arg  
275 280 285

65 Tyr Gly Leu Pro Ala Ala Trp Ser Thr Phe Ala Tyr Ser Leu Arg Pro  
290 295 300

ES 2 327 102 T3

Ser Arg Ser Pro Leu Arg Ala Leu Ile Glu Met Val Val Ala Arg Glu  
 305 310 315 320

5 Pro Ser Ala Ser Leu Gly Gln Leu Gly Thr His Leu Ala Gln Leu Gly  
325 330 335

10 Arg Ala Asp Ala Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Gly Ser Ser Gly Val  
340 345 350

Cys Trp Ala  
15 355

20 <210> 3  
<211> 1525  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 3

30 gtaaaatgg ggtttcattt tttgtccag gctgatctct cgaactcccg ggctcaatgg 60  
atccctcctgt ctggccctcc caaagtgttg ggattacagg catgagccac cacacccagg 120  
ccctgctta ctctaatga cggttctaat tctccacaat aaccctatga gacaggtgt 180  
atcattgtct tatttttaggg atggaaaagg gagggtgggt gggtgaggac acggcagagg 240  
35 tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtcccctag tggccttgg 300  
ggcttctctg ataaccggct cagttggggg atgagggctc gggggtagat tcccggttc 360  
40 cgaagaggcg tgagaattct gttccccac atcaccggtt cttttttct gcccgatttc 420  
cccgaaaagt gtacgagagg cgctgtgtt ggaagtcccg ctatcacggc ccccccagatg 480  
ggcctggac gatgcctcct gacggccttg ttgtttctgg ccctggcgcc accggccggaa 540  
45 gcctccagt actgcggccg ctttgaatac tggaaacccag acaacaagtg ctgcagcagc 600  
tgccctgcaac gttcgggccc gccccctgc cgggtgaga atccgagacc gagccttgc 660  
tgggcggagc ttgcagagggc cggtccctgc caaggggcac tgccccctca cacctggaaa 720  
50 cccaggcgcc cctagctccc aggagcgcag ctcaccagca agttccattt cctggaggac 780  
ccctgagcct gtcctcagc aggccctggcc gaatttcctt ccgctcgtgg tgctggcct 840  
55 gtcctgacc ttggcggtga tagcgatctt cctgtttatt ctgctctggc atctctgt 900  
gccccaggag aaagccgacc cctatcccta tcctggcttg gtctgcccggag tccccaaacac 960  
60 ccacacccct tcctccctcgc atctgtccctc cccaggcgcc ctggagacag gggacacatg 1020  
gaaggaggcc tcactacttc cactccctgag cagggaaactg tccagttctgg cgttcacaacc 1080  
cctgtctcgc ctccctggatg agctggaggt gctggaaagag ctgattgtac tgctggacc 1140

ES 2 327 102 T3

5	tgagcctggg ccaggtgggg gatatggcca tggcactact cgacacactgg ccgcaagata	1200
	tgggctgcct gtcgcctggg ccaccccttc ctattcgctg aggccgagtc gtcgcgcgt	1260
	gcgggctctg attgagatgg tggtgccaaag ggagccctct gcctccctgg gccagcttgg	1320
	cacacaccc tc gcccagctag ggcgggcaga tgcattgcgg gtgctgtcca agcttggctc	1380
10	atctggggtt tgctgggctt aacacccaaat aaagaacttt gctgactact aagcccagta	1440
	tacaatttagc actgaagtac ttcttgaagt acaatcctaa ttgggcaaag acccaacaga	1500
	taqcctcaact qctttcqcc ctqa	1525

15

<210> 4

<211> 85

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

25

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu  
1 5 10 15

20

Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp  
 20 25 30

35

Asn Pro Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro  
35 40 45

40

Pro Pro Cys Pro Gly Glu Asn Pro Arg Pro Ser Leu Ala Trp Ala Glu  
50 55 60

40

Leu Ala Glu Ala Gly Pro Cys Gln Gly Ala Leu Pro Pro His Thr Trp  
 65 70 75 80

45

Lys Pro Arg Arg Pro

<210> 5

50 <211> 1289

<212> ADN

60

65

# ES 2 327 102 T3

<400> 5

5	gtaaagatgg ggtttcattt tgggtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg	60
	atcctcctgt ctggcctcc caaagtgttggattacagg catgagccac cacaccaggc	120
	ccctgctta cttctaatacggttctaaat tctccacaat aaccctatga gacaggtgt	180
10	atcatgtct tatttttaggg atggaaaagg gaggggtgggt gggtgaggac acggcagagg	240
	tgggatatgc attctgcaa tctagatccg cagccctgtt agtcccctag tggccttgc	300
	ggcttcctgt ataaccggct cagttggggg atgagggctc gggggtagat tcccgcttc	360
15	cgaagaggcg tgagaattct gttccccac atcaccgcgt ctttcttct gcccgttcc	420
	cccgaaaagt gtagcagagg cgctgtgtt ggaagtcccg ctatcacggc cccccagatg	480
	gggcctggac gatgcctctt gacggccttg ttgcttctgg ccctggcgcc accgcccggaa	540
20	gcctcccagt actgcggccg ctttgaatac tggaaacccag acaacaagtg ctgcagcgc	600
	tgcctgcaac gttcggggcc gccccctgc cggactatg agttccggga aaactgcgga	660
	ctcaatgacc acggcgattt cgtaacgccc cggccggaa agtgttcttc tggcagtgc	720
25	aaccccgacg gcgcggagct atgtagcccc tgcggcggcg gagccgtgac ccctactccc	780
	gccgcgggccc ggggcagaac cccgtggcgc tgcagagaga actgtccagt ctggcgtcac	840
30	aacccctgtc tgcctcttg gatgagctgg aggtgctgga agagctgatt gtactgctgg	900
	accctgagcc tggccaggt ggggtatgg cccatggcac tactcgacac ctggccgcaa	960
	gatatggct gctgctgcc tggtccacct ttgcctattc gctgaggccg agtcgctcgc	1020
35	cgctgcgggc tctgatttagt ggggtatgg caagggagcc ctctgcctcc ctggccagcc	1080
	ttggcacaca cctcgcccag cttagggcggg cagatgcatt gcgggtgctg tccaagcttg	1140
	gctcatctgg gtttgctgg gcttaacacc caataaaagaa ctttgctgac tactaagccc	1200
40	agtatacaat tagcactgaa gtacttcttg aagtacaatc ctaattggc aaagacccaa	1260
	cagatagctt cactgctttt cggccctaga	1289

45 <210> 6

<211> 136

<212> PRT

50 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

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

# ES 2 327 102 T3

Pro Pro Cys Pro Asp Tyr Glu Phe Arg Glu Asn Cys Gly Leu Asn Asp  
 50 55 60

5 His Gly Asp Phe Val Thr Pro Pro Phe Arg Lys Cys Ser Ser Gly Gln  
 65 70 75 80

10 Cys Asn Pro Asp Gly Ala Glu Leu Cys Ser Pro Cys Gly Gly Ala  
 85 90 95

15 Val Thr Pro Thr Pro Ala Ala Gly Gly Arg Thr Pro Trp Arg Cys  
 100 105 110

20 Arg Glu Asn Cys Pro Val Trp Arg His Asn Pro Cys Leu Ala Ser Trp  
 115 120 125

Met Ser Trp Arg Cys Trp Lys Ser  
 130 135

25 <210> 7

<211> 1164

<212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 7

35	gtaaagatgg ggtttcattt tgggtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg	60
	atccctctgt cttggcctcc caaagtgttgg ggttacagg catgagccac cacacccagc	120
40	ccctgcttta cttctaatga cggttctaat tctccacaat aaccctatga gacaggtgct	180
	atcattgtct tatttttaggg atggaaaagg gagggtgggt ggttggggac acggcagagg	240
	tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtcccctag tggccttgc	300
45	ggcttctctg ataaccggct cagtgggggg atgaggggctc ggggttagat tcccggttc	360
	cgaagaggcg tgagaattct gttcccccac atcaccggct cttttttctt gcccgtttc	420
	cccgaaaagt gtagcagagg cgctgtgttt ggaagtcccc ctatcacggc ccccccagatg	480
50	gggcctggac gatgcctcct gacggccttg ttgtttctgg ccctggcgcc accggccggaa	540
	gcctcccaatgt actgcggccg cttgaatac tggaaacccag acaacaagtg ctgcagcagc	600
	tgcctgcaac gtttcggggcc gccccctgc cggggcgccc tggagacagg ggacacatgg	660
55	aaggaggct cactacttcc actcctgagc agggaaactgt ccagtctggc gtcacaaccc	720
	ctgtctcgcc tccctggatga gctggaggtg ctggaaagagc tgattgtact gctggaccct	780
60	gagcctgggc caggtggggg tatggccat ggcactactc gacacctggc cgcaagatat	840
	gggctgcttg ctcgcctggc cacctttggcc tattcgctga ggccgagtcg ctcgcctggc	900

65

ES 2 327 102 T3

5 cgggctctga ttgagatgg ggtggcaagg gagccctctg cctccctggg ccagcttggc 960  
 acacacacctg cccagctagg gcgggcagat gcattgcggg tgctgtccaa gcttggctca 1020  
 tctgggttt gctgggctta acacccaata aagaactttg ctgactacta agcccagtat 1080  
 acaattagca ctgaagtact tcttgaagta caatcctaata tgggcaaaga cccaaacagat 1140  
 10 agcctcactg ctcttcgccc taga 1164

15 <210> 8  
 <211> 187  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 8

25 Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

30 Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp  
 20 25 30

35 Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro  
 35 40 45

40 Pro Pro Cys Pro Gly Ala Leu Glu Thr Gly Asp Thr Trp Lys Glu Ala  
 50 55 60

45 Ser Leu Leu Pro Leu Leu Ser Arg Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln  
 65 70 75 80

50 Pro Leu Ser Arg Leu Leu Asp Glu Leu Glu Val Leu Glu Leu Ile  
 85 90 95

55 Val Leu Leu Asp Pro Glu Pro Gly Pro Gly Gly Met Ala His Gly  
 100 105 110

60 Thr Thr Arg His Leu Ala Ala Arg Tyr Gly Leu Pro Ala Ala Trp Ser  
 115 120 125

65 Thr Phe Ala Tyr Ser Leu Arg Pro Ser Arg Ser Pro Leu Arg Ala Leu  
 130 135 140

70 Ile Glu Met Val Val Ala Arg Glu Pro Ser Ala Ser Leu Gly Gln Leu  
 145 150 155 160

75 Gly Thr His Leu Ala Gln Leu Gly Arg Ala Asp Ala Leu Arg Val Leu  
 165 170 175

80 Ser Lys Leu Gly Ser Ser Gly Val Cys Trp Ala  
 180 185

# ES 2 327 102 T3

<210> 9

<211> 1483

<212> ADN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

10	gtaaaagatgg ggtttcattt tgggtccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtg	60
	atcctcctgt cttggccctcc caaagtgttggattacagg catgagccac cacacccagc	120
	ccctgctta cttctaatacggttcaat tctccacaat aaccctatga gacaggtgct	180
15	atcattgtct tatttttaggg atggaaaagg gaggggtgggt gggtgaggac acggcagagg	240
	tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtcccctag tggccttgc	300
20	ggcttcctcg ataaccggct cagttggggg atgagggctc ggggttagat tcccgcttc	360
	cgaagaggcg tgagaattct gttccccac atcaccgcgt ctttcttct gcccgatttc	420
	cccgaaagt gtagcagagg cgctgtgtt ggaagtcccg ctatcacggc cccccagatg	480
25	gggcctggac gatgcctctt gacggccttgg ttgcttctgg ccctggcgcc accggcgaa	540
	gcctccagt actgcggccg ctttgaatac tggaaaccag acaacaagtg ctgcagcagc	600
30	tgcctgcaac gcttcgggccc gccccctgc ccggaggccg gtccctgcca aggggcactg	660
	ccccctcaca cctggaaacc caggcgcccc tagctccag gagcgcagct caccagcaag	720
	ttccattgcc tggaggaccc ctgagcctgt ccctcagcag gcctggccga atttccttcc	780
35	gctcgtggtg ctggtcctgc tcctgacctt ggcgggtata ggcgcctcc tggcttattct	840
	gcctggcat ctctgtggc ccaaggagaa agccgacccc tatccctatc ctggcttgg	900
40	ctgcggagtc cccaacacccc acacccttc ctccctgcac ctgcctccccc caggcgccct	960
	ggagacaggg gacacatgga aggaggctc actacttcca ctccctgagca gggactgtc	1020
	cagtctggcg tcacaacccc tgcctgcctt cctggatgag ctggaggtgc tggaaagagct	1080
45	gattgtactg ctggaccctg agcctgggccc aggtgggggt atggcccatg gcactactcg	1140
	acaccctggcc gcaagatatg ggctgcctgc tgcctggtcc acctttgcct attcgctgag	1200
	gcgcgcgc tcggccgtgc gggctctgat tgagatggtg gtggcaaggg agccctctgc	1260
50	ctccctgggc cagcttggca cacacctcgc ccagctaggg cgggcagatg cattgcgggt	1320
	gctgtccaag ctggctcat ctggggtttgc ctgggcttaa caccataaa agaactttgc	1380
55	tgactactaa gcccagttata caattagcac tgaagtactt cttgaagttac aatcctaatt	1440
	gggcaaagac ccaacagata gcctcactgc tcttcgcctt aga	1483

<210> 10

60 <211> 71

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

## ES 2 327 102 T3

&lt;400&gt; 10

5 Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

10 Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp  
 20 25 30

15 Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro  
 35 40 45

20 Pro Pro Cys Pro Glu Ala Gly Pro Cys Gln Gly Ala Leu Pro Pro His  
 50 55 60

25 Thr Trp Lys Pro Arg Arg Pro  
 65 70

&lt;210&gt; 11

25 &lt;211&gt; 1104

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

30 &lt;400&gt; 11

35	gtaaagatgg ggtttcattt tgggttccag gctgatctct cgaactcctg ggctcaagtq	60
	atcctcctgt cttggcctcc caaaagtgttggg ggattacagg catgagccac cacacccagc	120
	ccctgcttta cttctaatga cgggtctaat tctccacaat aaccctatga gacaggtgct	180
	atcattgtct tatttttaggg atggaaaaagg gaggggtgggt gggtgaggac acggcagagg	240
40	tgggatatgc attcttgcaa tctagatccg cagccctgtt agtcccctag tggccttgtg	300
	ggcttcctcg ataaccggct cagttggggg atgagggctc ggggttagat tcccggttc	360
	cgaagaggcg tgagaattct gttccccac atcaccgcgt cctttctct gcccatttc	420
45	cccgaaagt gtagcagagg cgctgtgtt ggaagtcccgtatcacggc cccccagatg	480
	gggcctggac gatgcctcct gacggccctg ttgcttctgg ccctggcgcc accgcccggaa	540
	gcctccagt actgcggccg ctttgaatac tggaaaccag acaacaagtgc ctgcagcagc	600
50	tgcctgcaac gtttcgggccc gccccctgc cggaaactgt ccagtctggc gtcacaaccc	660
	ctgtctcgcc tcttggatga gctggaggtg ctgaaagagc tgattgtact gctggaccct	720
55	gagcctggc caggtggggg tatggccat ggcactactc gacacctggc cgcaagatat	780
	gggctgcctg ctgcctggtc caccttgc tattcgctga ggccgagtcg ctgcggctg	840
60	cgggctctga ttgagatgg ggtggcaagg gagccctctg cctccctggg ccagcttggc	900
	acacacctcg cccagctagg gcgggcagat gcattgcggg tgctgtccaa gcttggctca	960
	tctggggttt gctggctta acacccaata aagaactttg ctgactacta agcccaagat	1020
65	acaatttagca ctgaagtact tcttgaagta caatcctaat tgggcaaaga cccaaacagat	1080
	agcctcaactg ctottcgccc taga	1104

ES 2 327 102 T3

<210> 12

<211> 167

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

10 Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu  
1 5 10 15

15 Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp  
20 25 30

20 Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro  
35 40 45

Pro Pro Cys Pro Glu Leu Ser Ser Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Arg  
50 55 60

25 Leu Leu Asp Glu Leu Glu Val Leu Glu Leu Ile Val Leu Leu Asp  
65 70 75 80

30 Pro Glu Pro Gly Pro Gly Gly Met Ala His Gly Thr Thr Arg His  
85 90 95

35 Leu Ala Ala Arg Tyr Gly Leu Pro Ala Ala Trp Ser Thr Phe Ala Tyr  
100 105 110

40 Ser Leu Arg Pro Ser Arg Ser Pro Leu Arg Ala Leu Ile Glu Met Val  
115 120 125

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

45 Ala Gln Leu Gly Arg Ala Asp Ala Leu Arg Val Leu Ser Lys Leu Gly  
145 150 155 160

50 Ser Ser Gly Val Cys Trp Ala  
165

<210> 13

55 <211> 1202

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

60

65

# ES 2 327 102 T3

<400> 13

	cggacgcgtg ggccggacgcg tgggtgggtc tgcactgaaa cagtgtgggt ggaagtggtc	60
5	acagccctca agctgcaggc tctgctgaga tggggcccag ctggcttctc tggacagtgg	120
	cggtggcagt gctgctcctg acccgggctg cgtcaatgga agcctctagc ttctgtggcc	180
10	acctttagta ctggaactct gacaagaggt gctgcagccg ctgcctgcaa cgctttggc	240
	ctcctgcatg tcctgatcac gagttcacgg aaaactgcgg gctcaatgac ttccggcgata	300
	ctgttagcaca tcctttcaaa aagtgttccc ctgggttattg caaccccaat ggcacagagc	360
15	tgtgtagcca gtgttagcagc ggagccgcgg cagccccagc tcacgtggag agccctggta	420
	gaacccacaa gcagtgtaga aagaagcccg tccctccaa ggatgtctgt cctcttaaac	480
20	ctgaagacgc aggtgcctct agtcacccctg ggaggtggag cttggcag acaaccaaga	540
	atgaggtctc cagccgacca ggtttgtct cagcctcagt gctgcctctg gcagtgttgc	600
	cactgttgct ggtgctgctt ctgatattgg cagttggctt gctctctttt ttcaagagaa	660
25	aagtccgttc ccgtcctgggt tccagctcag cttttggaga tcccagcacc tctctacatt	720
	actggccctg cccaggtacc ctggaggtat tggaaagtag aaacagaggg aaagctaatac	780
	tgctgcagct ctcaagctgg gagcttcagg gtctggcctc tcagccctc tccctcctgc	840
30	tggatgagct ggaagttctg gaggagctga ttatgctatt ggaccctgag cctggccgaa	900
	gcgggagcac ggctttaggt accacacgac acctggctgc aagatacggg ctgcctgc	960
35	cctggtctac cttcgccctac tcacttcggc ccagtcgctc acccctgcgg gccctgattt	1020
	agatggtgtt ggcaagggag ctttctgcta ctctgggtca attcggcaca tatttggctc	1080
	agcttaggtcg cacagatgct ctgcaggtgc tatctaaact tggctgagtc agagtttgct	1140
40	ggggcttact actccatcaa taaagttcc cttgaagcca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1200
	aa	1202

45 <210> 14

<211> 345

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

50

55

60

65

ES 2 327 102 T3

<400> 14

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

10 Leu Thr Arg Ala Ala Ser Met Glu Ala Ser Ser Phe Cys Gly His Leu  
20 25 30

15 Glu Tyr Trp Asn Ser Asp Lys Arg Cys Cys Ser Arg Cys Leu Gln Arg  
35 40 45

20 Phe Gly Pro Pro Ala Cys Pro Asp His Glu Phe Thr Glu Asn Cys Gly  
50 55 60

25 Leu Asn Asp Phe Gly Asp Thr Val Ala His Pro Phe Lys Lys Cys Ser  
65 70 75 80

30 Pro Gly Tyr Cys Asn Pro Asn Gly Thr Glu Leu Cys Ser Gln Cys Ser  
85 90 95

35 Ser Gly Ala Ala Ala Ala Pro Ala His Val Glu Ser Pro Gly Arg Thr  
100 105 110

40 His Lys Gln Cys Arg Lys Lys Pro Val Pro Pro Lys Asp Val Cys Pro  
115 120 125

45 Leu Lys Pro Glu Asp Ala Gly Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Trp Ser  
130 135 140

50 Leu Gly Gln Thr Thr Lys Asn Glu Val Ser Ser Arg Pro Gly Phe Val  
145 150 155 160

55 Ser Ala Ser Val Leu Pro Leu Ala Val Leu Pro Leu Leu Leu Val Leu  
165 170 175

60

65

# ES 2 327 102 T3

Leu Leu Ile Leu Ala Val Val Leu Leu Ser Leu Phe Lys Arg Lys Val	180	190
5		
Arg Ser Arg Pro Gly Ser Ser Ser Ala Phe Gly Asp Pro Ser Thr Ser	195	200
10		
Leu His Tyr Trp Pro Cys Pro Gly Thr Leu Glu Val Leu Glu Ser Arg	210	215
15		
Asn Arg Gly Lys Ala Asn Leu Leu Gln Leu Ser Ser Trp Glu Leu Gln	225	230
20		
Gly Leu Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Leu Asp Glu Leu Glu Val	245	250
25		
Leu Glu Glu Leu Ile Met Leu Leu Asp Pro Glu Pro Gly Pro Ser Gly	260	265
30		
Ser Thr Ala Tyr Gly Thr Thr Arg His Leu Ala Ala Arg Tyr Gly Leu	275	280
35		
Pro Ala Thr Trp Ser Thr Phe Ala Tyr Ser Leu Arg Pro Ser Arg Ser	290	295
40		
305 Pro Leu Arg Ala Leu Ile Glu Met Val Val Ala Arg Glu Pro Ser Ala	310	315
45		
325 Thr Leu Gly Gln Phe Gly Thr Tyr Leu Ala Gln Leu Gly Arg Thr Asp	330	335
50		
340 Ala Leu Gln Val Leu Ser Lys Leu Gly	345	
55		
<210> 15		
<211> 1229		
50 <212> ADN		
<213> <i>Mus musculus</i>		
<400> 15		
60		
ccaccatggg gcccagctgg cttctctgga cagtggcggt ggcagtgcgt ctccctgaccc		60
60 gggctgcgtc aatggaagcc tctagctct gtggccacct tgagtactgg aactctgaca		120
agaggtgctg cagccgctgc ctgcaacgct ttgggcctcc tgcatgtcct gatcacgagt		180

# ES 2 327 102 T3

	tcacggaaaa ctgcgggctc aatgacttcg gcgatactgt agcacatcct ttcaaaaagt	240
5	gttccctgg gtattgcaac cccaatggca cagagctgtg tagccagtgt agcagcggag	300
	ccgcccccgc cccagctcac gtggagagcc ctggtagaaac ccacaaggag ttagaaaaaga	360
	agccccgtccc tcccaaggat gtctgtcctc ttaaacctga agacgcaggt gcctctagct	420
10	cacctgggag gtggagccctt gggcagacaa ccaagaatga ggtcgccc gctcgtcgtg	480
	catcagtaga gccccaaatct tggacaaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg	540
	aactccctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga	600
15	tctcccgac ccctgaggc acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa gaccctgagg	660
	tcaagttcaa ctggtagctg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg	720
20	aggaggcata caacagcactg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact	780
	ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg	840
	agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc	900
25	catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct	960
	atcccaagcga catcgccgtg gagtggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga	1020
	ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttttcctt ctacagcaag ctcaccgtgg	1080
30	acaagagcag gtggcagcag gggAACGTCT tctcatgtct cgtgatgtcat gaggtctgc	1140
	acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tggctccggg taaaagaaga gctagtctcc	1200
35	atcatcatca tcatcattga taagtcgac	1229

<210> 16

<211> 404

40 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

45 <400> 16

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

Leu	Thr	Arg	Ala	Ala	Ser	Met	Glu	Ala	Ser	Ser	Phe	Cys	Gly	His	Leu	
									20		25		30			

Glu	Tyr	Trp	Asn	Ser	Asp	Lys	Arg	Cys	Cys	Ser	Arg	Cys	Leu	Gln	Arg	
									35		40		45			

Phe	Gly	Pro	Pro	Ala	Cys	Pro	Asp	His	Glu	Phe	Thr	Glu	Asn	Cys	Gly	
									50		55		60			

# ES 2 327 102 T3

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

ES 2 327 102 T3

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
325 330 335

5 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
340 345 350

10 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
355 360 365

15 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
370 375 380

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Arg Arg Ala Ser Leu His His  
385 390 395 400

20 His His His His

25 <210> 17

<211> 110

<212> PRT

30 <213> *Mus musculus*

<400> 17

35 Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Gln Leu Pro Ala Pro Leu Leu  
1 5 10 15

40 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

45 Ser Arg Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Leu Ser Ser Lys Cys Thr Pro Thr  
50 55 60

50 Ser Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Thr  
65 70 75 80

55 Trp Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Ala Gly  
85 90 95

60 Lys Ala Leu Val Ala Val Asp Pro Gly Asn His Thr Ala Pro  
100 105 110

<210> 18

<211> 204

65 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

## ES 2 327 102 T3

&lt;400&gt; 18

5	Met Leu Trp Ile Trp Ala Val Leu Pro Leu Val Leu Ala Gly Ser Gln 1                   5                   10                   15
10	Leu Arg Val His Thr Gln Gly Thr Asn Ser Ile Ser Glu Ser Leu Lys 20                   25                   30
15	Leu Arg Arg Arg Val His Glu Thr Asp Lys Asn Cys Ser Glu Gly Leu 35                   40                   45
20	Tyr Gln Gly Gly Pro Phe Cys Cys Gln Pro Cys Gln Pro Gly Lys Lys 50                   55                   60
25	Lys Val Glu Asp Cys Lys Met Asn Gly Gly Thr Pro Thr Cys Ala Pro 65                   70                   75                   80
30	Cys Thr Glu Gly Lys Glu Tyr Met Asp Lys Asn His Tyr Ala Asp Lys 85                   90                   95
35	Cys Arg Arg Cys Thr Leu Cys Asp Glu Glu His Gly Leu Glu Val Glu 100                   105                   110
40	Thr Asn Cys Thr Leu Thr Gln Asn Thr Lys Cys Lys Cys Lys Pro Asp 115                   120                   125
45	Phe Tyr Cys Asp Ser Pro Gly Cys Glu His Cys Val Arg Cys Ala Ser 130                   135                   140
50	Cys Glu His Gly Thr Leu Glu Pro Cys Thr Ala Thr Ser Asn Thr Asn 145                   150                   155                   160
55	Cys Arg Lys Gln Ser Pro Arg Asn Arg Leu Trp Leu Leu Thr Ile Leu 165                   170                   175
60	Val Leu Leu Ile Pro Leu Val Phe Ile Tyr Arg Lys Tyr Arg Lys Arg 180                   185                   190
	Lys Cys Trp Lys Arg Arg Gln Asp Asp Pro Glu Ser 195                   200
	<210> 19
	<211> 257
	<212> PRT
	<213> <i>Mus musculus</i>

## ES 2 327 102 T3

&lt;400&gt; 19

5  
 Glu His Trp Asn Tyr Leu Thr Ile Cys Gln Leu Cys Arg Pro Cys Asp  
 1 5 10 15

10  
 Pro Val Met Gly Leu Glu Glu Ile Ala Pro Cys Thr Ser Lys Arg Lys  
 20 25 30

15  
 Thr Gln Cys Arg Cys Gln Pro Gly Met Phe Cys Ala Ala Trp Ala Leu  
 35 40 45

20  
 Glu Cys Thr His Cys Glu Leu Leu Ser Asp Cys Pro Pro Gly Thr Glu  
 50 55 60

25  
 Ala Glu Leu Lys Asp Glu Val Gly Lys Gly Asn Asn His Cys Val Pro  
 65 70 75 80

30  
 Cys Lys Ala Gly His Phe Gln Asn Thr Ser Ser Pro Ser Ala Arg Cys  
 85 90 95

35  
 Gln Pro His Thr Arg Cys Glu Asn Gln Gly Leu Val Glu Ala Ala Pro  
 100 105 110

40  
 Gly Thr Ala Gln Ser Asp Thr Thr Cys Lys Asn Pro Leu Glu Pro Leu  
 115 120 125

45  
 Pro Pro Glu Met Ser Gly Thr Met Leu Met Leu Ala Val Leu Leu Pro  
 130 135 140

50  
 Leu Ala Phe Phe Leu Leu Ala Thr Val Phe Ser Cys Ile Trp Lys  
 145 150 155 160

55  
 Ser His Pro Ser Leu Cys Arg Lys Leu Gly Ser Leu Leu Lys Arg Arg  
 165 170 175

60  
 Pro Gln Gly Glu Gly Pro Asn Pro Val Ala Gly Ser Trp Glu Pro Pro  
 180 185 190

65  
 Lys Ala His Pro Tyr Phe Pro Asp Leu Val Gln Pro Leu Leu Pro Ile  
 195 200 205

70  
 Ser Gly Asp Val Ser Pro Val Ser Thr Gly Leu Pro Ala Ala Pro Val  
 210 215 220

75  
 Leu Glu Ala Gly Val Pro Gln Gln Ser Pro Leu Asp Leu Thr Arg  
 225 230 235 240

80  
 Glu Pro Gln Leu Glu Pro Gly Glu Gln Ser Gln Val Ala His Gly Thr  
 245 250 255

85  
 Asn

ES 2 327 102 T3

<210> 20  
<211> 25  
<212> ADN  
5 <213> cebador

<400> 20

10 ggtgaccacc tcgtggcaa cgtct 25

<210> 21  
<211> 25  
15 <212> ADN  
<213> cebador

<400> 21

20 ggctcagggt ccagcagta aatca 25

<210> 22  
25 <211> 11  
<212> PRT  
<213> Péptido de la proteína TAT de VIH

30 <400> 22

35           **Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg**  
              1                           5                           10

<210> 23  
<211> 24  
40 <212> ADN  
<213> cebador

<400> 23

45            cgacgcgtg ggcggacgct tggg 24

<210> 24  
50 <211> 24  
<212> ADN  
<213> cebador

55 <400> 24

60            agcaaactct gactcagccaa agtt 24

<210> 25  
<211> 16  
<212> PRT  
65 <213> *Homo sapiens*



# ES 2 327 102 T3

	<400> 31	
	acatgtgtga gttttgtcac caccaccacc accattcggc caggcctgct g	51
5	<210> 32	
	<211> 51	
	<212> ADN	
10	<213> cebador	
	<400> 32	
15	cagcaggcct ggccgaatgg tggtggtgg ggtgacaaaa ctcacacatg t	51
	<210> 33	
	<211> 39	
20	<212> ADN	
	<213> cebador	
	<400> 33	
25	ccgcggatcc tcgagttatt taccggaga cagggagag	39
	<210> 34	
30	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> cebador	
35	<400> 34	
	cagcccaagc tttagaccac catggggcct ggacgatgc	39
40	<210> 35	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> cebador	
45	<400> 35	
	caggtcgaca ggctcagggg tcct	24
50	<210> 36	
	<211> 380	
	<212> PRT	
55	<213> <i>Homo sapiens</i>	

60

65

ES 2 327 102 T3

<400> 36

Met Gly Pro Gly Arg Cys Leu Leu Thr Ala Leu Leu Leu Leu Ala Leu  
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Pro Glu Ala Ser Gln Tyr Cys Gly Arg Leu Glu Tyr Trp  
 20 25 30

10

Asn Pro Asp Asn Lys Cys Cys Ser Ser Cys Leu Gln Arg Phe Gly Pro  
 35 40 45

15

Pro Pro Cys Pro Asp Tyr Glu Phe Arg Glu Asn Cys Gly Leu Asn Asp  
 50 55 60

20

His Gly Asp Phe Val Thr Pro Pro Phe Arg Lys Cys Ser Ser Gly Gln  
 65 70 75 80

25

Cys Asn Pro Asp Gly Ala Glu Leu Cys Ser Pro Cys Gly Gly Gly Ala  
 85 90 95

30

Val Thr Pro Thr Pro Ala Ala Gly Gly Arg Thr Pro Trp Arg Cys  
 100 105 110

35

Arg Glu Arg Pro Val Pro Ala Lys Gly His Cys Pro Leu Thr Pro Gly  
 115 120 125

40

Asn Pro Gly Ala Pro Ser Ser Gln Glu Arg Ser Ser Pro Ala Ser Ser  
 130 135 140

45

Ile Ala Trp Arg Thr Pro Glu Pro Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 145 150 155 160

50

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 165 170 175

55

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
 180 185 190

60

65

# ES 2 327 102 T3

10	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	205
	195	200
15	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	220
	210	215
20	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	240
	225	230
25	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	255
	245	250
30	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	270
	260	265
35	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	285
	275	280
40	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	300
	290	295
45	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	320
	305	310
50	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	335
	325	330
55	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	350
	340	345
60	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	365
	355	360
65	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	380
	370	375
70	<210> 37	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> cebador	
75	<400> 37	
80	cagcccaagc ttagaccac catggggccc agctggctt	39
	<210> 38	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> cebador	

# ES 2 327 102 T3

<400> 38

caggtcgacc tcattttgg ttgt

24

5 <210> 39  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 10 <213> *Mus musculus*

<400> 39

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

20 Leu Thr Arg Ala Ala Ser Met Glu Ala Ser Ser Phe Cys Gly His Leu  
 20 25 30

25 Glu Tyr Trp Asn Ser Asp Lys Arg Cys Cys Ser Arg Cys Leu Gln Arg  
 35 40 45

30 Phe Gly Pro Pro Ala Cys Pro Asp His Glu Phe Thr Glu Asn Cys Gly  
 50 55 60

35 Leu Asn Asp Phe Gly Asp Thr Val Ala His Pro Phe Lys Lys Cys Ser  
 65 70 75 80

40 Pro Gly Tyr Cys Asn Pro Asn Gly Thr Glu Leu Cys Ser Gln Cys Ser  
 85 90 95

45 Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala His Val Glu Ser Pro Gly Arg Thr  
 100 105 110

50 His Lys Gln Cys Arg Lys Lys Pro Val Pro Pro Lys Asp Val Cys Pro  
 115 120 125

55 Leu Lys Pro Glu Asp Ala Gly Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Trp Ser  
 130 135 140

60 Leu Gly Gln Thr Thr Lys Asn Glu Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
 145 150 155 160

55

60

65

# ES 2 327 102 T3

5	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe	165	170	175	
10	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val	180	185	190	
15	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe	195	200	205	
20	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro	210	215	220	
25	Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr	225	230	235	240
30	Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val	245	250	255	
35	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala	260	265	270	
40	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg	275	280	285	
45	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly	290	295	300	
50	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro	305	310	315	320
55	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser	325	330	335	
60	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln	340	345	350	
65	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His	355	360	365	
	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	370	375	380	
	<210> 40				
	<211> 26				
60	<212> ADN				
	<213> cebador				
	<400> 40				
65	ttcccagttt ttcatctgca ctgccca				

## ES 2 327 102 T3

<210> 41  
<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> cebador  
  
<400> 41  
  
10 tgctggaccc aacacaaatg 20  
  
<210> 42  
<211> 20  
15 <212> ADN  
<213> cebador  
  
<400> 42  
20 tgccatccaa ccactcagtc 20  
  
<210> 43  
25 <211> 22  
<212> ADN  
<213> cebador  
  
30 <400> 43  
  
ctgcctgctg cctggtccac ct 22  
  
35 <210> 44  
<211> 20  
<212> ADN  
40 <213> cebador  
  
<400> 44  
  
45 acacacctggcc gcaagatatg 20  
  
<210> 45  
<211> 20  
50 <212> ADN  
<213> Cebador  
  
<400> 45  
  
55 gactcggcct cagcgaatag 20  
  
60  
  
65