



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 325 165**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05025531 .4**

(96) Fecha de presentación : **14.12.1999**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1690871**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

(54) Título: **Polipéptidos y DNA de Xrec2.**

(30) Prioridad: **14.12.1998 US 112163 P**
10.11.1999 US 164675 P

(73) Titular/es: **Immunex Corporation**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.08.2009

(72) Inventor/es: **Sims, John E.;**
Smith, Dirk E. y
Born, Teresa L.

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.08.2009

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

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos y DNA de Xrec2.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La invención está orientada a nuevos polipéptidos purificados y aislados Xrec2 y fragmentos de los mismos, los ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos, procesos para producción de formas recombinantes de tales polipéptidos, anticuerpos generados contra estos polipéptidos, péptidos fragmentados derivados de estos polipéptidos, y usos de los mismos.

15 Descripción de la técnica afín

La interleuquina-1 (IL-1) es un miembro de un gran grupo de citoquinas cuya función primaria es mediar las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Existen cinco miembros conocidos de la familia IL-1, que incluyen IL-1 alfa (IL-1 α), IL-1 beta (IL-1 β), antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra), IL-1 delta (IL-1 δ como se describe en WO 99/35268), e IL-18 (conocido previamente como IGIF y a veces IL-1 gamma). La IL-1 que es secretada por los macrófagos es realmente una mezcla de principalmente IL-1 β y algo de IL-1 α (Abbas *et al.*, 1994). IL-1 α e IL-1 β , que son producidos primeramente como precursores de 33 kD que carecen de una secuencia señal, son procesados ulteriormente por escisión proteolítica para producir formas activas secretadas, de aproximadamente 17 kD cada una. Adicionalmente, el precursor de 33 kD de IL-1 α es también activo. Ambas formas de IL-1 son los productos de dos genes diferentes localizados en el cromosoma 2. Aunque las dos formas tienen entre sí una homología menor que 30 por ciento, ambas se fijan a los mismos receptores y tienen actividades similares.

La familia IL-1 de ligandos se fija a un receptor común compuesto de una cadena de fijación de ligando, el receptor de IL-1 tipo I (IL-1RI), y un componente de señalización requerido, la proteína accesoria (AcP) IL-1R (Sims *et al.*, 1988; Greenfeder *et al.*, 1995; Cullinan *et al.*, 1998). Un receptor de IL-1 tipo II (IL-1RII) fija y secuestra el agonista de IL-1 (especialmente IL-1 β) sin inducir respuesta alguna de señalización de sí mismo (McMahan *et al.*, 1991; Sims *et al.*, 1993; Colotta *et al.*, 1993; Colotta *et al.*, 1994). Los ligandos de IL-1 pueden fijarse también a un fragmento proteolítico soluble de IL-1RII (sIL-1RII) (Colotta *et al.*, 1993).

IL-1ra, una forma biológicamente inactiva de IL-1, es estructuralmente homóloga a IL-1. IL-1ra se produce con una secuencia señal que permite la secreción eficiente en la región extracelular (Abbas *et al.*, 1994). Adicionalmente, IL-1ra se fija al receptor de IL-1 tipo I pero falla en cuanto a la producción de la interacción subsiguiente con AcP. Así, IL-1ra bloquea IL-1RI e impide la acción del agonista de IL-1 (Hannum *et al.*, 1990; Eisenberg *et al.*, 1990).

La fuente principal de IL-1 es el macrófago o fagocito mononuclear activado. Otras células que producen IL-1 incluyen células epiteliales y endoteliales (Abbas *et al.*, 1994). La secreción de IL-1 por los macrófagos ocurre después que el macrófago encuentra e ingiere bacterias gram-negativas. Tales bacterias contienen moléculas de lipopolisacárido (LPS), conocidas también como endotoxina, en la pared de la célula bacteriana. Las moléculas LPS son los componentes activos que estimulan los macrófagos a producir factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-1. En este caso, IL-1 se produce en respuesta a la producción de LPS y TNF. A concentraciones bajas, LPS estimula los macrófagos y activa las células B y otras respuestas del hospedador necesarias para eliminar la infección bacteriana; en cambio, a concentraciones elevadas, LPS puede causar deterioro grave de los tejidos, choque, e incluso la muerte.

Las funciones biológicas de IL-1 incluyen activación de las células endoteliales vasculares y los linfocitos, destrucción de tejido local, y fiebre (Janeway *et al.*, 1996). A niveles bajos, IL-1 estimula los macrófagos y las células endoteliales vasculares para producir IL-6, regula en sentido creciente moléculas en la superficie de las células endoteliales vasculares a aumentar la adhesión de los leucocitos, y activa indirectamente los leucocitos inflamatorios por estimulación de los fagocitos mononucleares y otras células producir ciertas quimioquinas que activan los leucocitos inflamatorios. Adicionalmente, IL-1 está implicada en otras respuestas inflamatorias tales como la inducción de prostaglandinas, la sintetasa del óxido nítrico, y metaloproteínasas. Estas funciones de IL-1 son cruciales durante las infecciones microbianas de nivel bajo. No obstante, si la infección microbiana aumenta de escala, IL-1 actúa sistémicamente por inducción de fiebre, estimulación de los fagocitos mononucleares a producir IL-1 e IL-6, aumento de la producción de proteínas del suero por los hepatocitos, y activación del sistema de coagulación. Adicionalmente, IL-1 no causa necrosis hemorrágica de los tumores, suprime la división de las células madre de la médula ósea, e IL-1 es letal para los humanos a concentraciones altas.

Dada la importante función de IL-1, existe necesidad de identificar miembros adicionales de la familia de ligandos de IL-1 y la familia de receptores de IL-1. Adicionalmente, teniendo en cuenta el interés continuo en la investigación de proteínas y en el sistema inmunitario, el descubrimiento, la identificación, y los papeles de nuevas proteínas y sus inhibidores, se encuentran en la vanguardia de la biología molecular y la bioquímica modernas. A pesar del acervo creciente de conocimiento, existe todavía necesidad en la técnica de descubrir la identidad y función de las proteínas implicadas en las respuestas celulares e inmunológicas.

ES 2 325 165 T3

En otro aspecto, la identificación de la estructura primaria, o secuencia, de una proteína desconocida, es la culminación de un proceso arduo de experimentación. A fin de identificar una proteína desconocida, el investigador puede basarse en una comparación de la proteína desconocida con péptidos conocidos utilizando una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las proteínas se analizan rutinariamente utilizando técnicas tales como electroforesis, sedimentación, cromatografía, secuenciación y espectrometría de masas.

En particular, la naturaleza singular de la composición de una proteína con relación a sus aminoácidos específicos constituyentes da como resultado un posicionamiento singular de sitios de escisión dentro de la proteína. La fragmentación específica de una proteína por escisión química o enzimática da como resultado una "huella dactilar peptídica" singular (D. W. Cleveland *et al.*, *J. Biol. Chem.* 252: 1102-1106, 1977; M. Brown *et al.*, *J. Gen. Virol.* 50: 309-316, 1980). Por consiguiente, la escisión en sitios específicos da como resultado una fragmentación reproducible de una proteína dada en péptidos de pesos moleculares precisos. Adicionalmente, estos péptidos poseen características singulares de carga que determinan el pH isoelectrónico del péptido. Estas características singulares pueden aprovecharse utilizando una diversidad de técnicas electroforéticas y de otros tipos (Brock *et al.*, *Biology of Microorganisms*, pp. 76-77, Prentice Hall, 6^a edición, 1991).

La fragmentación de las proteínas se emplea adicionalmente para análisis de la composición de aminoácidos y secuenciación de las proteínas (P. Matsudiara, *J. Biol. Chem.* 262: 10035-10038, 1987; C. Eckerskorn *et al.*, *Electrophoresis* 9: 830-838, 1988), particularmente la producción de fragmentos de proteínas con un término N "bloqueado". Adicionalmente, las proteínas fragmentadas pueden utilizarse para inmunización, para selección de afinidad (R.A. Brown, Patente U.S. No. 5.151.412), para determinación de sitios de modificación (v.g. fosforilación), para generación de compuestos biológicos activos (Brock *et al.*, *Biology of Microorganisms*, pp. 300-301, Prentice Hall, 6^a edición, 1991), y para diferenciación de propiedades homólogas (M. Brown *et al.*, *J. Gen. Virol.* 50: 309-316, 1980).

Adicionalmente, cuando se obtiene una huella dactilar peptídica de una proteína desconocida, la misma pueda compararse con una base de datos de proteínas conocidas para ayudar a la identificación de la proteína desconocida utilizando espectrometría de masas (W.J. Henzel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5011-5015, 1993; D. Fenyo *et al.*, *Electrophoresis* 19:998-1005, 1998). Una diversidad de programas de software de ordenador para facilitar estas comparaciones están accesibles en Internet, tales como Protein Prospector (sitio de Internet: prospector.usc.edu), Multi-Ident (sitio de Internet: www.expasy.ch/sprot/multiident.html), PeptideSearch (Internet sitio: www.mann.embl-heidelberg.de...deSearch(FR._PeptideSearch Form.html), y ProFound (sitio de Internet: www.chait-sgi.rochester.edu/cgi-bin/protid-frag.html). Estos programas permiten al usuario especificar el agente de escisión y los pesos moleculares de los péptidos fragmentados dentro de una tolerancia especificada. Los programas comparan estos pesos moleculares con información de pesos moleculares de proteínas almacenados en bases de datos para facilitar la determinación de la identidad de la proteína desconocida. Para una identificación exacta se requiere información exacta concerniente al número de péptidos fragmentados y el peso molecular preciso de dichos péptidos. Por consiguiente, el aumento de la exactitud en la determinación del número de péptidos fragmentados y su peso molecular debería dar como resultado una mayor probabilidad de éxito en la identificación de las proteínas desconocidas.

Adicionalmente, productos de digestión de proteínas desconocidas pueden secuenciarse utilizando espectrometría de masas en tandem (MS/MS) e investigarse la secuencia resultante contra bases de datos (J.K. Eng *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spec.* 5:976-989, 1994; M. Mann *et al.*, *Anal. Chem.* 66:4390-4399, 1994; J.A. Taylor *et al.*, *Rapid Comm. Mass Spec.* 11:1067-1075, 1997). Programas de búsqueda que pueden utilizarse en este proceso existen en Internet, tales como Lutefisk 97 (sitio de Internet: www.lsbc.com:70/Lutefisk97.html), y los programas Protein Prospector, Peptide Search y ProFound arriba descritos. Por consiguiente, la adición de la secuencia de un gen y su secuencia predicha de proteínas y fragmentos peptídicos a una base de datos de secuencias puede contribuir a la identificación de proteínas desconocidas utilizando espectrometría de masas en tandem.

Así pues, existe también necesidad en la técnica de polipéptidos adecuados para uso en estudios de fragmentación de péptidos, para uso en determinaciones de peso molecular, y para uso en secuenciación de proteínas utilizando espectrometría de masas en tandem.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico aisladas y polipéptidos codificados por las moléculas de ácido nucleico para un receptor de la familia de IL-1 denominado "Xrec2". Así, en un aspecto, la invención está dirigida a una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo constituido por:

- (a) la secuencia de DNA de SEQ ID NO: 2;
- (b) una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4; y
- (c) una molécula de ácido nucleico aislada degenerada de SEQ ID NO: 2 como resultado del código genético.

ES 2 325 165 T3

La invención proporciona también un vector recombinante que dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico de la invención, y una célula hospedadora transfectada o transducida con un vector de este tipo. Se proporciona también un polipéptido aislado codificado por la molécula de ácido nucleico de la invención, que puede encontrarse en forma no glicosilada. La invención proporciona también un oligómero que comprende un polipéptido de la invención.

5 Se proporciona también un anticuerpo aislado que se fija a un polipéptido de la invención, que puede ser un anticuerpo monoclonal.

10 La invención proporciona adicionalmente un método para la producción de un polipéptido Xrec2 que comprende cultivar una célula hospedadora de la invención en condiciones que promueven la expresión, y recuperar el polipéptido del medio de cultivo. Están abarcadas por la invención moléculas de ácido nucleico monocatenarias y bicatenarias tanto de RNA como de DNA. Los ácidos nucleicos arriba indicados pueden utilizarse para identificar ácidos nucleicos que codifican proteínas que tienen actividades asociadas con ligandos y receptores de la familia IL-1. Así, la molécula de 15 ácido nucleico de Xrec2 puede utilizarse para identificar el ligando Xrec2.

Adicionalmente, estos ácidos nucleicos pueden utilizarse para identificar los cromosomas humanos con los cuales 20 están asociados los ácidos nucleicos. Así, los ácidos nucleicos de Xrec2 pueden utilizarse para identificar el cromosoma X humano. De acuerdo con ello, estos ácidos nucleicos pueden utilizarse también para mapear genes en el cromosoma X humano; para identificar genes asociados con ciertas enfermedades, síndromes, u otras afecciones 25 humanas asociadas con el cromosoma X humano; y para estudiar la transducción de señales celulares y el sistema inmunitario.

25 Pueden utilizarse oligonucleótidos sentido o antisentido de los ácidos nucleicos de SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 y 7 para inhibir la expresión del polinucleótido respectivo codificado por los ácidos nucleicos.

La invención comprende adicionalmente métodos para la producción de un polipéptido Xrec, que comprenden cultivar una célula hospedadora de la invención en condiciones que promueven la expresión, y recuperar el polipéptido del medio de cultivo. Especialmente la expresión de estos polipéptidos en bacterias, levaduras, plantas, insectos, y 30 células animales está abarcada en la invención.

En general, los polipéptidos de la invención pueden utilizarse para estudiar procesos celulares tales como regulación inmunitaria, proliferación celular, muerte celular, migración celular, interacción célula-célula, y respuestas inflamatorias. Adicionalmente, estos polipéptidos pueden utilizarse para identificar proteínas asociadas con receptores 35 de Xrec2.

Por otra parte, estos polipéptidos pueden utilizarse en ensayos para cribado de inhibidores potenciales de la actividad asociada con moléculas polipeptídicas contraestructura, y como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades mediadas por moléculas polipeptídicas contraestructura. Adicionalmente, estos polipéptidos pueden 40 utilizarse en el diseño de inhibidores (v.g., receptores modificados por ingeniería genética que actúan como inhibidores) de los mismos.

Las secuencias de ácido nucleico de Xrec2, secuencias de aminoácidos predichas del polipéptido o fragmentos 45 de las mismas, o una combinación de las secuencias predichas de aminoácidos del polipéptido de fragmentos de las mismas pueden utilizarse en investigación de una base de datos electrónica para ayudar a la identificación de ácidos nucleicos muestra y/o proteínas. Los polipéptidos descritos en esta memoria pueden utilizarse como controles para establecer la extensión de la fragmentación de las proteínas.

Anticuerpos policlónicos o monoclonales aislados que se fijan a estos polipéptidos están abarcados también por 50 la invención. Estos anticuerpos pueden utilizarse para contribuir a la purificación de los polipéptidos de la invención.

Breve descripción de las figuras

55 La Figura 1 representa diagramáticamente la estructura genómica del locus IL-1 zeta.

La Figura 2 representa un modelo molecular que muestra la estructura secundaria de IL-1 zeta, en la cual las cadenas β se representan en amarillo, indicándose su dirección por la punta de flecha; las vueltas β se muestran en color azul; y las espirales se muestran en color verde. La estructura de IL-1 zeta se presenta en dos vistas diferentes.

ES 2 325 165 T3

Descripción detallada de la invención

Las moléculas de ácido nucleico descritas en esta memoria incluyen las secuencias de nucleótidos siguientes:

5 Nombre: IL-1 zeta (no abarcada en la invención)

1 ATGTCAGGCT GTGATAGGAG GGAAACAGAA ACCAAAGGAA AGAACAGCTT
51 TAAGAAGCGC TTAAAGGGTC CAAAGGTGAA GAACTTAAC CGAAAGAAAT
10 101 TCAGCATTC A TGACCAGGAT CACAAAGTAC TGGTCCTGGA CTCTGGGAT
151 CTCATAGCAG TTCCAGATAA AACTACATA CGCCCAGAGA TCTTCTTGC
201 ATTAGCCTCA TCTTGAGCT CAGCCTCTGC GGAGAAAGGA AGTCOGATTC
251 TCCCTGGGGT CTCTAAAGGG GAGTTTGTG TCTACTGTGA CAAGGATAAA
301 GGACAAAGTC ATCCATCCCT TCAGCTGAAAG AAGGAGAAAC TGATGAAGCT
351 GGCTGCCCCA AAOGAATCAG CACGCCGCC CTTCATCTTT TATAGGGCTC
401 AGGTGGGCTC CTGGAACATG CTGGAGTCGG CGGCTCACCC CGGATGGTTC
451 ATCTGCACCT CCTGCAATTG TAATGAGCCT GTTGGGGTGA CAGATAAATT
501 TGAGAACAGG AAACACATTG AATTTTCATT TCAACCAGTT TGCAAAGCTG
551 AAAATGAGCCC CAGTGAGGTC AGCGATTAG (SEQ ID NO:1)

30

Nombre: Xrec2

1 ATGAAAGCTC CGATTOCACA CTTGATTCTC TTATACGCTA CTTTACTCA
51 GAGTTTGAAG GTTGTGACCA AAAGAGGCTC CGCCGATGGA TOCACTGACT
101 GGTCTATCGA TATCAAGAAA TATCAAGTTT TGGTGGGAGA GCCTGTTGCA
151 ATCAAATGTG CACTCTTTA TGGTTATATC AGAACAAATT ACTCCCTTGC
201 CCAAAGTGT GGACTCAGTT TGATGTGGTA CAAAGTTCT GGTCCCTGGAG
251 ACTTTGAAGA GCCAAATGCC TTTGACGGAA GTAGAATGAG CAAAGAAGAA
301 GACTCCATTG GTTCCCGGCC AACATTGCTA CAGGACAGTG GTCTCTACCC
351 CTGTTGTCATC AGAAACTCCA CTTACTGTAT GAAAGTATCC ATCTCACTGA
401 CAGTGGGTGA AAAATGACAT GGACTCTGCT ATAATTCCAA GATGAAGTAT
451 TTTGAAAAAG CTGAACCTAG CAAAGCAAG GAAATTTCAT GCGGTGACAT
501 AGAGGATTTT CTACTGCCAA CCAGAGAACG TGAAATCCTT TGGTACAAGG
551 AATGCAAGGAC AAAAACATGG AGGCCAAGTA TTGTATTCAA AAGAGATACT
601 CTGCTTAA GAGAAGTCAG AGAAGATGAC ATTGGAAATT ATACCTGTGA
651 ATTAAAATAT GGAGGCTTGT TTGTGAGAAG AACTACTGAA TTAACTGTTA
701 CAGCCCTCT GACTGATAG CCACCCAAAGC TTTGTATCC TATGGAAAGT
751 AAACTGACRA TTCAGGAGAC CCAGCTGGGT GACTCTGCTA ATCTAACCTG
801 CAGAGCTTTC TTTGGGTACA CGGGAGATGT CAGTCCTITA ATTACTGGA
851 TGAAGGAGA AAAATTATT GAAGATCTG ATGAAAATCG AGTTGGGAA

50

55

60

65

ES 2 325 165 T3

901 AGTGACRTTA GAATTCTTAA GGAGCATCTT GGGGAACAGG AAGTTCCAT
 951 CTCATTAATT GTGGACTCTG TGGAAAGAAGG TGACTTGAAA AATTACTCCT
 1001 GTTATGTTGA AAATGGAAT GGACGTGGAC ACGCCAGCGT TCTCCCTCAT
 1051 AAACGAGAGC TAATGTACAC AGTGGAACTT GCTGGAGGCC TTGGTGCTAT
 1101 ACTCTTGCTG CTGTTATGTT TGGTGACCAT CTACAAGTGT TACAAGATAG
 1151 AAATCATGCT CTTCTACAGG AATCATTTTG GAGCTGAAGA GCTCGATGGA
 1201 GACAATAAAG ATTATGATGC ATACTTATCA TACACCAAAG TGGATCCTGA
 1251 CCAGTGGAAAT CAAGAGACTG GGGAGAAAGA ACGTTTGCC CTTGAATCC
 1301 TACCTGATAT GCTTGAAAG CATTATGGAT AATAGTTGTT TATACCAAGAT
 1351 AGAGATTTAA TCCCCTACTGG AACATACATT GAAGATGTGG CAGATGTGT
 1401 AGATCAAAGC AAGCGGCTGA TTATGTCAT GACCCCCAAT TACGTAGTTA
 1451 GAAAGGGCTG GAGCATCTT GAGCTGGAAA CCAGACTTCG AATATGCTT
 1501 GTGACTGGAG AAATTAAGT GTTCTTAATT GAATGCAGTG AACTGAGAGG
 1551 AATTATGAAAC TACCAAGGAGG TGGAGGGCCT GAAGCACACC ATCAAGCTCC
 1601 TGACGGTCAT TAAATGGCAT GGACCAAAAT GCAACAGTT GAACTCCAAG
 1651 TTCTGGAAC GTTTACAGTA TGAATGCCT TTTAAGAGGA TAGAACCCAT
 1701 TACACATGAG CAGGCCTTAG ATGTCAGTGA GCAAGGGCCT TTTGGGGAGC
 1751 TGCAGACTGT CTGGGOCATT TCCATGGCCG CGGCCACCTC CACAGCTCTA
 1801 GCCRCTGCCCT ATCCAGATCT CGTTCTTACCC TTTCACAAACA CGTACCCATTC
 1851 ACAAAATGCCT CAGAAACACT ACTACCGAAG CTATGAGTAC GACGTACCTC
 1901 CTACCGGCAC CCTGCCCTTT ACCTCCATAG GCAATCAGCA TACCTACTGT
 1951 AACATCCCTA TGACACTCAT CAGGGGAGG CGGCCACAGA CAAAATCGAG
 2001 CAGGGAGCAG AATCCAGATG AGGCCACAC AACACAGTGCCT ATCTGCCGC
 2051 TGTGCCCCAG GAGACCCAGT ATATCCAGTG TGATATGGTG A (SEQ ID NO:2)

40 Nombre: TDZ.1 (no abarcada en la invención)

1 ATGTCTTTG TGGGGAGAA CTCAGGAGTG AAAATGGGCT CTGAGGACTG
 51 GGAAAAAGAT GAACCCAGT GCTCTTAAAGA AGACCCGGCT GTAAGCCCCC
 101 TGGAAACCAAG CCCAACCTC CCCACCATGA ATTTTGTCA CACAGTCAC
 151 AAGGTGAAGA ACTTAAACCC GAAGAAATTC AGCAATGAG ACCAGGATCA
 201 CAAAGTACTG GTCTGGACT CTGGGAATCT CATAGCAGTT CGAGATAAAA
 251 ACTACATAAG CCGAGAGATC TTCTTGCTAT TAGCCTCATC CTTGAGCTCA
 301 GCCTCTGGGG AGAAAGGAAG TCCGATTCTC CTGGGGGTCT CTAAAGGGGA
 351 GTTTTGTCTC TACTGTGACA AGGATAAAGG ACAAAGTCAT CCATCCCTTC
 401 AGCTGAGAA GGAGAAACTG ATGAGCTGG CTGCCAAAAA GGAATCMGR
 451 CGCCCGGCCCT TCATCTTTA TAGGGCTCAAG GTGGGCTCCT GGAACATGCT
 501 GGAGTCGGCG GCTCACCCCG GATGGTTCTAT CTGCACCTCC TGGAAATTGTA
 551 ATGAGGCTGT TGGGGTGACA GATAAATTG AGAACGGAA ACACATTGAA
 601 TTTTCAATTG AACCAGTTTG CAAAGCTGAA ATGAGGCCCA GTGAGGTCAG
 651 CGATTAAG (SEQ ID NO:5)

ES 2 325 165 T3

Nombre: TDZ.2 (no abarcada en la invención)

5 1 ATGTCCTTGT TGGGGGAGAA CTCAGGAGTG AAAATGGGCT CTGAGGACTG
51 GGAAAAAAGAT GAACCCCGAT GCTGCTTACA AGGTCCAAAC GTGAGAGAACT
101 TAACCCGAA GAAATTCAAGC ATTCAATGACC AGGATCACAA ATTAATGGTC
151 CTGGACTCTG GGAATCTCAT AGCAGTTCCA GATAAAAAT ACATAACCCC
201 AGAGATCTTC TTTCATTTAG CCTCATCCCT GAGCTCMGCC TCTGCAGGAGA
251 AAGGAAGTCC GATTCTCCTG GGGGTCTCTA AAGGGGAGTT TTGTCCTAC
301 TGTGACAAGG ATAAGGACA AAGTCATCCA TCCCTTCAGC TGAAAGAAGGA
351 GAAACTGATG AAGCTGGCTG CCCAAAAGGA ATCAGCAAGC CGGCCCTICA
401 TCTTTTATAG GGCTCAGGTG GGCTCCTOGA ACATGCTGGA GTGGGGGGCT
451 CACCCCGGAT GGTCATCTG CACCTCCTGC AATTGTAATG AGCTGTTGG
501 GGTGACAGAT AAATTGAGA ACAGGAACCA CATTGAATT TCATTTAAC
551 CAGTTTGCAA AGCTGAAATG AGCCCCAGTG AGGTCAAGGA TTAG (SEQ ID NO:6)

25

Nombre: TDZ.3 (no abarcada en la invención)

30 1 ATGTCCTTGT TGGGGGAGAA CTCAGGAGTG AAAATGGGCT CTGAGGACTG
51 GGAAAAAAGAT GAACCCCGAT GCTGCTTACA AGAGATCTTC TTTCATTTAG
101 CCTCATCCCT GAGCTCAGCC TCTGCGGAGA AAGGAAGTCC GATTCTCCTG
151 GGGGTCTCTA AAGGGGAGTT TTGTCCTAC TGTGACAAGG ATAAGGACA
201 AAGTCATCCA TCCCTTCAGC TGAAGAAGGA GAAACTGATG AAGCTGGCTG
251 CCCAAAAGGA ATCAGCAAGC CGGCCCTICA TCTTTTATAG GGCTCAGGTG
301 GGCTCCTGGA ACATGCTGGA GTGGGGGGCT CACCCCGGAT GGTCATCTG
351 CACCTCCTGC AATTGTAATG AGCTGTTGG GGTGACAGAT AAATTGAGA
401 ACAGGAACCA CATTGAATT TCATTTAAC CAGTTTGCAA AGCTGAAATG
451 AGCCCCAGTG AGGTCAAGGA TTAG (SEQ ID NO:7)

50

Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos codificados por la secuencia de nucleótidos descrita en esta memoria incluyen:

Nombre: IL-1 zeta (polipéptido) (no abarcada en la invención)

55

1 MSGCDRRETE TKGIKNSFKIR LRGPKVKNLN PKKFSIHDQD HKVLVLDSGN
51 LIAVPDKNYI RPEIFFALAS SLSSASAEGK SPILLGVSKG EFCLYCIDKDK
101 GQSRPSLQLK KEKLNLAAQ KESIARRPFTW YRAQVGSTWM LESAAHPGNF
151 ICTSCMCMEP VGVTDKFENR KHIEFSPPQPV CKAEMLSPSEV SD+ (SEQ ID NO:3)

65

ES 2 325 165 T3

Nombre: Xrec2 (polipéptido)

5 1 MKAPIPELIL LYATPTQSLK VVTKRGSADG CTDWSIDIKK YQVLVGEFVR
 51 IKCALFYGYI RTMYSLAQSA GLSLMNYKSS GPGDFEEPIA FDGSRMSKEE
10 101 DSIWFPTLL QDSGLYACVI RNSTYCHKVS ISLTVGENDT GLCYMSRMKY
 151 FEKAELSKSK EISCRDIEDF LLPTEPREPIL NYKBCRTKRW RPSIVFKRDT
 201 LLIREVREDD IGHYTCELYK GGFVVVRRTTE LIVTAPLTDK PPKELLYPMES
 251 KLTIQETQLG DSANLTCAFP FGYSGDVSPL IYMMKGERPI EDLDENRVWB
15 301 SDIRILKEHL GEQEVSISLI VDSVEBGDLG NYSCYVENGN GRRHASVILLE
 351 KRELWITVEL AGGLGAILLL LVCLVTTTYKC YKIEIMLFYR NHFGAEELDG
20 401 DNKDYDAYLS YTIVOPDQWM QETGEERFA LEILPDMLEK HMGYKLFIKD
 451 RDLIPTGTYYI EDVARCVDQS KRLITVMTPN YVVRGGWSIF ELETBLRNML
 501 VTGEIKVILI ECSELRGIMI YQEVEALIHT IKLLTVIWH GPKCNKLNSK
 551 FWKRLQYEMP FKRIEPITHE QALDVSEQGP FGELOQTVAI SMAAATSTAL
60 601 ATAHPOLRST FHNTYHSQMR QKHYYRSYEV DVPPTGTLPL TSIGNQHTYC
 651 NIPMTLINGQ RPQTCKSSREQ NFDEAHNSA ILPLLPRETS ISSVIW* (SEQ ID
NO:4)

Nombre: TDZ.1 (polipéptido) (no abarcada en la invención)

35 1 MSFVGGENSGV KMGSSEDWEKD EPQCCLEDPA VSPLEPGPSL PTMNFVHTSP
 51 KVKNLNPKKP SIHDQDHKVL VLDSGNLIAV PDKNYIRPEI FFALASSLSS
40 101 ASAEIGSPIL LGVSKGEPCP YCDXDKGQSH PSLQLKEKL MKLAAQKESA
 151 RRPFIFYRAQ VGSWNNLESA AHPGWFICTS CNCNEPVGVT DKFENRKHIE
 201 FSFQPVCKAE MSPSEVSD* (SEQ ID NO:8)

45 Nombre: TDZ.2 (polipéptido) (no abarcada en la invención)

50 1 MSFVGGENSGV KMGSSEDWEKD EPQCCLEGPK VKNLNPKPSF IRDQDHKVLV
 51 LDSGNLIAVP DKNYIRPRIF PALASSLSSA SAEKGSPILL GVSNGEFCLY
100 101 CDKDKKGQSHP SLQLKEKLK LKAAQKESAR RPFIFYRAQV GSWNMLESAA
 151 HPGWFICTSC NCNEPVGVTID KPENRKHIEP SFQPVCKAE SPSEVSD* (SEQ ID
NO:9)

Nombre: TDZ.3 (polipéptido) (no abarcada en la invención)

60 1 MSFVGGENSGV KMGSSEDWEKD EPQCCLEIF FALASSLSSA SAEKGSPILL
 51 GVSNGEFCLY CDKDKKGQSHP SLQLKEKLK LKAAQKESAR RPFIFYRAQV
105 101 GSWNMLESAA HPGWFICTSC NCNEPVGVTID KPENRKHIEP SFQPVCKABM
 151 SPSEVSD* (SEQ ID NO:10)

ES 2 325 165 T3

El descubrimiento de la IL-1 zeta, las variantes de corte y empalme de IL-1 zeta (TDZ.1, TDZ.2, y TDZ.3) y los ácidos nucleicos de Xrec2 permite la construcción de vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos respectivos y células hospedadoras transfectadas o transformadas con los vectores de expresión. Se hace posible también el aislamiento y la purificación de IL-1 zeta biológicamente activa,

- 5 las variantes de corte y empalme de IL-1 zeta, y los polipéptidos Xrec2 y fragmentos de los mismos. Los ácidos nucleicos u oligonucleótidos de los mismos pueden utilizarse como sondas para identificar ácido nucleico codificante de proteínas que tienen actividades asociadas. Así, pueden utilizarse IL-1 zeta y las variantes de corte y empalme de IL-1 zeta para identificar actividades asociadas con ligandos de la familia IL-1, y puede utilizarse Xrec2 para identificar actividades asociadas con receptores de la familia IL-1. Adicionalmente, los ácidos nucleicos u oligonucleótidos de 10 los mismos de IL-1 zeta TDZ.1, TDZ.2, y TDZ.3 pueden utilizarse para identificar el cromosoma 2 humano, mientras que los de Xrec2 pueden utilizarse para identificar el cromosoma X humano. Análogamente, estos ácidos nucleicos u oligonucleótidos de los mismos pueden utilizarse para mapear genes en los cromosomas humanos 2 y X, respectivamente, y para identificar genes asociados con ciertas enfermedades, síndromes u otras afecciones humanas asociadas con los cromosomas humanos 2 y X. Así, los ácidos nucleicos u oligonucleótidos de los mismos de IL-1 zeta, TDZ.1, 15 TDZ.2, y TDZ.3 pueden utilizarse para identificar glaucoma, displasia ectodérmica, diabetes mellitus dependiente de insulina, síndrome de piel arrugada, leucemia/linfoma de las células T, y distrofia muscular tibial, mientras que los ácidos nucleicos u oligonucleótidos de los mismos de Xrec2 pueden utilizarse para identificar retinosquisis, lisiscefalía, heteropia laminar subcortical, retardo mental, síndrome de Cowchock, síndrome de Bazex, hipertricosis, síndrome linfoproliferativo, inmunodeficiencia, displasia mesomélica de Langer, y leucemia. Finalmente, los oligonucleótidos monocatenarios sentido o antisentido de estos ácidos nucleicos pueden utilizarse para inhibir la expresión de 20 polinucleótidos codificados por los genes de IL-1 zeta y Xrec2, respectivamente.

Adicionalmente, los polipéptidos IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2, TDZ.3 y Xrec2 y fragmentos solubles de los mismos pueden utilizarse para activar y/o inhibir la activación de células endoteliales vasculares y linfocitos, inducir y/o inhibir 25 la inducción de la destrucción de tejido local y fiebre (Janeway *et al.*, 1996), inhibir y/o estimular los macrófagos y las células endoteliales vasculares para producir IL-6, inducir y/o inhibir la inducción de prostaglandinas, sintetasa de óxido nítrico, y metaloproteinasas, y regular en sentido creciente y/o inhibir la regulación creciente de moléculas en la superficie de las células endoteliales vasculares. Además, estos polipéptidos y péptidos fragmentados pueden utilizarse 30 también para inducir y/o inhibir la inducción de mediadores inflamatorios tales como los factores de transcripción LF- κ B y AP-1, las quinasas MAP JNK y p38, COX-2, INOS, y la totalidad de las actividades estimuladas por estas moléculas.

Adicionalmente, estos polipéptidos y péptidos fragmentados pueden utilizarse como controles para fragmentación de péptidos. Finalmente, estos polipéptidos y fragmentos de los mismos pueden utilizarse para generar anticuerpos, 35 los cuales pueden utilizarse para purificar los polipéptidos IL-1 zeta y Xrec2.

Moléculas de ácido nucleico

En una realización particular, la invención se refiere a ciertas secuencias de nucleótidos aisladas que están exentas 40 de material contaminante endógeno. Una “secuencia de nucleótidos” hace referencia a una molécula de polinucleótido en la forma de un fragmento separado o como componente de una construcción de ácido nucleico de mayor tamaño. La molécula de ácido nucleico se ha derivado de DNA o RNA aislado al menos una vez en forma sustancialmente pura y en una cantidad o concentración que permita la identificación, manipulación, y recuperación de sus secuencias de 45 nucleótidos componentes por métodos bioquímicos estándar (tales como los reseñados en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Tales secuencias se proporcionan y/o construyen preferiblemente en la forma de un marco de lectura abierto no interrumpido por secuencias internas no traducidas, o intrones, que están presentes típicamente en los genes eucariotas. Las secuencias de DNA no traducido pueden estar presentes en posición 5' o 3' respecto a un marco de lectura abierto, donde las mismas no interfieren con la manipulación o expresión de la región codificante.

50 Las moléculas de ácido nucleico de la invención incluyen DNA en forma tanto monocatenaria como bicatenaria, así como el complemento de RNA del mismo. El DNA incluye, por ejemplo, cDNA, DNA genómico, DNA sintetizado químicamente, DNA amplificado por PCR, y combinaciones de los mismos. El DNA genómico puede aislarse por técnicas convencionales, v.g., utilizando como sonda el cDNA de SEQ ID NO: 2 o un fragmento adecuado del mismo.

55 Las moléculas de DNA de la invención incluyen genes de longitud total así como polinucleótidos y fragmentos de los mismos. El gen de longitud total puede incluir el péptido señal N-terminal. Otras realizaciones incluyen DNA codificante de una forma soluble, v.g., codificante del dominio extracelular de la proteína, con o sin el péptido señal.

60 Los ácidos nucleicos de la invención se derivan preferiblemente de secuencias humanas, pero la invención incluye también los derivados de especies no humanas.

Secuencias Preferidas

65 Las moléculas de ácido nucleico particularmente preferidas de la invención son las que se muestran en SEQ ID NO: 2 para Xrec2. Clones de cDNA que tenían la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NOs: 1 y 2 se aislaron como se describe en el Ejemplo 1. Las secuencias de los aminoácidos de IL-1 zeta y Xrec2 codificadas por los DNAs de SEQ ID NOs: 1 y 2 se muestran en SEQ ID NOs: 3 y 4, respectivamente. Clones de cDNA que tenían la secuencia de ácido

ES 2 325 165 T3

nucleico de SEQ ID NOs: 5, 6 y 7 se aislaron como se describe en el Ejemplo 8. Las secuencias de los aminoácidos de TDZ.1, TDZ.2, y TDZ.3 codificadas por los DNAs de SEQ ID NOs: 5, 6 y 7 se muestran en SEQ ID NOs: 8, 9, y 10, respectivamente.

- 5 SEQ ID NOs: 1-4 identifican la IL-1 zeta de SEQ ID NO: 3 como un miembro de la familia IL-1 y el Xrec2 de SEQ ID No: 4 como un miembro de la familia de receptores de IL-1. Las homologías en las cuales se basa esto se indican en la Tabla I.

10

TABLA I

	Proteína	Procedencia	Porcentaje de identidad respecto a IL-1 zeta
15	IL-1 alfa	Humana	21%
	IL-1 beta	Humana	24%
20	IL-1 delta	Humana	34%
	IL-18	Humana	21%
25	IL-1ra	Humana	29%
	Proteína	Procedencia	Porcentaje de identidad respecto a Xrec2
30	TIGIRR (miembro de la familia IL-1R)	Humana	63%
	TIGIRR (miembro de la familia IL-1R)	Murina	61%
35	SIGIRR	Humana	22%
	IL-1R-AcP	Humana	35%
40	IL-1R-AcPL	Humana	26%
	IL-1R	Humana	29%
	RP1	Humana	31%
	RP2	Humana	28%
	ST2	Humana	26%

45 Las variantes de corte y empalme de IL-1 zeta se descubrieron en un tramo de secuencia de DNA genómico (X22304.gbn). Esta secuencia genómica contiene también los diferentes exones de IL-1 zeta y otra variante de corte y empalme conocida como Tango-77 (WO 99/06426). La comparación de las secuencias de cDNA de las IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2, TDZ.3 y Tango-77 clonadas con la secuencia genómica proporciona información en cuanto a la generación de los sucesos de corte y empalme. La Figura 1 muestra la estructura genómica del locus de IL-1 zeta y los cDNAs generados por corte y empalme alternativos. Los recuadros numerados indican los exones individuales 1-6 y el tamaño aproximado de los intrones interpuestos se indica en la parte superior. El asterisco (*) indica la presencia de un codón de parada, en el extremo de la secuencia codificante (exón 6) o como un codón de parada en marco (exón 3). "M" indica una metionina de iniciación potencial originada por el exón 1 o el exón 3. Tango-77 es la estructura de cDNA descrita en WO 99/06426. Una característica importante de IL-1 zeta y sus variantes de corte y empalme es la presencia o la ausencia del exón 4. El exón 4 está presente en IL-1 zeta, TDZ1 y TDZ.2, pero no en Tango-77 o TDZ.3. La secuencia de aminoácidos codificada por el exón 4 se alinea bien con las secuencias de aminoácidos de otros miembros de la familia IL-1 en el pequeño número de las primeras cadenas beta de los péptidos maduros. En contraste, las secuencias de aminoácidos codificadas por los exones 1 y 2 de Tango-77 y el exón 1 de los cDNAs de TDZ.3, que reemplazan más bien que complementan el exón 4 de IL-1 zeta, TDZ.1 y TDZ.2, no se alinean bien con otros miembros de la familia IL-1 en esta misma región. IL-1 zeta, Tango-77, TDZ.1, TDZ.2 y TDZ.3 se alinean bien todas ellas con las secuencias de aminoácidos de otros miembros de la familia IL-1 en los 2/3 del terminal C del péptido maduro (la región codificada por los exones 5 y 6 que son comunes a todas estas isoformas de corte y empalme). Así pues, los "péptidos maduros" codificados por los DNAs de IL-1 zeta, TDZ.1 y TDZ.2 representan probablemente moléculas funcionales afines a IL-1. Esto contrasta con los polipéptidos codificados por los DNAs de Tango-77 o TDZ.3 que tienen menor probabilidad de representar una molécula funcional afín a IL-1.

ES 2 325 165 T3

Es probable que la totalidad de las isoformas de corte y empalme, excepto TDZ.3, codifiquen proformas de una citoquina afín a IL-1, dado que en la dirección N-terminal los cDNAs se extienden más allá del término N de las IL-1s maduras. Esta observación predice que IL-1 zeta, TDZ.1 y TDZ.2 codifican el mismo péptido maduro. En conexión con esta observación se encuentran la prodominios (así como las UTRs 5') que difieren entre IL-1 zeta, TDZ.1 y TDZ.2.

La Tabla III, que detalla la distribución tisular de IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2, TDZ.3 y Tango-77, muestra que la expresión de Tango-77 está más extendida que la de IL-1 zeta. La Tabla III muestra también que la expresión de TDZ.1 es comparable, y se superpone prácticamente por completo, con la de Tango-77. Los datos de distribución tisular combinados con la información de alineación de la Figura 1 muestran que TDZ.1 es el único miembro de las variantes de corte y empalme que se alinea bien con otros miembros de la familia IL-1, y está muy extendida en su expresión. Estas observaciones sugieren que TDZ.1 puede ser la más importante de las variantes de corte y empalme en términos de relevancia para las respuestas biológicas.

15 Secuencias Adicionales

Debido a la conocida degeneración del código genético, en donde más de un codón puede codificar el mismo aminoácido, una secuencia de DNA puede variar respecto a la que se muestra en SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, y 7 codificar sin embargo un polipéptido que tenga la misma secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOs: 3, 4, 8, 9 y 10, respectivamente. Dichas secuencias de DNA variantes pueden ser resultado de mutaciones accidentales (v.g., que ocurren durante la amplificación por PCR), o pueden ser el producto de mutagénesis deliberada de una secuencia nativa.

La invención proporciona secuencias aisladas de DNA que codifican polipéptidos de la invención, seleccionadas de: (a) DNA que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 2; (b) DNA que codifica los polipéptidos de SEQ ID NO: 4; (c) DNA susceptible de hibridación a un DNA de (a) o (b) en condiciones de severidad moderada y que codifica los polipéptidos de la invención; (d) DNA susceptible de hibridación a un DNA de (a) o (b) en condiciones de severidad alta y que codifica los polipéptidos de la invención, y (e) DNA que está degenerado, como resultado del código genético, a un DNA definido en (a), (b), (c) o (d) y que codifica los polipéptidos de la invención. Por supuesto, los polipéptidos codificados por dichas secuencias de DNA están abarcados por la invención.

Como se utiliza en esta memoria, las condiciones de severidad moderada pueden ser determinadas fácilmente por aquellas personas que poseen una experiencia ordinaria en la técnica basándose, por ejemplo, en la longitud del DNA. Las condiciones básicas se indican en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a edición, vol. 1, pp. 1101-104, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de prelavado para los filtros de nitrocelulosa 5X SSC, 0,5% SDS, EDTA 1,0 mM (pH 8,0), condiciones de hibridación de aproximadamente 50% de formamida, 6X SSC a aproximadamente 42°C (u otra solución de hibridación similar, tal como solución de Stark, en aproximadamente 50% formamida a aproximadamente 42°C), y condiciones de lavado de aproximadamente 60°C, 0,5X SSC, 0,1% SDS. Condiciones de severidad alta pueden ser determinadas también fácilmente por los profesionales expertos basándose, por ejemplo, en la longitud del DNA. Generalmente, tales condiciones se definen como condiciones de hibridación como se ha indicado arriba, y con lavado a aproximadamente 68°C, 0,2X SSC, 0,1% SDS. El técnico experto reconocerá que la temperatura y la concentración de sales de la solución de lavado pueden ajustarse según sea necesario de acuerdo con factores tales como la longitud de la sonda.

Se incluye también como una realización de la invención DNA que codifica fragmentos de polipéptidos y polipéptidos que comprenden uno o más sitios desactivados de N-glicosilación, uno o más sitios desactivados de procesamiento de proteasas, o una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, como se describe más adelante.

En otra realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden comprender secuencias de nucleótidos que son idénticas al menos en un 80% a una secuencia nativa.

Se contemplan también realizaciones en las cuales una molécula de ácido nucleico comprende una secuencia que es idéntica al menos en un 90%, idéntica al menos en un 95%, idéntica al menos en un 98%, idéntica al menos en un 99%, o idéntica al menos en un 99,9% a una secuencia nativa.

El porcentaje de identidad puede ser determinado por inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de ácido nucleico puede determinarse por comparación de la información de secuencias utilizando el programa de ordenador GAP, versión 6.0, descrito por Devereux *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 12: 387, 1984, y disponible del Grupo de Ordenadores de Genética de la Universidad de Wisconsin (UWGCG). Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de comparación monaria (que contiene un valor de 1 para identidades y 0 para no-identidades) para nucleótidos, y la matriz de comparación ponderada de Gribskov y Burgess, *Nucl. Acids. Res.* 14: 6745, 1986, como ha sido descrito por Schwartz y Dayhoff, eds., *Atlas of Protein Sequence and Structure*, pp. 353-358, National Biomedical Research Foundation, 1979; (2) una penalidad de 3,0 para cada laguna y una penalidad adicional de 0,10 para cada símbolo en cada laguna; y (3) ausencia de penalidad para las lagunas de los extremos. También pueden utilizarse otros programas utilizados por un experto en la técnica de comparación de secuencias.

La invención proporciona ácidos nucleicos aislados útiles en la producción de polipéptidos. Tales polipéptidos pueden prepararse por cualquiera de varias técnicas convencionales. Una secuencia de DNA que codifica un polipéptido

ES 2 325 165 T3

tido de la invención, o un fragmento deseado del mismo puede subclonarse en un vector de expresión para producción del polipéptido o fragmento. La secuencia de DNA se fusiona ventajosamente a una secuencia que codifica un lector o péptido señal adecuado. Alternativamente, el fragmento deseado puede sintetizarse químicamente utilizando técnicas conocidas. Pueden producirse también fragmentos de DNA por digestión con endonucleasas de restricción de

5 una secuencia de DNA clonada de longitud total, y aislarla por electroforesis en geles de agarosa. En caso necesario, oligonucleótidos que reconstruyen el término 5' o 3' hasta un punto deseado pueden ligarse a un fragmento de DNA generado por digestión con enzimas de restricción. Tales oligonucleótidos pueden contener adicionalmente un sitio de escisión por endonucleasas de restricción aguas arriba de la secuencia codificante deseada, y posicionar un codón de iniciación (ATG) en el término N de la secuencia codificante.

10 El procedimiento bien conocido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede emplearse también para aislar y amplificar una secuencia de DNA que codifica un fragmento de proteína deseado. Oligonucleótidos que definen los términos deseados del fragmento de DNA se emplean como iniciadores 5' y 3'. Los oligonucleótidos pueden contener adicionalmente sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción, a fin de facilitar la inserción del
15 fragmento de DNA amplificado en un vector de expresión. Técnicas PCR como se describen en Saiki *et al.*, *Science*, 239.487, 1988; Wu *et al.*, compiladores, *Recombinant DNA Methodology*, pp. 1189-196, Academic Press, Inc., San Diego, 1989; e Innis *et al.*, eds., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., 1990.

20 Polipéptidos y fragmentos de los mismos

La invención abarca polipéptidos y fragmentos de los mismos en diversas formas, que incluyen aquéllos que existen naturalmente o que se producen por diversas técnicas tales como procedimientos que implican tecnología de DNA recombinante. Dichas formas incluyen, pero sin carácter limitante, derivados, variantes, y oligómeros, así como
25 proteínas de fusión o fragmentos de las mismas.

Los polipéptidos de la invención incluyen proteínas de longitud total codificadas por las secuencias de ácido nucleico de la invención. Polipéptidos particularmente preferidos de Xrec2 comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 10. Para IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2 y TDZ.3 el término N no codifica un péptido señal clásico, pero la longitud suplementaria con relación a la forma madura de otros miembros de la familia IL-1 sugiere que el término N puede actuar como prodominio. Un sitio de escisión predicho es el punto en que comienza la porción estructural conservada de la proteína. Datos de modelización estructural respaldan esta hipótesis. Para IL-1 zeta, TDZ.1 y TDZ.2, el sitio está en algún lugar próximo al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos codificada por el exón 4. Así, el polipéptido de IL-1 zeta, como se expone en SEQ ID NO: 3, incluye un prodominio supuesto que se extiende
30 desde los aminoácidos 1 a x, donde x es un número entero de 20 a 50. Análogamente, TDZ.1 de SEQ ID NO: 8 incluye un prodominio supuesto que se extiende desde los aminoácidos 1 a x', donde x' es un número entero de 40 a 60 y muy preferiblemente x' es aproximadamente 52. TDZ.2 de SEQ ID NO: 9 incluye un prodominio supuesto que se extiende
35 desde los aminoácidos 1 a x'', donde x'' es un número entero de 20 a 40 y muy preferiblemente x'' es 31.

40 Al contrario que IL-1 zeta y sus variantes de corte y empalme, el polipéptido de Xrec 2, como se indica en SEQ ID NO: 4, incluye una región hidrófoba N-terminal que funciona como un péptido señal, seguida por un dominio extracelular que comprende los aminoácidos 19 a 359, una región transmembranal que comprende los aminoácidos 360 a 378, y un dominio citoplasmico C-terminal que comprende los aminoácidos 379 a 696. El análisis por ordenador predice que el péptido señal corresponde a los residuos 1 a 19 de SEQ ID NO: 4 (aunque los sitios próximos más probables de escisión del péptido señal predichos por ordenador, en orden descendente, se encuentran después de los aminoácidos 20 y 16 de SEQ ID NO: 4). La escisión del péptido señal produciría por tanto una proteína madura que
45 comprende los aminoácidos 19 a 696 de SEQ ID NO: 4.

50 El técnico experto reconocerá que los límites arriba descritos de tales regiones del polipéptido son aproximados. Como ilustración, los límites de la región transmembranal (que pueden predecirse utilizando programas de ordenador disponibles para dicho propósito) pueden diferir de los arriba descritos.

55 Los polipéptidos de la invención pueden estar fijados a la membrana o pueden secretarse y, por consiguiente, ser solubles. Los polipéptidos solubles son susceptibles de ser secretados por las células en las que se expresan. En general, los polipéptidos solubles pueden identificarse (y distinguirse de sus contrapartidas insolubles fijadas a la membrana) por separación de células intactas que expresan el polipéptido deseado del medio de cultivo, v.g., por centrifugación, y ensayo del medio (sobrenadante) en cuanto a la presencia del polipéptido deseado. La presencia del polipéptido en el medio indica que el polipéptido fue secretado por las células y por tanto es una forma soluble de la proteína.

60 En una realización, los polipéptidos solubles y fragmentos de los mismos comprenden la totalidad o parte del dominio extracelular, pero carecen de la región transmembranal que podría causar la retención del polipéptido en una membrana celular. Un polipéptido soluble puede incluir el dominio citoplasmico, o una porción del mismo, con tal que el polipéptido sea secretado por la célula en la que se produce.

65 En general, el uso de formas solubles es ventajoso para ciertas aplicaciones. La purificación de los polipéptidos respecto a las células hospedadoras recombinantes se ve facilitada, dado que los polipéptidos solubles son secretados por las células. Adicionalmente, los polipéptidos solubles son generalmente más adecuados para administración intravenosa.

ES 2 325 165 T3

La invención proporciona también polipéptidos y fragmentos del dominio extracelular que retienen una actividad biológica deseada. Realizaciones particulares están dirigidas a fragmentos polipeptídicos de SEQ ID NO: 10 que retienen la capacidad para fijar los cognados nativos, sustratos o contraestructura ("pareja de fijación"). Un fragmento de este tipo puede ser un polipéptido soluble, como se ha descrito arriba. En otra realización, los polipéptidos y fragmentos incluyen ventajosamente regiones que se conservan en la familia de receptores de IL-1 como se ha descrito arriba.

Los fragmentos polipeptídicos pueden comprender al menos 20, o al menos 30, aminoácidos contiguos de las secuencias de SEQ ID NOs: 3, 4, 8, 9, y 10. Fragmentos derivados del dominio citoplásmico de Xrec 2 de SEQ ID NO: 10 encuentran utilidad en estudios de transducción de señales, y en la regulación de procesos celulares asociados con la transducción de señales biológicas. Los fragmentos polipeptídicos pueden emplearse también como inmunógenos, en la generación de anticuerpos.

Variantes

En esta memoria se proporcionan variantes existentes naturalmente así como variantes derivadas de los polipéptidos y fragmentos.

Las variantes pueden exhibir secuencias de aminoácidos que son idénticas al menos en un 80%. Se contemplan también realizaciones en las cuales un polipéptido o fragmento comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos en un 90%, idéntica al menos en un 95%, idéntica al menos en un 98%, idéntica al menos en un 99%, o idéntica al menos en un 99,9% al polipéptido preferido o fragmento del mismo. El porcentaje de identidad puede determinarse por inspección visual y cálculo matemático. Alternativamente, el porcentaje de identidad de dos secuencias de proteína puede determinarse comparando la información de secuencia con utilización del programa de ordenador GAP, basado en el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J.Mol. Bio.* 48: 443, 1970) y disponible del Grupo de Ordenadores de Genética de la Universidad de Wisconsin (UWGCG). Los parámetros por defecto preferidos para el programa GAP incluyen: (1) una matriz de registro, blosum62, como ha sido descrita por Henikoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10915, 1992; (2) un gravamen por laguna de 12; (3) un gravamen por longitud de laguna de 4; y (4) sin penalidad por lagunas en los extremos. Pueden utilizarse también otros programas de comparación de secuencias utilizados por un experto en la técnica.

Las variantes de la invención incluyen, por ejemplo, aquéllas que resultan de sucesos alternativos de corte y empalme de mRNA o de escisión proteolítica. El corte y empalme alternativo de mRNA puede producir, por ejemplo, una proteína truncada pero biológicamente activa, tal como una forma soluble de la proteína existente naturalmente. Variaciones atribuibles a proteólisis incluyen, por ejemplo, diferencias en los términos N o C después de la expresión en tipos diferentes de células hospedadoras, debidas a la eliminación proteolítica de uno o más aminoácidos terminales de la proteína (generalmente de 1 a 5 aminoácidos terminales). Se contemplan también en esta memoria proteínas en las cuales las diferencias de secuencia de aminoácidos son atribuibles a polimorfismo genético (variación alélica entre los individuos que producen la proteína).

Variantes adicionales dentro del alcance de la invención incluyen polipéptidos que pueden modificarse para crear derivados de los mismos por formación de conjugados covalentes o agregativos con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y análogos. Derivados covalentes pueden prepararse por enlace de los restos químicos a grupos funcionales en las cadenas laterales de los aminoácidos o en el término N o el término C de un polipéptido. Se contemplan en esta memoria conjugados que comprenden agentes diagnósticos (detectables) o terapéuticos unidos a ellos, como se expone con mayor detalle más adelante.

Otros derivados incluyen conjugados covalentes o agregativos de los polipéptidos con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo por síntesis en cultivo recombinante como fusiones en el terminal N o el terminal C. Ejemplos de proteínas de fusión se exponen más adelante en conexión con los oligómeros. Adicionalmente, las proteínas de fusión pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación e identificación. Tales péptidos incluyen, por ejemplo, poli-His o los péptidos de identificación de antígenos descritos en la Patente U.S. No. 5.011.912 y en Hopp *et al.*, *Bio/Technology*, 6: 1204-1988. Un péptido de este tipo es el péptido FLAG®, Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ ID NO: 11), que es altamente antigenógeno y proporciona un epítopo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico, permitiendo el ensayo rápido y la purificación fácil de una proteína expresada recombinante. Un hibridoma murino designado 4E11 produce un anticuerpo monoclonal que fija el péptido FLAG® en presencia de ciertos cationes de metales divalentes, como se describe en la Patente U.S. 5.011.912. La línea de células de hibridoma 4E11 ha sido depositada con la Colección Americana de Cultivos Tipo bajo el número de acceso HB 9259. Anticuerpos monoclonales que fijan el péptido FLAG® están disponibles de Eastman, Kodak Co., Scientific Imaging Systems Division, New Haven, Connecticut.

Entre los polipéptidos variantes proporcionados en esta invención se encuentran variantes de polipéptidos nativos que retienen la actividad biológica nativa o el equivalente sustancial de la misma. Un ejemplo es una variante que se fija esencialmente con la misma afinidad de fijación que lo hace la forma nativa. La afinidad de fijación puede medirse por procedimientos convencionales, v.g., como se describe en la Patente U.S. No. 5.512.457 y como se expone más adelante.

ES 2 325 165 T3

Las variantes incluyen polipéptidos que son sustancialmente homólogos a la forma nativa, pero que tienen una secuencia de aminoácidos diferente de la de la forma nativa debido a una o más delecciones, inserciones o sustituciones. Realizaciones particulares incluyen, pero sin carácter limitante, polipéptidos que comprenden de una a diez delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos, cuando se comparan con una secuencia nativa.

5 Un aminoácido dado puede reemplazarse, por ejemplo, por un residuo que tenga características fisiognómicas similares. Ejemplos de tales sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu, o Ala uno por otro; sustituciones de un residuo polar por otro, tal como entre Lys y Arg, Glu y Asp, o Gln y Asn; o sustituciones de un residuo aromático por otro, tal como Phe, Trp, o Tyr uno por otro. Otras sustituciones conservadoras, v.g., que implican sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobicidad similares, son bien conocidas.

Análogamente, los DNAs de la invención incluyen variantes que difieren de una secuencia de DNA nativa debido a una o más delecciones, inserciones o sustituciones, pero que codifican un polipéptido biológicamente activo.

15 La invención incluye adicionalmente polipéptidos de la invención con o sin glicosilación asociada del patrón nativo. Los polipéptidos expresados en levadura o sistemas de expresión de mamífero (v.g., células COS-1 o COS-7) pueden ser similares a o significativamente diferentes de un polipéptido nativo en peso molecular y patrón de glicosilación, dependiendo de la elección del sistema de expresión. La expresión de los polipéptidos de la invención en sistemas de expresión bacterianos, tales como *E. coli*, proporciona moléculas no glicosiladas. Adicionalmente, una preparación dada puede incluir especies múltiples de la proteína glicosiladas diferencialmente. Los grupos glicosilo pueden eliminarse por métodos convencionales, en particular los que utilizan glicopeptidasa. En general, los polipéptidos glicosilados de la invención pueden incubarse con un exceso molar de glicopeptidasa (Boehringer Mannheim).

20 25 Correspondientemente, están abarcadas por la invención construcciones similares de DNA que codifican diversas adiciones o sustituciones de residuos o secuencias de aminoácidos, o delecciones de residuos o secuencias terminales o internas. Por ejemplo, los sitios de glicosilación en N en el dominio extracelular del polipéptido pueden modificarse para excluir glicosilación, permitiendo la expresión de un carbohidrato reducido análogo en sistemas de expresión de mamíferos y levaduras. Los sitios de glicosilación en N en polipéptidos eucariotas se caracterizan por un triplete de aminoácidos Asn-X-Y, en donde X es cualquier aminoácido excepto Pro, e Y es Ser o Thr. Sustituciones, adiciones, o delecciones apropiadas a la secuencia de nucleótidos que codifica estos tripletes darán como resultado la prevención de la fijación de residuos carbohidrato en la cadena lateral de Asn. La alteración de un solo nucleótido, seleccionado de tal modo que Asn se reemplaza por un aminoácido diferente, por ejemplo, es suficiente para desactivar un sitio de glicosilación en N. Alternativamente, Ser o Thr puede ser reemplazado por otro aminoácido, tal como Ala. Procedimientos conocidos para desactivar sitios de glicosilación en N en las proteínas incluyen los descritos en la Patente U.S. 5.071.972 y en EP 276.846.

30 40 En otro ejemplo de variantes, secuencias que codifican residuos Cys que no son esenciales para la actividad biológica pueden alterarse para hacer que los residuos Cys se delejen o sean reemplazados con otros aminoácidos, previniendo la formación de puentes disulfuro intramoleculares incorrectos después del plegado o la renaturalización.

Otras variantes se preparan por modificación de residuos de aminoácidos dibásicos adyacentes, a fin de mejorar la expresión en sistemas de levadura en los cuales está presente la actividad de la proteasa KEX2. EP212.914 describe el uso de mutagénesis orientada para desactivar los sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 en una proteína. Los sitios de procesamiento de la proteasa KEX2 se desactivan por delección, adición o sustitución de residuos que alteran los pares Arg-Arg, Arg-Lys, y Lys-Arg a fin de eliminar la existencia de estos residuos básicos adyacentes. Los apareamientos Lys-Lys son considerablemente menos susceptibles a la escisión por KEX2, y la conversión de Arg-Lys o Lys-Arg en Lys-Lys representa un enfoque conservador y preferido para desactivar los sitios KEX2.

50 Oligómeros

La invención abarca oligómeros o proteínas de fusión que contienen los polipéptidos Xrec2. Cuando el polipéptido de la invención es una proteína de membrana tipo I, tal como Xrec2, la pareja de fusión está enlazada al término C de la proteína de membrana tipo I. Tales oligómeros pueden encontrarse en la forma de multímeros enlazados covalentemente o enlazados no covalentemente, con inclusión de dímeros, trímeros, u oligómeros superiores. Como se ha indicado arriba, los polipéptidos preferidos son solubles y por tanto estos oligómeros pueden comprender polipéptidos solubles. En un aspecto de la invención, los oligómeros mantienen la capacidad de fijación de los componentes del polipéptido y proporcionan por ello sitios de fijación divalentes, trivalentes, etc.

60 Una realización de la invención está dirigida a oligómeros que comprenden polipéptidos múltiples unidos por la vía de interacciones covalentes o no covalentes entre los restos peptídicos fusionados a los polipéptidos. Tales péptidos pueden ser enlazados peptídicos (espaciadores), o péptidos que tienen la propiedad de promover oligomerización. Las cremalleras de leucina y ciertos polipéptidos derivados de anticuerpos se encuentran entre los péptidos que pueden promover oligomerización de los polipéptidos unidos a ellos, como se describe con mayor detalle más adelante.

Oligómeros Basados en Inmunoglobulina

Como una alternativa, se prepara un oligómero utilizando polipéptidos derivados de inmunoglobulinas. La preparación de proteínas de fusión que comprenden ciertos polipéptidos heterólogos fusionados a diversas porciones de polipéptidos derivados de anticuerpos (con inclusión del dominio Fc) ha sido descrita, v.g., por Ashkenazi *et al.*, *PNAS USA* 88:10535, 1991; Byrn *et al.*, *Nature* 344:677, 1990; y Hollenbaugh y Aruffo, "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", en *Current Protocols in Immunology*, Suppl. 4, pp. 10.19.1-10.19.11, 1992.

Una realización de la presente invención está dirigida a un dímero que comprende dos proteínas de fusión creadas por fusión de un polipéptido de la invención a un polipéptido Fc derivado de un anticuerpo. Una fusión de genes que codifica la proteína de fusión polipéptido/Fc se inserta en un vector de expresión apropiado. Las proteínas de fusión polipéptido/Fc se expresan en células hospedadoras transformadas con el vector de expresión recombinante, y pueden ensamblarse de modo muy similar a las moléculas de anticuerpos, con lo cual se forman enlaces disulfuro intercatenarios entre los restos Fc para producir moléculas bivalentes.

El término "polipéptido Fc", como se utiliza en esta memoria, incluye formas nativas y formas de muteína de los polipéptidos constituidos por la región Fc de un anticuerpo que comprende cualquiera o la totalidad de los dominios CH de la región Fc. Se incluyen también formas truncadas de tales polipéptidos que contienen la región bisagra que promueve la dimerización. Polipéptidos preferidos comprenden un polipéptido Fc derivado de un anticuerpo humano IgG1.

Un polipéptido Fc adecuado, descrito en la solicitud PCT WO 93/10151, es un polipéptido monocatenario que se extiende desde la región bisagra del terminal N al terminal C nativo de la región Fc de un anticuerpo humano IgG1. Otro polipéptido Fc útil es la muteína Fc descrita en la Patente U.S. 5.457.035 y en Baum *et al.*, *EMBO J.* 13: 3992-4001, 1994. La secuencia de aminoácidos de esta muteína es idéntica a la de la secuencia Fc nativa presentada en WO 93/10151, excepto que el aminoácido 19 ha sido cambiado de Leu a Ala, el aminoácido 20 ha sido cambiado de Leu a Glu, y el aminoácido 22 ha sido cambiado de Gly a Ala. La muteína exhibe afinidad reducida para los receptores de Fc.

Las proteínas de fusión arriba descritas que comprenden restos Fc (y los oligómeros formados a partir de las mismas) ofrecen la ventaja de purificación fácil por cromatografía de afinidad en columnas de Proteína A o Proteína G.

En otras realizaciones, los polipéptidos de la invención pueden emplearse en sustitución de la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo. Si las proteínas de fusión están formadas a la vez por cadenas pesada y ligera de un anticuerpo, es posible formar un oligómero con tantas regiones extracelulares polipeptídicas como cuatro.

Oligómeros Basados en Enlazadores Peptídicos

Alternativamente, el oligómero es una proteína de fusión que comprende polipéptidos múltiples, con o sin enlazadores peptídicos (péptidos espaciadores). Entre los enlazadores peptídicos adecuados se encuentran los descritos en las Patentes U.S. 4.751.180 y 4.935.233. Una secuencia de DNA que codifica un enlazador peptídico deseado puede insertarse entre, y en el mismo marco de lectura que, las secuencias de DNA de la invención, utilizando cualquier técnica convencional adecuada. Por ejemplo, un oligonucleótido sintetizado químicamente que codifica el enlazador puede ligarse entre las secuencias. En realizaciones particulares, una proteína de fusión comprende de 2 a 4 polipéptidos solubles de la invención, separados por enlazadores peptídicos.

Cremalleras de leucina

Otro método para preparación de los oligómeros de la invención implica el uso de una cremallera de leucina. Los dominios de cremallera de leucina son péptidos que promueven la oligomerización de las proteínas en las que se encuentran. Las cremalleras de leucina fueron identificadas originalmente en varias proteínas de fijación de DNA (Landschulz *et al.*, *Science* 240: 1759, 1988), y se han encontrado desde entonces en una diversidad de proteínas diferentes. Entre las cremalleras de leucina conocidas se encuentran péptidos existentes naturalmente y derivados de los mismos que se dimerizan o trimerizan.

El dominio de cremallera (al que se hace referencia también en esta memoria como un dominio oligomerizante, o formador de oligómeros) comprende una repetición de heptada repetitiva, a menudo con cuatro o cinco residuos leucina intercalados con otros aminoácidos. Ejemplos de dominios de cremallera son los encontrados en el factor de transcripción de levadura GCN4 y una proteína termoestable de fijación de DNA encontrada en el hígado de rata (C/EBP; Landschulz *et al.*, *Science*, 243: 1681, 1989). Dos proteínas transformantes nucleares, *fos* y *jun*, exhiben también dominios de cremallera, como lo hace el producto génico del proto-oncogén murino, c-myc (Landschulz *et al.*, *Science*, 240: 1759, 1988). Los productos de los oncogenes nucleares *fos* y *jun* comprenden dominios de cremallera que forman preferentemente heterodímeros (O'Shea *et al.*, *Science*, 245: 646, 1989; Turner *et al.*, *Science*, 243: 1689, 1989). El dominio de cremallera es necesario para la actividad biológica (fijación de DNA) en estas proteínas.

ES 2 325 165 T3

Las proteínas fusogénicas de varios virus diferentes, que incluyen paramixovirus, coronavirus, el virus del sarampión y muchos retrovirus, poseen también dominios de cremallera (Buckland *et al.*, *Nature*, 338:547,1989; Britton, *Nature*, 353:394, 1991; Delwart y Mosialos, *AIDS Research and Human Retroviruses*, 6:703, 1990). Los dominios de cremallera en estas proteínas virales fusogénicas se encuentran cerca de la región transmembranal de las proteínas;

5 se ha sugerido que los dominios de cremallera podrían contribuir a la estructura oligomérica de las proteínas fusogénicas. La oligomerización de proteínas fusogénicas virales está implicada en la formación de poros de fusión (Spruce *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 3523, 1991). Se ha informado también recientemente que los dominios de cremallera juegan un papel en la oligomerización de factores de transcripción del choque térmico (Rabindran *et al.*, *Science*, 259: 230, 1993).

10 Los dominios de cremallera se pliegan como espirales cortas paralelas enrolladas. (O'Shea *et al.*, *Science*, 254: 539, 1991). La arquitectura general de la espiral paralela enrollada ha sido bien caracterizada, con un empaquetamiento del tipo de "botones en ojales" como fue propuesto por Crick en 1953 (Crick, *Acta Crystallogr.* 6: 689, 1953). El dímero formado por un dominio de cremallera es estabilizado por la repetición de heptada, designada (abcdefg), de acuerdo 15 con la notación de McLachlan y Stewart, *J. Mol. Biol.* 98: 293, 1975, en la cual los residuos *a* y *d* son generalmente residuos hidrófobos, siendo *d* una leucina, que están alineados en la misma cara de una hélice. Residuos con carga opuesta se encuentran comúnmente en las posiciones *g* y *e*. Así, en una espiral enrollada paralela formada por dos dominios cremallera helicoidales, los "botones" formados por las cadenas laterales hidrófobas de la primera hélice están empaquetados en los "ojales" formados entre las cadenas laterales de la segunda hélice.

20 Los residuos en la posición *d* (a menudo leucina) aportan grandes energías de estabilización hidrófobas, y son importantes para la formación de oligómeros (Krystek *et al.*, *Int. J. Peptide Res.*, 38: 229, 1991). Lovejoy *et al.*, *Science* 259: 1988, 1993, publicaron recientemente la síntesis de un haz tri-catenario α -helicoidal en el cual las hélices discurren en dirección arriba-arriba-abajo. Sus estudios confirmaron que la energía de estabilización hidrófoba proporciona la fuerza motriz principal para la formación de espirales enrolladas a partir de monómeros helicoidales. Estos 25 estudios indican también que ciertas interacciones electrostáticas contribuyen a la estequiometría y geometría de las espirales enrolladas. Una discusión adicional de la estructura de las cremalleras de leucina se encuentra en Harbury *et al.*, *Science*, 262: 1401, 1993.

30 Ejemplos de dominios cremallera de leucina adecuados para producir proteínas oligoméricas solubles se describen en la solicitud PCT WO 94/10308, y la cremallera de leucina derivada de la proteína D tensioactiva del pulmón (SPD) descrita en Hoppe *et al.*, *FEBS Letters*, 344: 191, 1994. El uso de una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización estable de una proteína heteróloga fusionada a la misma se describe en Fanslow *et al.*, *Semin. Immunol.*, 6: 267-278, 1994. Proteínas de fusión recombinantes que comprenden un polipéptido soluble fusionado a un péptido 35 de cremallera de leucina se expresan en células hospedadoras adecuadas, y el oligómero soluble que se forma se recupera del sobrenadante de cultivo.

Ciertos restos de cremallera de leucina forman preferentemente trímeros. Un ejemplo es una cremallera de leucina derivada de la proteína D tensioactiva de pulmón (SPD), como se describe en Hoppe *et al.*, *FEBS Letters*, 344: 191, 40 1994, y en la Patente U.S. 5.716.805. Este péptido de cremallera de leucina derivado de SPD de pulmón comprende la secuencia de aminoácidos Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr (SEQ ID NO:12).

Otro ejemplo de una cremallera de leucina que promueve trimerización es un péptido que comprende la secuencia 45 de aminoácidos Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu lle Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg (SEQ ID NO:13), como se describe en la Patente U.S. 5.716.805. En una realización alternativa, se añade un residuo Asp en el terminal N; en otra, el péptido carece del residuo Arg del terminal N.

50 Pueden emplearse también fragmentos de los péptidos de cremallera que anteceden, que retienen la propiedad de promover la oligomerización. Ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero sin carácter limitante, péptidos que carecen de uno o dos de los residuos del terminal N o el terminal C presentados en las secuencias de aminoácidos que anteceden. Las cremalleras de leucina pueden derivarse de péptidos de cremallera de leucina existentes naturalmente, v.g., por la vía de una o más sustituciones conservadoras en la secuencia de aminoácidos nativa, en donde se retiene la 55 capacidad del péptido para promover oligomerización.

Otros péptidos derivados de proteínas trímeras existentes naturalmente pueden emplearse en la preparación de oligómeros trímeros. Alternativamente, pueden emplearse péptidos sintéticos que promueven oligomerización. En realizaciones particulares, los residuos leucina en un resto de cremallera de leucina están reemplazados por residuos isoleucina. Tales péptidos que comprenden isoleucina pueden designarse como cremalleras de isoleucina, pero están abarcados por el término "cremalleras de leucina" tal como se emplea en esta memoria.

ES 2 325 165 T3

Producción de polipéptidos y fragmentos de los mismos

La expresión, el aislamiento y la purificación de los polipéptidos y fragmentos de la invención pueden realizarse por cualquier técnica adecuada, con inclusión, pero sin carácter limitante, de las siguientes:

5

Sistemas de expresión

La presente invención proporciona también vectores recombinantes de clonación y expresión que contienen DNA, así como células hospedadoras que contienen los vectores recombinantes. Los vectores de expresión que comprenden 10 DNA pueden utilizarse para preparar los polipéptidos o fragmentos de la invención codificados por el DNA. Un método para producir polipéptidos comprende cultivar células hospedadoras transformadas con un vector de expresión recombinante que codifica el polipéptido, en condiciones que promueven la expresión del polipéptido, y recuperar luego del cultivo los polipéptidos expresados. El técnico experto reconocerá que el procedimiento para purificar los polipéptidos expresados variará de acuerdo con factores tales como el tipo de células hospedadoras empleado, y de 15 que el polipéptido esté fijado a la membrana o sea una forma soluble que es secretada por la célula hospedadora.

Puede emplearse cualquier sistema de expresión adecuado. Los vectores incluyen un DNA que codifica un polipéptido o fragmento de la invención, enlazado operativamente a secuencias de nucleótidos adecuadas reguladoras de la transcripción o la traducción, tales como las derivadas de un gen de mamífero, microbio, virus, o insecto. Ejemplos de 20 secuencias reguladoras incluyen promotores de la transcripción, operadores, o intensificadores, un sitio de fijación de ribosoma de mRNA, y secuencias apropiadas que controlan la iniciación y terminación de la transcripción y la traducción. Las secuencias de nucleótidos están enlazadas operativamente cuando la secuencia reguladora es funcionalmente afín a la secuencia de DNA. Así, una secuencia nucleotídica promotora está enlazada operativamente a una secuencia de DNA si la secuencia nucleotídica del promotor controla la transcripción de la secuencia de DNA. Un origen de 25 replicación que confiere la capacidad para replicarse en las células hospedadoras deseadas, y un gen de selección por el cual se identifican los transformantes, están incorporados generalmente en el vector de expresión.

Adicionalmente, una secuencia que codifica un péptido señal apropiado (nativo o heterólogo) puede incorporarse 30 en vectores de expresión. Una secuencia de DNA para un péptido señal (conductor de la secreción) puede fusionarse en marco a la secuencia de ácido nucleico de la invención de tal manera que el DNA se transcribe inicialmente, y el mRNA se traduce, en una proteína de fusión que comprende el péptido señal. Un péptido señal que es funcional en las células hospedadoras propuestas promueve la secreción extracelular del polipéptido. El péptido señal se escinde del polipéptido una vez secretado el polipéptido por la célula.

35 El profesional experto reconocerá también que la o las posiciones en las cuales se escinde el péptido señal pueden diferir de la predicha por un programa de ordenador, y pueden variar de acuerdo con factores tales como el tipo de células hospedadoras empleado en la expresión de un polipéptido recombinante. Una preparación de proteína puede incluir una mezcla de moléculas de proteína que tienen aminoácidos N-terminales diferentes como resultado de la escisión del péptido señal en más de un sitio. Ejemplos particulares de proteínas maduras proporcionadas en esta 40 memoria incluyen, pero sin carácter limitante, proteínas que tienen el residuo en la posición 6, 23, 25, 26, 39, 41, o 48 de SEQ ID NO: 3 y en la posición 1 ó 19 de SEQ ID NO: 4 como el aminoácido N-terminal.

Células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos incluyen células procariotas, levaduras o células 45 eucariotas superiores. Generalmente se prefieren células de mamífero o de insecto para uso como células hospedadoras. Vectores apropiados de clonación y expresión para uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y de mamífero se describen, por ejemplo, en Pouwels *et al.*, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, 1985. Sistemas de traducción exentos de células podrían emplearse también para producir polipéptidos utilizando RNAs derivados de las construcciones de DNA descritas en esta memoria.

50 *Sistemas Procariotas*

Los procariotas incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos. Células hospedadoras procariotas adecuadas para transformación incluyen, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas otras especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*. En una célula hospedadora procariota, 55 tal como *E. coli*, un polipéptido puede incluir un residuo metionina en el terminal N para facilitar la expresión del polipéptido recombinante en la célula hospedadora procariota. La Met del terminal N puede escindirse del polipéptido recombinante expresado.

Los vectores de expresión para uso en células hospedadoras procariotas comprenden generalmente uno o más genes 60 marcadores fenotípicos seleccionables. Un gen marcador fenotípico seleccionable es, por ejemplo, un gen que codifica una proteína que confiere resistencia a los antibióticos o que suministra un requerimiento autotrófico. Ejemplos de vectores de expresión útiles para células hospedadoras procariotas incluyen los derivados de plásmidos disponibles comercialmente tales como el vector de clonación pBR322 (ATCC 37017). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina, y proporciona por ello medios simples para identificar células transformadas. Un promotor apropiado y una secuencia de DNA se insertan en el vector pBR322. Otros vectores disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA).

ES 2 325 165 T3

Secuencias promotoras utilizadas comúnmente para vectores de expresión recombinantes en células hospedadoras procariotas incluyen β -lactamasa (penicilinasa), el sistema promotor de lactosa (Chang *et al.*, *Nature*, 275:615, 1978; y Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544, 1979), el sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 8:4057, 1980; y EP-A-36776) y el promotor tac (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, p. 412, 5 Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Un sistema de expresión particularmente útil en células hospedadoras procariotas emplea un promotor del fago λP_L y una secuencia represora termolábil de CI857ts. Los vectores plasmídicos disponibles de la American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor λP_L incluyen el plasmido pHUB2 (residente en la cepa JMB9 de *E. coli*, ATCC 37092) y pPLc28 (residente en *E. coli* RR1, ATCC 53082).

10

Sistemas de Levadura

Alternativamente, los polipéptidos pueden expresarse en células hospedadoras de levadura, preferiblemente del género *Saccharomyces* (v.g., *S. cerevisiae*). Pueden emplearse también otros géneros de levadura, tales como *Pichia* o 15 *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán a menudo una secuencia de origen de replicación de un plasmido de levadura 2 μ , una secuencia de replicación autónoma (ARS), una región promotora, secuencias para poliadenilación, secuencias para terminación de la transcripción, y un marcador seleccionable. Secuencias promotoras adecuadas 20 para vectores de levadura incluyen, entre otras, promotores de metalotioneína, 3-fosfoglicerato-quinasa (Hitzenman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073, 1980) u otras enzimas glucolíticas (Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149, 1968; y Holland *et al.*, *Biochem.* 17:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, hexoquinasa, 25 piruvato-descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3-fosfoglicerato-mutasa, piruvato-quinasa, triosafosfato-isomerasa, fosfoglucosa-isomerasa, y glucoquinasa. Otros vectores y promotores adecuados para uso en expresión de levadura se describen adicionalmente en Hitzenman, EPA-73657. Otra alternativa es el promotor ADH2 reprimible por glucosa, descrito por Russell *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 258:2674, 1982; y Beier *et al.*, *Nature*, 300:724, 25 1982. Vectores lanzadera replicables tanto en levadura como en *E. coli* pueden construirse por inserción de secuencias de DNA de pBR322 para selección y replicación en *E. coli* (gen Amp^r y origen de replicación) en los vectores de levadura arriba descritos.

La secuencia conductora del factor α de levadura puede emplearse para dirigir la secreción del polipéptido. La 30 secuencia conductora del factor α se inserta a menudo entre la secuencia promotora y la secuencia del gen estructural. (Kurjan *et al.*, *Cell*, 30:933, 1982; y Bitter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:5330, 1984.) Otras secuencias 35 conductoras adecuadas para facilitar la secreción de polipéptidos recombinantes por hospedadores de levadura son conocidas por los expertos en la técnica. Una secuencia conductora puede estar modificada cerca de su extremo 3' de modo que contenga uno o más sitios de restricción. Esto facilitará la fusión de la secuencia conductora al gen estructural.

Protocolos de transformación de levadura son conocidos por los expertos en la técnica. Un protocolo de este tipo ha sido descrito por Hinnen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75: 1929, 1978. El protocolo de Hinnen *et al.* selecciona 40 transformantes Trp^r en un medio selectivo, consistiendo el medio selectivo en 0,67% de base nitrogenada de levadura, 0,5% de casamino-ácidos, 2% de glucosa, 10 mg/ml de adenina y 20 mg/ml de uracilo.

Las células hospedadoras de levadura transformadas por vectores que contienen una secuencia promotora ADH2 45 pueden cultivarse para inducir la expresión en un medio "rico". Un ejemplo de un medio rico es uno consistente en 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, y 1% de glucosa suplementado con 80 mg/ml de adenina y 80 mg/ml de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 se produce cuando se agota la glucosa en el medio.

Sistemas de Mamífero o de Insecto

Pueden emplearse también sistemas de cultivo de células hospedadoras de mamífero o de insecto para expresar 50 polipéptidos recombinantes. Los sistemas de baculovirus para producción de proteínas heterólogas en células de insecto han sido revisados por Luckow *et al.* *Bio/Technology*, 6: 47, 1988. Pueden emplearse también líneas de células establecidas de origen mamífero. Ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen la línea COS-7 de células de riñón de mono (ATCC CRL1651) (Glutzman *et al.*, *Cell*, 23: 175, 1981), células L, células C127, células 3T3 (ATCC CCL163), células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, y la línea de células BHK (ATCC CRL 10), así como la línea de células CV-1/EBNA derivada de la línea de células de riñón de mono verde africano CV-1 (ATCC CCL 70) como ha sido descrito por McMahan *et al.*, *EMBO J.*, 10: 2821, 55 1991.

Métodos establecidos para la introducción de DNA en células de mamífero han sido descritos por Kaufman R.J., 60 *Large Scale Mammalian Cell Culture*, pp. 15-69, 1990. Protocolos adicionales que utilizan reactivos disponibles comercialmente, tales como el reactivo lipídico Lipofectamine (Gibco/BRL) o el reactivo lipídico Lipofectamine-Plus, 65 pueden utilizarse para transfectar células (Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 7413-7417, 1987). Adicionalmente, puede utilizarse electroporación para transfectar células de mamífero utilizando procedimientos convencionales, tales como los expuestos en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. La selección de transformantes estables puede realizarse utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como por ejemplo, resistencia a fármacos citotóxicos. Kaufman *et al.*, *Meth. in Enzymology*, 185: 487-511, 1990, describe varios esquemas de selección, tales como la resistencia a la dihidrofolato-reductasa (DHFR). Una cepa hospedadora adecuada para selección de DHFR puede ser la cepa DX-B11 de CHO, que

ES 2 325 165 T3

es deficiente en DHFR (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4216-4220, 1980). Un plásmido que expresa cDNA de DHFR puede introducirse en la cepa DX-B11, y únicamente las células que contienen el plásmido pueden crecer en el medio selectivo apropiado. Otros ejemplos de marcadores seleccionables que pueden incorporarse en un vector de expresión incluyen cDNAs que confieren resistencia a antibióticos, tales como G418 e higromicina B. Las 5 células que albergan el vector pueden seleccionarse sobre la base de la resistencia a estos compuestos.

Secuencias de control de la transcripción y la traducción para vectores de expresión en células hospedadoras de mamífero pueden ser escindidas de los genomas virales. Secuencias promotoras y secuencias intensificadoras utilizadas comúnmente se derivan del virus del poliomielitis, adenovirus 2, el virus 40 de los simios (SV40), y citomegalovirus 10 humano. Pueden utilizarse secuencias de DNA derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo, el origen, el promotor temprano y tardío, intensificador, sitio de corte y empalme, y sitios de poliadenilación de SV40 para proporcionar otros elementos genéticos para la expresión de una secuencia de gen estructural en una célula hospedadora de mamífero. Los promotores virales tempranos y tardíos son particularmente útiles debido a que ambos se obtienen fácilmente 15 a partir de un genoma viral como un fragmento que puede contener también un origen de replicación viral (Fiers *et al.*, *Nature*, 273: 113, 1978; y Kaufman, *Meth. in Enzymology*, 1990). Pueden utilizarse también fragmentos de SV40 más pequeños o mayores, con tal que esté incluida la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind*III hacia el sitio *Bgl*II localizado en el origen de replicación viral de SV40.

Secuencias de control adicionales que se ha demostrado mejoran la expresión de genes heterólogos originarios 20 de vectores de expresión de mamífero incluyen elementos tales como el elemento de aumento de expresión de la secuencia (EASE) derivado de células CHO (Morris *et al.*, *Animal Cell Technology*, pp. 529-534, 1997; y Solicitud PCT WO 97/25420) y el conductor tripartito (TPL) y RNAs del gen VA del Adenovirus 2 (Gingeras *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 13475-13491, 1982). La secuencia del sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) de origen viral permite que los mRNAs dicistrónicos se traduzcan eficientemente (Oh *et al.*, *Current Opinion in Genetics and Development*, 25 3: 295-300, 1993; y Ramesh *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 24: 2697-2700, 1996). Se ha demostrado que la expresión 30 de un cDNA heterólogo como parte de un mRNA dicistrónico seguida por el gen para un marcador seleccionable (v.g. DHFR) mejora la transfectabilidad del hospedador y la expresión del cDNA heterólogo (Kaufman, *Meth. in Enzymology*, 1990). Vectores de expresión ilustrativos que emplean mRNAs dicistrónicos son pTR-BC/GFP descrito por Mosser *et al.*, *Biotechniques*, 22: 150-161, 1997, y p2A5I descrito por Morris *et al.*, *Animal Cell Technology*, pp. 529-534, 1997.

Un vector útil de expresión alta, pCAVNOT, ha sido descrito por Mosley *et al.*, *Cell*, 59: 335-348, 1989. Otros vectores de expresión para uso en células hospedadoras de mamífero pueden construirse como ha sido descrito por Okayama *et al.* (*Mol. Cell. Biol.*, 3: 280, 1983). Un sistema útil para expresión estable de nivel alto de cDNAs de 40 mamífero en células epiteliales mamarias de murino C127 puede construirse sustancialmente como ha sido descrito por Cosman *et al.*, *Mol. Immunol.*, 23: 935, 1986. Un vector útil de alta expresión, PMLSV N1/N4, descrito por Cosman *et al.*, *Nature*, 312: 768, 1984, ha sido depositado como ATCC 38990. Vectores de expresión de mamífero útiles adicionales se describen en EP-A-0367566, y en WO 91/18982. En otra alternativa, los vectores pueden derivarse de retrovirus.

Puede utilizarse otro vector de expresión útil, pFLAG®. La tecnología FLAG® está centrada en la fusión de un péptido marcador FLAG® de peso molecular bajo (1 kD) hidrófilo, al término N de una proteína recombinante expresada por vectores de expresión pFLAG®. pDC311 es otro vector especializado utilizado para expresión de proteínas 45 en células CHO. pDC11 se caracteriza por una secuencia bicistrónica que contiene el gen de interés y un gen de dihidrofolato-reductasa (DHFR) con un sitio interno de fijación de ribosoma para traducción de DHFR, un elemento de secuencia aumentadora de la expresión (EASE), el promotor humano CMV, una secuencia conductora tripartita, y un sitio de poliadenilación.

En relación con los péptidos señal que pueden emplearse, el péptido señal nativo puede reemplazarse por un péptido 50 señal heterólogo o secuencia conductora, en caso deseado. La elección del péptido señal o conductor puede depender de factores tales como el tipo de células hospedadoras en las cuales debe producirse el polipéptido recombinante. Para ilustración, ejemplos de péptidos señal heterólogos que son funcionales en células hospedadoras de mamífero incluyen la secuencia señal para interleuquina-7 (IL-7) descrita en la Patente de los Estados Unidos 4.965.195; la secuencia señal para el receptor de interleuquina-2 descrita en Cosman *et al.*, *Nature*, 312: 768, 1984; el péptido señal 55 de receptor de interleuquina-4 descrito en EP 367.566; el péptido señal del receptor de interleuquina-1 tipo I descrito en la Patente U.S. 4.968.607; y el péptido señal del receptor de interleuquina-1 tipo II descrito en EP 460.846.

Purificación

La invención incluye también métodos de aislamiento y purificación de los polipéptidos y fragmentos de los mismos.

Aislamiento y Purificación

Los polipéptidos "aislados" o fragmentos de los mismos abarcados por esta invención son polipéptidos o fragmentos que no se encuentran en un ambiente idéntico a un ambiente en el cual aquél o aquéllos pueden encontrarse en la naturaleza. Los polipéptidos "purificados" o fragmentos de los mismos abarcados por esta invención están esen-

ES 2 325 165 T3

cialmente exentos de asociación con otras proteínas o polipéptidos, por ejemplo, como producto de purificación de sistemas de expresión recombinantes tales como los arriba descritos o como un producto purificado de una fuente no recombinante tal como células y/o tejidos existentes naturalmente.

5 En una realización preferida, la purificación de polipéptidos o fragmentos recombinantes puede realizarse utilizando fusiones de polipéptidos o fragmentos de la invención a otro polipéptido para ayudar a la purificación de los polipéptidos o fragmentos de la invención. Tales parejas de fusión pueden incluir los péptidos poli-His u otros péptidos de identificación de antígeno arriba descritos, así como los restos Fc descritos anteriormente.

10 Con respecto a cualquier tipo de célula hospedadora, como es conocido por el profesional experto, los procedimientos para purificación de un polipéptido o fragmento recombinante variarán de acuerdo con factores tales como el tipo de células hospedadoras empleado y de si el polipéptido o fragmento recombinante se secreta o no en el medio de cultivo.

15 En general, el polipéptido o fragmento recombinante puede aislarse de las células hospedadoras si no es secretado, o del medio o sobrenadante si es soluble y secretado, seguido por uno o más pasos de concentración, precipitación con sal, intercambio iónico, interacción hidrófoba, purificación por afinidad o cromatografía de exclusión de tamaños. En cuanto a vías específicas para realizar estos pasos, el medio de cultivo puede concentrarse primeramente utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después del paso de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación tal como un medio de filtración con gel. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o sustrato que tenga grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Alternativamente, puede emplearse un paso de intercambio de catión. Cambiadores de catión adecuados incluyen diversas matrices 20 insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Adicionalmente, puede emplearse un paso de cromatoforía. Alternativamente, puede emplearse un paso de cromatografía de interacción hidrófoba. Matrices adecuadas pueden ser restos fenilo u octilo unidos a resinas. Puede emplearse también cromatografía de afinidad con una matriz que fija selectivamente la proteína recombinante. Ejemplos de tales resinas empleadas son columnas de lectina, 25 columnas de tinte, y columnas de formación de quelatos metálicos. Finalmente, pueden emplearse uno o más pasos de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) que emplean medios RP-HPLC hidrófobos (v.g., gel de sílice o resina de polímero que tenga grupos metilo, octilo, octildecilo u otros grupos alifáticos colgantes) para purificar ulteriormente los polipéptidos. Algunos o la totalidad de los pasos de purificación que anteceden, en 30 diversas combinaciones, son bien conocidos y pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante aislada y purificada.

35 Es también posible utilizar una columna de afinidad que comprende una proteína de fijación de polipéptidos de la invención, tal como un anticuerpo monoclonal generado contra los polipéptidos de la invención, para purificar por afinidad los polipéptidos expresados. Estos polipéptidos pueden retirarse de la columna de afinidad utilizando técnicas convencionales, v.g., en un tampón de elución rico en sal y dializarse luego en un tampón más pobre en sal 40 para uso o por cambio de pH u otros componentes dependiendo de la matriz de afinidad utilizada, o pueden retirarse competitivamente utilizando el sustrato existente naturalmente del resto de afinidad, tal como un polipéptido derivado de la invención.

45 En este aspecto de la invención, las proteínas de fijación de polipéptidos, tales como los anticuerpos anti-polipéptidos de la invención u otras proteínas que pueden interaccionar con el polipéptido de la invención, pueden unirse a un soporte en fase sólida tal como una matriz de cromatografía en columna o un sustrato similar adecuado para identificación, separación, o purificación de células que expresan los polipéptidos de la invención en su superficie. La adherencia de las proteínas de fijación de polipéptidos de la invención a una superficie de contacto en fase sólida puede conseguirse por cualquier medio. Por ejemplo, pueden recubrirse microesferas magnéticas con estas proteínas de 50 fijación de polipéptidos y mantenerse en el recipiente de incubación mediante un campo magnético. Suspensiones de mezclas de células se ponen en contacto con la fase sólida que contiene tales proteínas de fijación de polipéptidos. Las células que contienen en su superficie los polipéptidos de la invención se unen a la proteína de fijación de polipéptidos fijada y las células no fijadas se eliminan luego por lavado. Este método de unión por afinidad es útil para purificación, cribado, o separación de la solución de tales células que expresan los polipéptidos. Métodos de liberación de células 55 seleccionadas positivamente de la fase sólida se conocen en la técnica y abarcan, por ejemplo, el uso de enzimas. Tales enzimas son preferiblemente no tóxicas y no lesivas para las células y preferiblemente están dirigidas a escindir la pareja de fijación de la superficie celular.

60 Alternativamente, mezclas de células que se sospecha contienen células expresantes de los polipéptidos de la invención pueden incubarse primeramente con una proteína biotinilada de fijación de polipéptidos de la invención. Los períodos de incubación tienen típicamente al menos una hora de duración para asegurar una fijación suficiente a los polipéptidos de la invención. La mezcla resultante se hace pasar luego a través de una columna empaquetada con cuentas recubiertas de avidina, con lo cual la afinidad alta de la biotina por la avidina proporciona la unión de las células de fijación de polipéptidos a las cuentas. El uso de cuentas recubiertas de avidina se conoce en la técnica (Berenson *et al.*, *J. Cell. Biochem.*, 10D: 239, 1986). El lavado del material no fijado y la liberación de las células fijadas se realizan utilizando métodos convencionales.

ES 2 325 165 T3

El grado deseado de pureza depende del uso propuesto de la proteína. Se desea un grado de pureza relativamente alto cuando el polipéptido debe administrarse *in vivo*, por ejemplo. En este caso, los polipéptidos se purifican de tal manera que no sea detectable banda alguna de proteína correspondiente a otras proteínas en el análisis por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE). Las personas expertas en el campo pertinente reconocerán que bandas 5 múltiples correspondientes al polipéptido pueden ser visualizadas por SDS-PAGE, debido a glicosilación diferencial, procesamiento diferencial posterior a la traducción, y métodos análogos. Muy preferiblemente, el polipéptido de la invención se purifica hasta homogeneidad sustancial, como se indica por una sola banda de proteína en el análisis por SDS-PAGE. La banda de proteína puede ser visualizada por tinción con plata, tinción con azul Coomassie, o (si la proteína está radiomarcada) por autorradiografía.

10

Ensayos

Los polipéptidos purificados de la invención (que incluyen proteínas, polipéptidos, fragmentos, variantes, oligómeros, y otras formas) pueden testarse en cuanto a la aptitud para unirse a la pareja de fijación en cualquier ensayo 15 adecuado, tal como un ensayo de fijación convencional. Para ilustración, el polipéptido puede marcarse con un reactivo detectable (v.g., un radionucleido, un cromóforo, una enzima que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica, etcétera). El polipéptido marcado se pone en contacto con las células que expresan la pareja de fijación. Las células se lavan luego para eliminar el polipéptido marcado no fijado, y la presencia del marcador fijado a las células se determina por una técnica adecuada, seleccionada de acuerdo con la naturaleza del marcador.

20

Un ejemplo de un procedimiento de ensayo de fijación es como sigue. Se construye un vector de expresión recombinante que contiene el cDNA de la pareja de fijación, utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Células CV-1-EBNA-1 en cápsulas de 10 cm² se transfectan con el vector de expresión recombinante. Las células CV-1/EBNA-1 (ATCC CRL 10478) expresan constitutivamente el antígeno-1 nuclear de EBV dirigido por el intensificador/promotor 25 de CMV inmediato-temprano. CV-1-EBNA-1 se derivó de la línea de células CV-1 de riñón del Mono Verde Africano (ATCC CRL70), como ha sido descrito por McMahan *et al.* (*EMBO J.* 10: 2821, 1991)

Las células transfectadas se cultivan durante 24 horas, y las células contenidas en cada cápsula se dividen luego 30 en una placa de 24 pocillos. Después de cultivo durante 48 horas más, las células transfectadas (aproximadamente 4 x 10⁴ células/pocillo) se lavan con BN-NFDM, que es el medio de fijación (RPMI 1640 que contiene 25 mg/ml de seroalbúmina bovina, 2 mg/ml de azida de sodio, HEPES 20 mM de pH 7,2) al cual se han añadido 50 mg/ml de leche desnatada en polvo. Las células se incuban luego durante 1 hora a 37°C con concentraciones variables de, por ejemplo, una proteína de fusión polipéptido/Fc soluble producida como se ha expuesto anteriormente. Las células se lavan luego y se incuban con una concentración de saturación constante de una IgG anti-humana ¹²⁵I de ratón en medio 35 de fijación, con agitación moderada durante 1 hora a 37°C. Después de lavado concienzudo, las células se liberan por tripsinización.

La IgG anti-humana de ratón arriba empleada está dirigida contra la región Fc de IgG humana y puede obtenerse de Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., West Grove, PA. El anticuerpo se marca con yodo radiactivo utilizando 40 el método estándar de la cloramina T. El anticuerpo se fijará a la porción Fc de cualquier polipéptido/proteína Fc que se ha fijado a las células. En todos los ensayos, la fijación inespecífica del anticuerpo marcado con ¹²⁵I se ensaya en ausencia de la proteína de fusión Fc/Fc, así como en presencia de la proteína de fusión de Fc y un exceso molar de 200 veces de anticuerpo IgG anti-humano sin marcar de ratón.

45 El anticuerpo ¹²⁵I fijado a las células se cuantifica en un contador Packard Autogamma. Los cálculos de afinidad (Scatchard, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51: 660, 1949) se generan en RS/1 (BBN Software, Boston, MA) ejecutado en un ordenador Microwax.

Otro tipo de ensayo de fijación adecuado es un ensayo de fijación competitivo. Para ilustración, la actividad biológica 50 de una variante puede determinarse por ensayo de la capacidad de la variante para competir con la proteína nativa respecto a unión a la pareja de fijación.

Los ensayos competitivos de fijación pueden realizarse por metodología convencional. Reactivos que pueden emplearse en ensayos competitivos de fijación incluyen polipéptidos radiomarcados de la invención y células intactas 55 que expresan la pareja de fijación (endógena o recombinante). Por ejemplo, puede utilizarse un fragmento de IL-1 zeta soluble radiomarcado para competir con una variante de IL-1 zeta soluble respecto a la fijación a los receptores de IL-1 zeta de la superficie celular. En lugar de células intactas, podría sustituirse una proteína de fusión pareja de fijación/Fc soluble unida a una fase sólida por la interacción de proteína A o proteína G (en la fase sólida) con el resto Fc. Columnas cromatográficas que contienen Proteína A y Proteína G incluyen las disponibles de Pharmacia Biotech, 60 Inc., Piscataway, NJ.

Otro tipo de ensayo competitivo de fijación utiliza parejas de fijación solubles radiomarcadas, tales como una 65 proteína de fusión receptor soluble de IL-1 zeta/Fc o ligando Xrec2/Fc, y células intactas que expresan la pareja de fijación. Pueden obtenerse resultados cuantitativos por ensayos competitivos de fijación en placa autoradiográfica, mientras que los gráficos Scatchard (*Scatchard, Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51: 660, 1949) pueden utilizarse para generar resultados cuantitativos.

ES 2 325 165 T3

Uso de los ácidos nucleicos u oligonucleótidos IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2, TDZ.3 Y Xrec2

Además de ser utilizados para expresar polipéptidos como se ha descrito arriba, los ácidos nucleicos de IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2, TDZ.3 y Xrec2, que incluyen DNA, RNA, mRNA y oligonucleótidos pueden utilizarse:

- como sondas para identificar ácido nucleico que codifica proteínas de las familias de ligandos y receptores de IL-1;
- para identificar los cromosomas humanos 2 y X;
- para mapear genes en los cromosomas humanos 2 y X;
- para identificar genes asociados con ciertas enfermedades, síndromes, u otras afecciones asociadas con los cromosomas humanos 2 y X;
- como oligonucleótidos monocatenarios sentido o antisentido, para inhibir la expresión de polipéptidos codificados por los genes IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2, TDZ.3 y Xrec2;
- para ayudar a la detección de genes defectuosos en un individuo; y
- para terapia génica.

Sondas

Entre los usos de los ácidos nucleicos descritos en esta memoria se encuentra el uso de fragmentos como sondas o iniciadores. Tales fragmentos comprenden por regla general al menos aproximadamente 17 nucleótidos contiguos y una secuencia de DNA. En otras realizaciones, un fragmento de DNA al menos 30, o al menos 60, nucleótidos contiguos de una secuencia de DNA.

Dado que en esta memoria se contemplan homólogos de SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 y 7 de otras especies de mamíferos, pueden utilizarse sondas basadas en las secuencias de DNA humano de SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 y 7 para cribar genotecas de cDNA derivadas de otras especies de mamíferos, utilizando técnicas de hibridación convencionales de especies cruzadas.

Utilizando el conocimiento del código genético en combinación con las secuencias de aminoácidos arriba identificadas, pueden prepararse series de oligonucleótidos degenerados. Tales oligonucleótidos son útiles como iniciadores, v.g., en reacciones en cadena de polimerasa (PCR), por las cuales se aíslan y amplifican fragmentos de DNA.

Mapeado Cromosómico

La totalidad o una porción de los ácidos nucleicos de IL-1 zeta de SEQ ID NO: 1 o variantes de corte y empalme de IL-1 zeta de SEQ ID NOs: 5, 6 y 7, con inclusión de oligonucleótidos, pueden ser utilizados por los expertos en la técnica empleando métodos bien conocidos para identificar el cromosoma humano 2, así como el locus específico del mismo, que contiene el DNA de miembros de la familia de ligandos de IL-1. Adicionalmente, la totalidad o una porción de los ácidos nucleicos de Xrec2 de SEQ ID NO: 2, con inclusión de oligonucleótidos, pueden utilizarse para identificar el cromosoma humano X, así como el locus específico del mismo que contiene el DNA de miembros de la familia de receptores de IL-1. Técnicas útiles incluyen, pero sin carácter limitante, la utilización de la secuencia o porciones, con inclusión de oligonucleótidos, como sonda en diversos métodos bien conocidos tales como el mapeado de híbridos por radiación (resolución alta), hibridación *in situ* a extensiones de cromosomas (resolución moderada), e hibridación por transferencia Southern a líneas de células híbridas que contienen cromosomas humanos individuales (resolución baja).

Por ejemplo, los cromosomas pueden mapearse por hibridación con radiación. La PCR se realiza utilizando el panel de 93 híbridos de radiación de Whitehead Institute/MIT Center for Genome Research Genebridge 4 (http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/human_STS_releases/july97/rhmap/genebridge4.html). Se utilizan iniciadores que están situados dentro de un exón supuesto del gen de interés y que amplifican un producto de DNA genómico humano, pero no amplifican DNA genómico de hámster. Los resultados de las PCRs se convierten en un vector de datos que se somete al sitio Whitehead/MIT Radiation Mapping en Internet (<http://www-seq.wi.mit.edu>). Los datos se registran y se proporciona la asignación y la ubicación cromosómica relativas a los marcadores conocidos Sequence Tag Site (STS) en el mapa del híbrido de radiación. El sitio de la web siguiente proporciona información adicional acerca del mapeado de híbridos con radiación: http://www-genome.wi.mit.edu/ftp/distribution/hurnan_STS_releases/july97/07-97.INTRO.html.

Identificación de Enfermedades Asociadas

Como se indica más adelante, los ácidos nucleicos de IL-1 zeta de SEQ ID NO: 1 y las variantes de corte y empalme de IL-1 zeta de SEQ ID NOs: 5, 6 y 7 han sido mapeados por hibridación con radiación y secuenciación por perdigonada de alta potencia a la región 2q11-12 del cromosoma humano 2. El cromosoma humano 2 está asociado

ES 2 325 165 T3

con enfermedades específicas que incluyen, pero sin carácter limitante, glaucoma, displasia ectodérmica, diabetes mellitus dependiente de insulina, síndrome de piel arrugada, leucemia/linfoma de células T, y distrofia tibial muscular. Los ácidos nucleicos de Xrec 2 de SEQ ID NO: 2 se han mapeado por hibridación con radiación y secuenciación por perdigonada de alta potencia a la región Xp22 del cromosoma humano X. El cromosoma humano X está asociado 5 con retinosquisis, lisencefalía, heteropía laminar subcortical, retardo mental, síndrome de Cowchock, síndrome de Bazex, hipertricosis, síndrome linfoproliferativo, inmunodeficiencia, displasia mesomélica de Langer, y leucemia. Así pues, los ácidos nucleicos de SEQ ID NOs: 1, 5, 6, 7, y 2 o un fragmento de los mismos pueden ser utilizados 10 por un experto en la técnica empleando métodos bien conocidos para analizar anomalías asociadas con el mapeado de genes a los cromosomas 2 y X. Esto hace posible diferenciar las condiciones en las cuales este marcador se reordena o se deleciona. Adicionalmente, pueden utilizarse moléculas de ácido nucleico de SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6, y 7 o un fragmento de las mismas como marcador posicional para mapear otros genes de localización desconocida.

El DNA puede utilizarse en el desarrollo de tratamientos para cualquier trastorno mediado (directa o indirectamente) 15 por cantidades defectuosas, o insuficientes de los genes correspondientes a los ácidos nucleicos de la invención. La descripción en esta memoria de secuencias nativas de nucleótidos permite la detección de genes defectuosos, y el reemplazamiento de los mismos con genes normales. Los genes defectuosos pueden detectarse en ensayos de diagnóstico *in vitro*, y por comparación de una secuencia nativa de nucleótidos descrita en esta memoria con la de un gen derivado de una persona sospechosa de albergar un defecto en este gen.

20

Sentido-Antisentido

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos incluyen oligonucleótidos sentido o antisentido que comprenden 25 una secuencia monocatenaria de ácido nucleico (RNA o DNA) capaz de fijarse a secuencias diana de mRNA (sentido) o DNA (sentido). Los nucleótidos antisentido o sentido pueden comprender un fragmento del DNA (SEQ ID NOs: 1, 2, 5, 6 y 7). Un fragmento de este tipo comprende por regla general al menos aproximadamente 14 nucleótidos, con preferencia desde aproximadamente 14 a aproximadamente 30 nucleótidos. La capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basado en una secuencia de cDNA que codifica una proteína dada se describe, por ejemplo, en Stein *et al.*, *Cancer Res.*, 48: 2659, 1988; y van der Krol *et al.*, *BioTechniques*, 6: 958-1988.

30

La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido a secuencias de ácido nucleico diana da como resultado la formación de dúplex que bloquean o inhiben la expresión de proteínas por uno de varios medios, que incluyen degradación aumentada del mRNA por RNAsaH, inhibición de corte y empalme, terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. Los oligonucleótidos antisentido pueden utilizarse así para bloquear la expresión 35 de proteínas. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden adicionalmente oligonucleótidos que tienen cadenas principales azúcar-fosfodiéster modificadas (u otros enlaces azúcar, tales como los descritos en WO91/06629) y en donde tales enlaces azúcar son resistentes a las nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces azúcar resistentes son estables *in vivo* (*es decir* capaces de resistir la degradación enzimática) pero retienen la especificidad de secuencia de modo que son capaces de fijarse a secuencias de nucleótidos diana.

40

Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que están enlazados covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10448, y otros restos que aumentan la afinidad del oligonucleótido para una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L-lisina). Y aún más, agentes de intercalación, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos pueden unirse a los oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar especificidades de fijación del oligonucleótido antisentido o sentido respecto a la secuencia del nucleótido diana.

45

Los oligonucleótidos antisentido o sentido pueden introducirse en una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico diana por cualquier método de transferencia génica, con inclusión, por ejemplo, de lipofección, transfección 50 de DNA mediada por CaPO₄, electroporación, o por utilización de vectores de transferencia de genes tales como el virus Epstein-Barr.

55

Los oligonucleótidos sentido o antisentido pueden introducirse también en una célula que contenga la secuencia del nucleótido diana por formación de un conjugado con una molécula de fijación de ligandos, como se describe en WO 91/04753. Moléculas adecuadas de fijación de ligando incluyen, pero sin carácter limitante, receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se fijan a receptores de la superficie celular. Con preferencia, la conjugación de la molécula de fijación de ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de fijación de ligandos para fijarse a su molécula o receptor correspondiente, o bloquear la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

60

Alternativamente, un oligonucleótido sentido o antisentido puede introducirse en una célula que contenga la secuencia de ácido nucleico diana por formación de un complejo oligonucleótido-lípido, como se describe en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido es disociado preferiblemente dentro de la célula por una lipasa endógena.

65

ES 2 325 165 T3

Uso de los polipéptidos y polipéptidos fragmentados IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2, TDZ.3 Y Xrec2

Los usos incluyen, pero sin carácter limitante, los siguientes:

- 5 - Purificación de proteínas y medición de la actividad de las mismas
- Agentes de suministro (sic)
- Reactivos terapéuticos y de investigación
- 10 - Control para fragmentación de péptidos
- Identificación de proteínas desconocidas
- 15 - Preparación de anticuerpos

Reactivos de Purificación

Cada uno de los polipéptidos encuentra uso como un reactivo de concentración de proteínas. Los polipéptidos 20 pueden estar unidos a un material soporte sólido y utilizarse para purificar las proteínas parejas de fijación por cromatografía de afinidad. En realizaciones particulares, un polipéptido (en cualquier forma descrita en esta memoria que sea capaz de fijarse a la pareja de fijación) está unido a un soporte sólido por procedimientos convencionales. Como ejemplo, están disponibles columnas cromatográficas que contienen grupos funcionales que reaccionarán con los grupos funcionales de las cadenas laterales de aminoácidos de las proteínas (Pharmacia Biotech., Inc., Piscataway, NJ).
25 En una alternativa, un polipéptido/proteína Fc (como se ha expuesto anteriormente) se fija a columnas cromatográficas que contienen proteína A o proteína G por interacción con el resto Fc.

El polipéptido encuentra aplicación también en la purificación o identificación de células que expresan la pareja 30 de fijación en la superficie celular. Los polipéptidos se fijan a una fase sólida tal como una matriz de cromatografía en columna o un sustrato similar adecuado. Por ejemplo, pueden recubrirse microesferas magnéticas con los polipéptidos y mantenerse en un recipiente de incubación mediante un campo magnético. Suspensiones de mezclas de células que contienen las células que expresan la pareja de fijación se ponen en contacto con la fase sólida que contiene los polipéptidos. Las células que expresan la pareja de fijación en la superficie celular se unen a los polipéptidos fijados, y las células no unidas se eliminan luego por lavado.
35

Alternativamente, los polipéptidos pueden conjugarse a un resto detectable, incubándose luego con las células a testar respecto a la expresión de la pareja de fijación. Después de la incubación, el material marcado no fijado se retira y se determina la presencia o ausencia del resto detectable en las células.

40 En otra alternativa, mezclas de células que se sospecha contienen células que expresan la pareja de fijación se incuban con polipéptidos biotinilados. Los períodos de incubación son típicamente al menos de 1 hora de duración para asegurar una fijación suficiente. La mezcla resultante se hace pasar luego a través de una columna rellena con cuentas recubiertas de avidina, con lo que la alta afinidad de la biotina por la avidina proporciona la unión de las células deseadas a las cuentas. Se conocen procedimientos para utilización de cuentas recubiertas de avidina (Berenson *et al.*, 45 *J. Cell. Biochem.*, 10D: 239, 1986). El lavado para eliminar el material no fijado, y la liberación de las células fijadas, se realizan utilizando métodos convencionales.

Medición de la Actividad

50 Los polipéptidos encuentran uso también en la medición de la actividad biológica de la proteína pareja de fijación en términos de su afinidad de fijación. Los polipéptidos pueden ser empleados por tanto por quienes realizan estudios de “aseguramiento de la calidad”, v.g. para monitorizar la vida útil y la estabilidad de las proteínas en condiciones diferentes. Por ejemplo, los polipéptidos pueden emplearse en un estudio de afinidad de fijación para medir la actividad biológica de una proteína pareja de fijación que se ha mantenido a temperaturas diferentes, o se ha producido en tipos 55 de células diferentes. Las proteínas pueden utilizarse también para determinar si se retiene la actividad biológica después de la modificación de una proteína pareja de fijación (v.g., modificación química, truncación, mutación, etc.). La afinidad de fijación de la proteína pareja de fijación modificada se compara con la de una proteína pareja de fijación sin modificar para detectar cualquier impacto adverso de las modificaciones en la actividad biológica de la pareja de fijación. La actividad biológica de una proteína pareja de fijación puede comprobarse así antes de utilizar la misma en un estudio de investigación, por ejemplo.
60

Agentes de Suministro

Los polipéptidos encuentran uso también como vehículos para suministro de agentes fijados a los mismos a células 65 que contienen la pareja de fijación. Los polipéptidos pueden utilizarse por tanto para suministrar agentes diagnósticos o terapéuticos a tales células (o a otros tipos de células que se ha encontrado expresan la pareja de fijación en la superficie celular) en procedimientos *in vitro* o *in vivo*.

ES 2 325 165 T3

Agentes detectables (diagnósticos) y terapéuticos que pueden fijarse a un polipéptido incluyen, pero sin carácter limitante, toxinas, otros agentes citotóxicos, fármacos, radionucleidos, cromóforos, enzimas que catalizan una reacción colorimétrica o fluorométrica, y análogos, seleccionándose el agente particular de acuerdo con la aplicación propuesta. Entre las toxinas se encuentran ricina, abrina, toxina de la difteria, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, proteínas de desactivación de ribosomas, micotoxinas tales como tricotecenos, y derivados y fragmentos (v.g., cadenas simples) de las mismas. Radionucleidos adecuados para uso diagnóstico incluyen, pero sin carácter limitante, ¹²³I, ¹³¹I, ^{99m}TC, ¹¹¹In y ⁷⁶Br. Ejemplos de radionucleidos adecuados para uso terapéutico son ¹³¹I, ²¹¹At, ⁷⁷Br, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹²Pb, ²¹²Bi, ¹⁰⁹Pd, ⁶⁴Cu, y ⁶⁷Cu.

Dichos agentes pueden fijarse al polipéptido por cualquier procedimiento convencional adecuado. El polipéptido comprende grupos funcionales en cadenas laterales de aminoácidos que pueden hacerse reaccionar con grupos funcionales en un agente deseado para formar enlaces covalentes, por ejemplo. Alternativamente, la proteína o agente puede derivatizarse para generar o fijar un grupo funcional reactivo deseado. La derivatización puede implicar la fijación de uno de los reactivos de acoplamiento bifuncionales disponibles para fijación de diversas moléculas a proteínas (Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois). Se conocen varias técnicas para radiomarcación de proteínas. Por ejemplo, pueden fijarse radionucleidos metálicos a polipéptidos utilizando un agente adecuado de formación de quelatos bifuncionales.

De este modo se preparan conjugados que comprenden polipéptidos y un agente diagnóstico o terapéutico adecuado (de modo preferible unido covalentemente). Los conjugados se administran o se emplean de cualquier otro modo en una cantidad apropiada para la aplicación particular.

Agentes Terapéuticos

Los polipéptidos de la invención pueden utilizarse en el desarrollo de tratamientos para cualquier trastorno mediado (directa o indirectamente) por cantidades defectuosas, o insuficientes de los polipéptidos. Estos polipéptidos pueden administrarse un mamífero affligido con un trastorno de este tipo.

Los polipéptidos pueden emplearse también en la inhibición de una actividad biológica de la pareja de fijación, en procedimientos *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, un polipéptido receptor de Xrec2 purificado puede utilizarse para inhibir la fijación del ligando de Xrec2 a un receptor endógeno de Xrec2 de la superficie celular, o puede utilizarse un polipéptido IL-1 zeta purificado, o cualquiera de sus variantes de corte y empalme para inhibir la fijación de IL-1 zeta endógena o variantes de corte y empalme a su receptor de la superficie celular. De este modo se inhiben los efectos biológicos que resultan de la fijación del ligando de Xrec2 a los receptores endógenos de Xrec2.

Los polipéptidos de la invención pueden administrarse a un mamífero para tratar un trastorno mediado por la pareja de fijación. Tales trastornos mediados por la pareja de fijación incluyen afecciones causadas (directa o indirectamente) o exacerbadas por la pareja de fijación.

Las composiciones de la presente invención pueden contener un polipéptido en cualquier forma descrita en esta memoria, tal como proteínas nativas, variantes, derivados, oligómeros, y fragmentos biológicamente activos. En realizaciones particulares, la composición comprende un polipéptido soluble o un oligómero que comprende polipéptidos solubles de la invención.

Regiones particulares de interés en el polipéptido IL-1 zeta pueden derivarse del modelo molecular proporcionado en la Figura 2, que representa la estructura secundaria de la molécula. El modelo está basado en las estructuras cristalinas de IL-1 β e IL-1ra. En la figura, las cadenas β se muestran en color amarillo, indicándose su dirección por la punta de flecha. Las vueltas β se muestran en color azul, y las espirales se muestran en color verde. El modelo demuestra que es posible superponer la estructura de IL-1 zeta sobre la estructura de IL-1 β e IL-1ra sin deformar la molécula. El alto grado de confianza en este modelo molecular permite utilizar el mismo en el diseño racional de fármacos para generar moléculas terapéuticas derivadas de IL-1 zeta.

En esta memoria se proporcionan composiciones que comprenden una cantidad eficaz de un polipéptido de la presente invención, en combinación con otros componentes tales como un diluyente, vehículo, o excipiente fisiológicamente aceptable. Los polipéptidos pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos utilizados para preparar composiciones farmacéuticamente útiles. Los mismos pueden combinarse en mezcla, sea como el material activo único o con otros materiales activos conocidos adecuados para una indicación dada, con diluyentes farmacéuticamente aceptables (v.g., solución salina, Tris-HCl, acetato, y soluciones tamponadas con fosfato), conservantes (v.g., timosal, alcohol benzílico, parabenos), emulsionantes, solubilizantes, adyuvantes y/o vehículos. Formulaciones adecuadas para composiciones farmacéuticas incluyen las descritas en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, edición 16^a, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1980.

Adicionalmente, tales composiciones pueden complejarse con polietilenglicol (PEG), iones metálicos, o incorporarse en compuestos polímeros tales como poli(ácido acético), poli(ácido glicólico); hidrogeles, dextrano, etc., o incorporarse en liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, sombras de eritrocitos o esferoblastos. Dichas composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo*, y la tasa de aclaramiento *in vivo*, y se eligen por tanto de acuerdo con la aplicación propuesta.

ES 2 325 165 T3

Las composiciones de la invención pueden administrarse de cualquier manera adecuada, v.g., por vías tópica, parenteral, o por inhalación. El término "parenteral" incluye inyección, v.g., por las rutas subcutánea, intravenosa, o intramuscular, incluyendo también la administración localizada, v.g., en un sitio de enfermedad o lesión. Se contempla también la liberación sostenida por medio de implantes. Un experto en la técnica pertinente reconocerá que las 5 dosis adecuadas variarán, dependiendo de factores tales como la naturaleza del trastorno a tratar, el peso corporal del paciente, la edad, y el estado general, así como la ruta de administración.

Las dosis preliminares pueden determinarse de acuerdo con tests en animales, y la escalación de las dosis para administración humana se realiza de acuerdo con prácticas aceptadas en la técnica.

10 Se contemplan también composiciones que comprenden ácidos nucleicos en formulaciones fisiológicamente aceptables. El DNA puede formularse para inyección, por ejemplo.

Agentes de Investigación

15 Otro uso de los polipéptidos descritos en esta memoria es como herramienta de investigación para el estudio de los efectos biológicos que son resultado de las interacciones de IL-1 zeta, o cualquiera de sus variantes de corte y empalme, con su pareja de fijación, y de Xrec2 con su pareja de fijación, o de la inhibición de estas interacciones, en tipos de células diferentes. Los polipéptidos pueden emplearse también en ensayos *in vitro* para detección de IL-1 20 zeta, Xrec2, las parejas de fijación respectivas o las interacciones de las mismas.

Los polipéptidos descritos en esta memoria pueden utilizarse para estudiar la transducción de señales celulares. 25 Los ligandos y receptores de la familia IL-1 juegan un papel fundamental en la protección contra la infección y las respuestas inmunitarias de inflamación que incluyen transducción de señales celulares, activación de células endoteliales vasculares y linfocitos, inducción de citoquinas inflamatorias, proteínas de fase aguda, hematopoyesis, fiebre, resorción ósea, prostaglandinas, metaloproteinasas, y moléculas de adhesión. Con el aumento continuado en el número 30 de miembros de la familia de IL-1 conocidos, un esquema de clasificación adecuado es uno basado en la comparación de la estructura y la función de los polipéptidos (activación y propiedades reguladoras). Así pues, IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2, y TDZ.3, al igual que otros ligandos de la familia IL-1 (IL-1 α , IL-1 β , e IL-18) y Xrec2, al igual que otros receptores de la familia IL-1R (IL-1R1, IL-1RII, IL-1rp1, y AcPL), podrían estar implicados probablemente en muchas de 35 las funciones arriba indicadas así como promover respuestas inflamatorias y estar implicados quizás por consiguiente en la etiología y el mantenimiento de las enfermedades inflamatorias y/o autoinmunes tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, y psoriasis. Como tales, las alteraciones en la expresión y/o activación de los polipéptidos descritos en esta memoria pueden tener efectos profundos sobre una plétora de procesos multicelulares que incluyen, pero sin carácter limitante, activación o inhibición de respuestas específicas de las células y proliferación 40 celular. La expresión de IL-1 zeta clonada, TDZ.1, TDZ.2, TDZ.3, Xrec2, o de mutantes funcionalmente inactivos de la misma puede utilizarse para identificar el papel que juega una proteína particular en la mediación de sucesos de señalización específicos.

La señalización celular implica a menudo una cascada de activación molecular, durante la cual un receptor pro 45 paga una señal mediada ligando-receptor por activación específica de quinasas intracelulares que fosforilan sustratos diana. Estos sustratos pueden ser a su vez quinasas que llegan a activarse después de la fosforilación. Alternativamente, aquéllos pueden ser moléculas adaptadoras que facilitan la señalización aguas abajo por interacción proteína-proteína subsiguiente a la fosforilación. Cualquiera que sea la naturaleza de la o las moléculas sustrato, versiones 50 funcionalmente activas expresadas de Xrec2, variantes de corte y empalme de IL-1 zeta, IL-2 zeta, y sus parejas de fijación pueden utilizarse para identificar qué sustrato o sustratos han sido reconocidos y activados por los polipéptidos de la invención. Como tales, estos nuevos polipéptidos pueden ser utilizados como reactivos para identificar nuevas moléculas implicadas en caminos de transducción de señales.

Identificación de Proteínas Desconocidas

Una huella dactilar de péptido o polipéptido puede introducirse en o compararse con una base de datos de proteínas 50 conocidas para ayudar a la identificación de la proteína desconocida utilizando espectrometría de masas (W.J. Henzel *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5011, 5015, 1993; Fenyo *et al.*, *Electrophoresis*, 19: 998-1005, 1998). Una diversidad de programas de software de ordenador para facilitar estas comparaciones están accesibles en Internet, tales 55 como Protein Prospector (sitio de Internet: prospector.usc.edu), Multident (sitio de Internet: www.expasy.ch/sprot/multident.html), PeptideSearch (sitio de Internet: www.mann.embl-heidelberg.de...deSearch/FR_PeptideSearch/Form.html), y ProFound (sitio de Internet: www.chait-sgi.rochester.edu/cgi-bin/prot-id-frag.html). Estos programas permiten al usuario especificar el agente de escisión y los pesos moleculares de los péptidos fragmentados dentro de 60 una tolerancia determinada. Los programas comparan los pesos moleculares observados con pesos moleculares de péptidos predichos derivados de bases de datos de secuencias para ayudar a la determinación de la identidad de la proteína desconocida.

Adicionalmente, un producto digerido de polipéptido o péptido puede secuenciarse utilizando espectrometría de masas en tandem (MS/MS) y la secuencia resultante puede investigarse contra bases de datos (Eng *et al.*, *J. Am. Soc. Mass Spec.*, 5:976-989, 1994; M. Mann *et al.*, *Anal. Chem.*, 66:4390-4399, 1994; y J.A. Taylor *et al.*, *Rapid Comm. Mass Spec.*, 11:1067-1075, 1997). Programas de búsqueda que pueden utilizarse en este proceso existen en Internet, tales como Lutefisk 97 (sitio de Internet: www.lsbc.com:70/Lutefisk97.html), y los programas Protein Prospector, Peptide Search y ProFound descritos anteriormente.

ES 2 325 165 T3

Por consiguiente, la adición de la secuencia de un gen y su secuencia proteínica predicha y fragmentos peptídicos a una base de datos de secuencias puede contribuir a la identificación de proteínas desconocidas utilizando espectrometría de masas.

5 Anticuerpos

Se proporcionan en esta memoria anticuerpos que son inmunorreactivos con los polipéptidos de la invención. Tales anticuerpos se fijan específicamente a los polipéptidos por la vía de los sitios de fijación de antígeno del anticuerpo (en oposición a la fijación inespecífica). Así pues, los polipéptidos, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., como se ha indicado arriba pueden emplearse como "inmunógenos" en la producción de anticuerpos inmunorreactivos con ellos. Más específicamente, los polipéptidos, fragmentos, variantes, proteínas de fusión, etc., contienen determinantes o epítopes antigenicos que suscitan la formación de anticuerpos.

Estos determinantes antigenicos o epítopes pueden ser lineales o de conformación (discontinuos). Los epítopes lineales están compuestos de una sección simple de aminoácidos del polipéptido, mientras que los epítopes de conformación o discontinuos están compuestos de secciones de aminoácidos de diferentes regiones de la cadena del polipéptido que se sitúan en proximidad estrecha después del plegado de la proteína (C.A. Janeway, Jr. y P. Travers, *ImmunoBiology*, 3: 9, Garland Publishing Inc., 2^a edición, 1996). Dado que las proteínas plegadas tienen superficies complejas, el número de epítopes disponible es muy numeroso; sin embargo, debido a la conformación de la proteína y a impedimentos estéricos, el número de anticuerpos que se fijan actualmente a los epítopes es menor que el número de epítopes disponibles (C.A., Janeway, Jr. y P. Travers, *ImmunoBiology*, 2: 14, Garland Publishing Inc., 2^a edición, 1996). Los epítopes pueden identificarse por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica.

Los epítopes antigenicos de los polipéptidos de la invención son útiles para generación de anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, como se describe con mayor detalle más adelante. Adicionalmente, los epítopes de los polipéptidos de la invención pueden utilizarse como reactivos de investigación, en ensayos, y para purificación de anticuerpos específicos de fijación de sustancias tales como sueros policlonales o sobrenadantes de hibridomas cultivados. Tales epítopes o variantes de los mismos pueden producirse utilizando métodos bien conocidos en la técnica tales como síntesis en fase sólida, escisión química o enzimática de un polipéptido, o utilización de tecnología de DNA recombinante. En cuanto a los anticuerpos que pueden ser provocados por los epítopes de los polipéptidos de la invención, tanto si los epítopes han sido aislados como si forman parte de los polipéptidos, pueden prepararse anticuerpos tanto policlonales como monoclonales por técnicas convencionales. Véase, por ejemplo, Kennet *et al.* (eds.), *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Nueva York, 1980; y Harlow y Land (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Se contemplan también en esta memoria líneas de células de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales específicos para los polipéptidos de la invención. Tales hibridomas pueden producirse e identificarse por técnicas convencionales. Un método para la producción de una línea de células de hibridoma de este tipo comprende inmunizar un animal con un polipéptido; cosechar células del bazo del animal inmunizado; fusionar dichas células de bazo con una línea de células de mieloma, generando con ello células de hibridoma; e identificar una línea de células de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se fija al polipéptido. Los anticuerpos monoclonales pueden recuperarse por técnicas convencionales.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos quiméricos, v.g., versiones humanizadas de anticuerpos monoclonales murinos. Tales anticuerpos humanizados pueden prepararse por técnicas conocidas y ofrecen la ventaja de una inmunogenicidad reducida cuando los anticuerpos se administran a humanos. En una realización, un anticuerpo monoclonal humanizado comprende la región variable de un anticuerpo murino (o precisamente el sitio de fijación de antígeno del mismo) y una región constante derivada de un anticuerpo humano. Alternativamente, un fragmento de anticuerpo humanizado puede comprender el sitio de fijación de antígeno de un anticuerpo monoclonal murino y un fragmento de región variable (que carece del sitio de fijación de antígeno) derivado de un anticuerpo humano. Procedimientos para la producción de anticuerpos quiméricos y otros anticuerpos monoclonales modificados por ingeniería genética incluyen los descritos en Riechmann *et al.*, *Nature*, 322: 323, 1988; Liu *et al.*, *PNAS*, 84: 3439, 1987; Larrick *et al.*, *BioTechnology*, 7: 934, 1989; y Winter *et al.*, *TIPS*, 14: 139, 1993. Procedimientos para generar anticuerpos transgénicamente pueden encontrarse en GB 2.272.440, en las Patentes US núms. 5.569.825 y 5.545.806, y patentes afines que reivindican prioridad respecto a las mismas.

Están abarcados también por la presente invención fragmentos de fijación de antígeno de los anticuerpos, que pueden producirse por técnicas convencionales. Ejemplos de tales fragmentos incluyen, pero sin carácter limitante, fragmentos Fab y F(ab')₂. Se proporcionan también fragmentos de anticuerpos y derivados producidos por técnicas de ingeniería genética.

En una realización, los anticuerpos son específicos para los polipéptidos de la presente invención y no reaccionan de manera cruzada con otras proteínas. Procedimientos de cribado por los cuales pueden identificarse tales anticuerpos son bien conocidos, y pueden implicar cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo.

Usos de los Mismos

Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse en ensayos para detectar la presencia de los polipéptidos o fragmentos de la invención, sea *in vitro* o *in vivo*. Los anticuerpos pueden emplearse también en la purificación de 5 polipéptidos o fragmentos de la invención por cromatografía de inmunofijación.

Aquellos anticuerpos que pueden bloquear adicionalmente la fijación de los polipéptidos de la invención a la pareja de fijación pueden utilizarse para inhibir una actividad biológica que sea resultado de dicha fijación. Tales anticuerpos bloqueantes pueden identificarse utilizando cualquier procedimiento de ensayo adecuado. Alternativamente, los 10 anticuerpos bloqueantes pueden identificarse en ensayos respecto a la capacidad de inhibir un efecto biológico que es resultado de la fijación de los polipéptidos de la invención a sus parejas de fijación a las células diana. Los anticuerpos pueden ensayarse respecto a la aptitud para inhibir la lisis celular mediada por IL-1 zeta, mediada por Xrec2, o mediada por la pareja de fijación, por ejemplo.

15 Un anticuerpo de este tipo puede emplearse en un procedimiento *in vitro*, o administrarse *in vivo* para inhibir una actividad biológica mediada por la entidad que generó el anticuerpo. De este modo pueden tratarse trastornos causados o exacerbados (directa o indirectamente) por la interacción de los polipéptidos de la invención con la pareja de fijación. Un método terapéutico implica la administración *in vivo* de un anticuerpo bloqueante a un mamífero en una cantidad 20 eficaz para inhibir una actividad biológica mediada por una pareja de fijación. Generalmente se prefieren anticuerpos monoclonales para uso en tales métodos terapéuticos. En una realización, se emplea un fragmento de anticuerpo de fijación de antígeno.

25 Los anticuerpos pueden cribarse respecto a propiedades agonistas (es decir, mimetizadoras de ligandos). Tales anticuerpos, después de la fijación a un receptor de la superficie celular, inducen efectos biológicos (v.g., transducción de señales biológicas) similares a los efectos biológicos inducidos cuando se fija IL-1 a receptores de IL-1 en la superficie celular. Los anticuerpos agonistas pueden utilizarse para activar células endoteliales vasculares y linfocitos, inducir destrucción de tejido local y fiebre (Janeway *et al.*, 1996), estimular los macrófagos y células endoteliales vasculares para producir IL-6, y regular en sentido creciente moléculas que se encuentran en la superficie de las 30 células endoteliales vasculares.

30 Se proporcionan en esta memoria composiciones que comprenden un anticuerpo que está dirigido contra los polipéptidos de la invención, y un diluyente, excipiente, o vehículo fisiológicamente aceptable. Componentes adecuados de dichas composiciones son como se ha descrito arriba para composiciones que contienen los polipéptidos de la invención.

35 Se proporcionan también en esta memoria conjugados que comprenden un agente detectable (v.g., diagnóstico) o terapéutico, unido al anticuerpo. Ejemplos de tales agentes se han presentado arriba. Los conjugados encuentran aplicación en procedimientos tanto *in vivo* como *in vitro*.

40 Los ejemplos que siguen se proporcionan para ilustrar adicionalmente realizaciones particulares de la invención, y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención. Debe indicarse que IL-1 zeta, TDZ.1, TDZ.2 y TDZ.3 no caen dentro del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Aislamiento de los Ácidos Nucleicos de IL-1 zeta y Xrec2

50 La secuencia del ácido nucleico de IL-1 zeta humana se obtuvo por secuenciación del clon EST IMAGE, 1.628.761, acceso #AI014548) que codifica un marco de lectura parcial abierto (ORF). Se criaron varias genotecas de cDNA con iniciadores internos para determinar el patrón de expresión del polipéptido. Después de realizar la PCR utilizando dos iniciadores internos de la secuencia de IL-1 zeta humana, las genotecas de cDNA siguientes resultaron positivas respecto a las secuencias de IL-1 zeta: estromal de médula ósea, tumor pancreático humano, y Raji (línea de células D). Los clones de IL-1 zeta se aislaron de las secuencias DNA genómico humano, genotecas estromales de la médula ósea y de tumor de páncreas humano, y se secuencian.

55 Se obtuvieron secuencias de Xrec2 humana por secuenciación de alta potencia, PCR, y reacciones 5' RACE. La secuenciación por perdigonada de alta potencia de la región cromosómica Xp11 produjo secuencias para los exones 4-6 de Xrec2 (números de acceso a GenBank AL031466 y AL031575). Análogamente, la secuencia de la región cromosómica Xp2-164-166 (número de acceso a GenBank AC005748) proporcionó secuencias para los exones 10-12 de Xrec2.

60 Se llevó a cabo una PCR (40 ciclos) sobre cDNA monocatenario de cerebro humano utilizando iniciadores (10 picomoles/reacción) con los exones 5 y 11 y polimerasa Hotstar Taq) (Qiagen, Valencia, CA), generando una secuencia para los exones 7-9. Las reacciones 5' RACE se llevaron a cabo luego utilizando cDNA de testículos e iniciadores anidados dentro del exón 4 para obtener las secuencias del exón 3 que contenían la metionina iniciadora predicha. Tanto la PCR como las reacciones RACE 5' se efectuaron utilizando protocolos estándar.

ES 2 325 165 T3

Ejemplo 2

Uso de los Polipéptidos IL-1 zeta y Xrec2 Purificados

5 *ELISA Específico del Polipéptido*

Se recubren diluciones seriadas de muestras que contienen IL-1 zeta o Xrec2 (en NaHCO₃ 50 mM, llevado a pH 9 con NaOH), en placas de microtitulación Linbro/Titertek de 96 pocillos con fondo plano E.I.A. (ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH) a 100:1/pocillo. Después de incubación a 4°C durante 16 horas, se lavan los pocillos 6 veces con PBS 200:1 que contiene 0,05% de Tween-20 (PBS-Tween). Los pocillos se incuban luego con la pareja de fijación FLAG® a razón de 1 mg/ml en PBS-Tween con 5% de suero de ternero fetal (FCS) durante 90 minutos (100:1 por pocillo), seguido por lavado como anteriormente. A continuación, se incuba cada pocillo con el anti-FLAG® (anticuerpo monoclonal M2 a 1 mg/ml en PBS-Tween que contiene 5% de FCS durante 90 minutos (100:1 por pocillo), seguido por lavado como anteriormente. A continuación, se incuban los pocillos con un anticuerpo policlonal de cabra específico anti-IgG 1 conjugado a peroxidasa de rábano picante) (una dilución 1:5000 del stock comercial en PBS-Tween que contiene 5% de FCS) durante 90 minutos (100:1 por pocillo). El anticuerpo conjugado a HRP se obtiene de Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama. Los pocillos se lavan luego seis veces, como anteriormente.

20 Para el desarrollo del ensayo ELISA, se añade a los pocillos una mezcla de sustrato [100:1 por pocillo de una premezcla 1:1 del Sustrato de Peroxidasa TNB y solución B de peroxidasa (Kirkegaard Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland)]. Después de una reacción de color suficiente, la reacción enzimática se termina por adición de H₂SO₄ 2N (50:1 por pocillo). La intensidad de color (que indica la fijación ligando-receptor) se determina por medición de la extinción a 450 nm en un lector de placas V Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

25

Ejemplo 3

Secuencias de Aminoácidos

30

Las secuencias de aminoácidos de IL-1 zeta y Xrec2 se determinaron por traducción de las secuencias nucleotídicas completas de SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente.

35 Ejemplo 4

Secuencias de DNA y Aminoácidos

40 Las secuencias de ácido nucleico de IL-1 zeta y Xrec2 se determinaron por secuenciación estándar bicatenaria de la secuencia compuesta de los clones EST IMAGE (acceso #AI014548 (IL-1 zeta) y #AL031575 y #AC005748 (Xrec-2)) y de secuencias adicionales obtenidas de PCR y reacciones 5' RACE.

45 La secuencia de nucleótidos del DNA aislado de IL-1 zeta y Xrec2 y la secuencia de aminoácidos codificada por ella se presentan en SEQ ID NOs: 1-4. La secuencia del fragmento de DNA de IL-1 zeta aislado por PCR corresponde a los nucleótidos 1 a 579 de SEQ ID NO: 1, que codifican los aminoácidos 1 a 192 de SEQ ID NO: 3; y la secuencia del fragmento de DNA de Xrec2 aislado también por PCR corresponde a los nucleótidos 1 a 2088 de SEQ ID NO: 2, que codifican los aminoácidos 1 a 698 de SEQ ID NO: 4.

50 Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y 4 contienen una homología importante con otros miembros conocidos de la familia de ligandos y receptores de IL-1, respectivamente.

Ejemplo 5

55 *Anticuerpos Monoclonales que Fijan los Polipéptidos de la Invención*

Este ejemplo ilustra un método para preparación de anticuerpos monoclonales que fijan el polipéptido IL-1 zeta. El mismo protocolo puede utilizarse para producir anticuerpos monoclonales que fijan el polipéptido Xrec2. Inmunógenos adecuados que pueden emplearse en la generación de tales anticuerpos incluyen, pero sin carácter limitante, el polipéptido purificado de IL-1 zeta o un fragmento inmunógeno del mismo tal como el dominio extracelular, o proteínas de fusión que contienen IL-1 zeta (v.g., una proteína de fusión soluble IL-1 zeta/Fc).

60 El polipéptido IL-1 zeta purificado puede utilizarse para generar anticuerpos monoclonales inmunorreactivos con él, utilizando técnicas convencionales tales como las descritas en la Patente U.S. 4.411.493. Resumidamente, se inmunicionan ratones con inmunógeno de IL-1 zeta emulsionado en adyuvante de Freund completo, y se inyectan en cantidades comprendidas entre 10 y 100 µg por vía subcutánea o intraperitoneal. Diez a veinte días más tarde, los animales inmunizados se refuerzan con IL-1 zeta adicional emulsionado en adyuvante de Freund incompleto. Los ratones se refuerzan periódicamente después de ello de acuerdo con un protocolo de inmunización semanal a bisemanal. Se toman

ES 2 325 165 T3

periódicamente muestras de suero por sangrado retro-orbital o excisión en la punta de la cola para testar respecto a los anticuerpos de IL-1 zeta por ensayo de transferencia de puntos, ELISA (Ensaya de Inmunoabsorbente Unido a Enzima) o por inhibición de la fijación del receptor de IL-1 zeta. Después de la detección de un título de anticuerpos apropiado, se proporciona a los animales positivos una última inyección intravenosa de IL-1 zeta en solución salina. Tres a cuatro 5 días más tarde, se sacrifican los animales, se recogen células del bazo, y se fusionan las células del bazo con una línea de células de mieloma murino (v.g., NS1 o preferiblemente P3x63Ag8.653 (ATCC CRL 1580). Las fusiones generan células de hibridoma, que se extienden en placas de microtitulación múltiples en un medio selectivo HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, híbridos de mieloma, e híbridos de células de bazo.

10 Las células de hibridoma se criban por ELISA respecto a la reactividad frente a IL-1 zeta purificada por adaptaciones de las técnicas descritas en Engvall *et al.*, *Immunochem.*, 8: 871: 1971 y en la Patente U.S. 4.703.004. Una técnica de cribado preferida es la técnica de captura de anticuerpos descrita en Beckmann *et al.*, *J. Immunol.*, 144: 4212, 1990. Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones BALB/c singénicos 15 para producir ascitis que contiene concentraciones altas de anticuerpos monoclonales anti-IL-1 zeta. Alternativamente, las células de hibridoma pueden dejarse cultivar *in vitro* en matraces o botellas rodantes por diversas técnicas. Los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis de ratón pueden purificarse por precipitación con sulfato de amonio, seguida por cromatografía de exclusión con gel. Alternativamente, puede utilizarse también cromatografía de afinidad 20 basada en la fijación del anticuerpo a Proteína A o Proteína G, al igual que cromatografía de afinidad basada en la fijación a IL-1 zeta.

Ejemplo 6

25 Distribución Tisular de mRNA de Xrec2

La distribución tisular de mRNA de Xrec2 se investigó por análisis mediante transferencia Northern, como sigue. Se añadió una parte alícuota de una ribosonda de Xrec2 a dos transferencias Northern de tejido humano diferentes (Clontech, Palo Alto, CA; Biochain, Palo Alto, CA). Las manchas se hibridaron en 10X solución de Denhardt, Tris 30 50 mM de pH 7,5, NaCl 900 mM, 0,1% pirofosfato de Na, 1% SDS, y 200 µg/ml de DNA de esperma de salmón. La hibridación se llevó a cabo durante una noche a 63°C en formamida al 50% como se ha descrito previamente (March *et al.*, *Nature* 315: 641-647, 1985). Se lavaron luego las manchas con 2X SSC, 0,1% SDS a 68°C durante 30 minutos. Las 35 células y los tejidos con los niveles máximos de mRNA de Xrec2 se determinaron por comparación con los controles, sondando con una sonda específica de β-actina.

Se detectó Xrec2 en los tejidos humanos de cerebro y corazón, y en menor proporción en el ovario. En estos tejidos, se detectaron dos mRNAs de Xrec2, un transcripto de 7,5 kb y un transcripto de 10,0 kb. Se detectó un transcripto de Xrec2 de 8,0 kb en el músculo esquelético. El análisis PCR de un panel de cDNA de tejidos humanos detectó mRNA de Xrec2 en corazón, cerebro y ovario y en menor proporción en amígdala, hígado fetal, próstata, testículos, 40 intestino delgado y colon, pero no en bazo, ganglio linfático, timo, médula ósea, leucocitos, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón o páncreas.

Siguiendo los procedimientos arriba descritos, se sondó con Xrec2 una transferencia Northern de RNA aislado de 45 células tumorales. Se detectó un transcripto de 8,0 kb que se hibridaba débilmente a la sonda en SW480, una línea de células de adenocarcinoma colorrectal. No se detectaron transcritos de Xrec2 en HL-60 (leucemia promielocítica), S3 (células HeLa), K-562 (leucemia mielógena crónica), MOLT-4 (leucemia linfoblástica), Raji (linfoma de Burkitt), A5 49 (carcinoma de pulmón) o G391 (células de melanoma).

50 Ejemplo 7

Ensayo de Fijación para IL-1 zeta

Puede expresarse y testarse IL-1 zeta de longitud total respecto a la capacidad para fijarse a los receptores de IL-1 zeta. El ensayo de fijación puede realizarse como sigue.

Se emplea en el ensayo una proteína de fusión que comprende un péptido de cremallera de leucina fusionado al término N de un polipéptido soluble de IL-1 zeta (LZ-IL-1-zeta). Se prepara una construcción de expresión, esencialmente como se describe para la preparación de la construcción de expresión FLAG® (IL-1-zeta) en Wiley *et al.*, 60 *Immunity*, 3: 673-682, 1995), excepto que el DNA codificante del péptido FLAG® se reemplazó con una secuencia que codificaba una cremallera de leucina modificada que permite la trimerización. La construcción, en el vector de expresión pDC409, codifica una secuencia conductora derivada del citomegalovirus humano, seguida por el resto de cremallera de leucina fusionado al término N de un polipéptido soluble de IL-1 zeta. El LZ-IL-1 zeta se expresa en células CHO, y se purifica a partir del sobrenadante de cultivo.

65 El vector de expresión designado pDC409 es un vector de expresión de mamífero derivado del vector pDC406 descrito en McMahan *et al.* *EMBO J.*, 10: 2821-2832, 1991). Características añadidas a pDC409 (comparado por pDC406) incluyen sitios de restricción singulares adicionales en el sitio de clonación múltiple (mcs); tres codones de

ES 2 325 165 T3

parada (uno en cada marco de lectura) situados aguas abajo del mcs; y un promotor de polimerasa T7, aguas abajo del mcs, que facilita la secuenciación del DNA insertado en el mcs.

Para la expresión de la proteína IL-1 zeta humana de longitud total, se amplifica la región codificante entera (es decir, la secuencia de DNA presentada en SEQ ID NO: 1) por la reacción en cadena de polimerasa (PCR). El molde empleado en la PCR es el clón de cDNA aislado de una genoteca de cDNA (de tumor pancreático), como se describe en el Ejemplo 1. El DNA aislado y amplificado se inserta en el vector de expresión pDC409, para producir una construcción designada pDC409-IL-1-zeta.

El polipéptido LZ-IL-1 zeta se emplea para testar la capacidad de fijación a las células hospedadoras que expresan receptores de IL-1 zeta recombinantes o endógenos, como se ha expuesto anteriormente. Las células que expresan el receptor de IL-1 zeta se cultivan en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10%, penicilina, estreptomicina, y glutamina. Las células se incuban con LZ-IL-1 zeta (5 mg/ml) durante aproximadamente 1 hora. Después de la incubación, se lavan las células para eliminar el LZ-IL-1 zeta no fijado y se incuban con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-LZ (5 mg/ml) y estreptavidina conjugada con ficoeritrina (1:400), antes del análisis por escaneo de las células activado por fluorescencia (FACS). El análisis citométrico se realiza en un FACscan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Las células que expresan receptores de IL-1 zeta exhibirán una fijación significativamente incrementada de IL-1 zeta, comparadas con las células de control que no expresan los receptores de IL-1 zeta.

Ejemplo 8

25 *Identificación y Distribución Tisular de IL-1 Zeta y sus Variantes de Corte y Empalme, TDZ.1, TDZ.2 y TDZ.3*

La expresión de IL-1 zeta en diversos tejidos humanos se examinó por RT PCR con iniciadores específicos de IL-1 zeta o por cribado de genotecas de cDNA con una sonda radiomarcada de DNA derivada del EST de IL-1 zeta descrito en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

En la Tabla 2, “-” indica que en estos experimentos no se detectaba mRNA de IL-1 zeta en el tejido o línea de células particular analizado(a). Dadas las limitaciones de los ensayos utilizados, se reconocerá que el “+” implica solamente que IL-1 zeta no era detectado en un tejido particular en un experimento particular y no implica que IL-1 zeta no se exprese nunca en dicho tejido. Adicionalmente, los patrones de expresión variables podrían explicarse por los diferentes lotes del material de procedencia del RNA que se utilizó para generar los paneles de tejidos de cDNA.

Los resultados positivos se obtuvieron como sigue: “a”, por análisis PCR de un panel de cDNAs de la primera cadena (Clontech); “b”, por cribado de genotecas de cDNA; “c”, por la existencia de un EST; y “d”, por análisis PCR de un RNA individual. “e” indica que la expresión del gen se incrementaba por adición de LPS a las células. En la columna de procedencia para los tejidos, “agrupación” era una mezcla de células de pulmón fetal, testículos y células B. En la columna de procedencia para las líneas de células humanas, “macrófago-1” era THP-1, “macrófago-2” era U937; “estroma BM” era una línea de células estromáticas de médula ósea no publicada, IMTLH, obtenida de Immunex; “hemat. temprana” era la línea hematopoyética precursora HL60; y “tumor panc.” era HPT-4.

Como se muestra en la Tabla, se detectó mRNA de IL-1 zeta en ganglios linfáticos, timo, estroma de médula ósea, pulmón, testículos y placenta humanos. Adicionalmente, se detectó mRNA de IL-1 zeta en las líneas de células de macrófagos humanas THP-1 y U937, la línea de células hematopoyéticas precursoras HL60, y la línea de células de tumor pancreático HPT-4.

50

(Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 325 165 T3

TABLA II

	PROCEDENCIA	IL-1 ZETA
5	<u>Tejido Humano</u>	
10	Bazo	---
15	Ganglio linfático	a
20	Timo	a
25	Amígdala	---
30	Médula ósea	a, b
35	Hígado fetal	---
40	Leucocitos	---
45	Corazón	---
50	Placenta	a
55	Pulmón	a
60	Hígado	---
	Músculo esquelético	---
	Riñón	---
	Páncreas	---
	Próstata	---
	Testículo	a
	Ovario	---
	Intestino delgado	---
	Colon	---
	Tumor de colon	c
	Agrupación	c
	<u>Líneas de células humanas</u>	
	Macrófago-1	d
	Macrófago-2	d, e
	Estroma BM	d
	Hemat. temprana	d
	Tumor panc.	b

La distribución tisular de IL-1 zeta se comparó también con la distribución tisular de Tango-77 (WO 99/06426), una forma cortada y empalmada alternativamente de IL-1 zeta, utilizando RT PCR. Los iniciadores utilizados en la RT PCR eran iniciadores 5' específicos para el primer exón de Tango-77 (exón (1) en la Figura 1) o el primer exón de IL-1 zeta (exón (3) en la Figura 1) en combinación con un iniciador 3' común derivado del exón terminal común (exón (6) en la Figura 1). Las reacciones PCR se llevaron a cabo utilizando cDNA de la primera cadena de fuentes de tejido humano múltiples adquiridas de Clontech, Palo Alto, CA. Se detectaron productos PCR del tamaño predicho así como varios productos PCR adicionales de tamaño diferente. Tres productos PCR de tamaños diferentes que el tamaño predicho se aislaron y se utilizaron para obtener información de secuencia de cDNAs de tejidos múltiples. El

ES 2 325 165 T3

aislamiento y la caracterización de estos productos PCR revelaron tres nuevas variantes de corte y empalme de IL-1 zeta. Las secuencias de ácido nucleico de estas variantes de corte y empalme se representan por SEQ ID NO: 5, 6, y 7, que codifican las secuencias de aminoácido representadas por SEQ ID NOs: 8, 9, y 10, respectivamente. La organización y relación de estas variantes de corte y empalme se muestra en la Figura 1.

5 Los variantes de corte y empalme se designaron TDZ.1, TDZ.2, y TDZ.3 (Testis -Derived Zeta Variants), debido a que se expresan todas ellas en el testículo. El testículo es un tejido de expresión común; sin embargo, no es el único tejido de expresión. La Tabla III muestra los resultados de un estudio de expresión tisular para IL-1 zeta, Tango-77, TDZ.1, TDZ.2, y TDZ.3. TDZ.1 y TDZ.2 contienen los exones 4, 5, y 6, representados en la Figura 1, que corresponden a los tres últimos exones de IL-1 zeta y corresponden al dominio estructural conservado de la molécula. 10 Cuando se alinean con otros miembros de la familia IL-1, se demuestra que los exones 4, 5, y 6 contienen muchos residuos conservados dentro de motivos estructurales conservados.

15 Se observa un polimorfismo de Tango-77 en el exón (2) de la Figura 1. En los cDNAs aislados, existe una valina en lugar de una glicina en el tercer residuo del exón (2). En la secuencia de Tango-77, la secuencia de aminoácidos es PAGSPLP (SEQ ID NO: 14). En el polimorfismo, la secuencia de PAVSPLP (SEQ ID NO: 15).

TABLA III

Distribución tisular de IL-1 zeta y variantes de corte y empalme de IL-1 zeta

Tejido	IL-1Z	Tango-77	TDZ.1	TDZ.2	TDZ.3
Riñón	-	-	+	-	-
Páncreas	-	-	-	-	-
Músculo esquelético	-	-	+	-	-
Corazón	-	+	-	-	-
Testículo	+	+	+	+	+
Próstata	+	-	+	-	-
Bazo	-	-	-	-	-
Ovario	-	+	+	-	-
Timo	-	-	-	-	-
Colon	+	+	+	-	-
Leucocitos	-	-	-	-	-
Intestino delgado	-	+	+	-	-
Hígado	-	+	+	-	-
Cerebro	+	-	-	-	-
Placenta	+	+	+	-	+
Pulmón	+	+	+	-	+
Amígdala	-	+	+	-	-
Hígado fetal	+	+	+	-	-
Ganglio linfático	+	+	+	-	-
Médula ósea	-	+	+	+	+

Ejemplo 9

Actividad de Señalización de Xrec2

5 Se clonó Xrec2 de longitud total en el vector de expresión pDC304. El vector resultante y un plásmido informador de luciferasa dirigido por NF κ B se utilizaron para transfectar células COS7 por el método DEAE-Dextrano como ha sido descrito previamente en Born *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:29445-29450, 1998. Cuando las células transfectadas se estimularon durante 4 horas con IL-1 α (10 ng/ml), IL-1 β (10 ng/ml) o hIL-18 (40 ng/ml), no se detectó actividad alguna de luciferasa.

10 Varios miembros conocidos de la familia IL-1R son receptores huérfanos para los cuales no se ha identificado todavía ningún ligando cognado conocido. Ejemplos de tales receptores huérfanos incluyen IL-1Rrp2, T1/ST2 y SI-GIRR. Varios de estos receptores huérfanos pueden, sin embargo, mediar la activación de la transcripción en respuesta a IL-1, cuando se expresan como moléculas químéricas con los dominios de IL-1R extracelulares y transmembranales
15 (IL-1Rextm) fusionados al dominio citoplásmico del receptor huérfano. Por ejemplo, una quimera IL-1Rextm que contiene el dominio citoplásmico de T1/ST2 es capaz de mediar la activación de la transcripción en respuesta a la estimulación por IL-1, como se reseña en Mitcham *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 271:5777-5783, 1996.

20 Para testar la aptitud de Xrec2 para mediar la activación de la transcripción en respuesta a IL-1, se expresó el dominio citoplásmico de Xrec2 (Xrec2cyto) (aminoácidos 382-696 de SEQ ID NO: 4) como una molécula químérica con IL-1Rextm. El IL-1Rextm-Xrec2cyto químérico se sobreexpresaba en células COS7 junto con un plásmido informador de luciferasa impulsado por NF κ B, como se ha descrito arriba. Después de la estimulación por IL-1 de estas células, no se detectaba actividad alguna de luciferasa. Como control, se sobreexpresó IL-1R de longitud total en células COS7, y se observó una inducción de actividad de transcripción en respuesta a la estimulación por IL-1 en
25 estas células.

30 El experimento se repitió utilizando un receptor químérico IL-1Rextm-Xrec2cyto con una cola citoplásmica truncada (aminoácidos 382-573 de SEQ ID NO: 4). De nuevo, el receptor químérico no era sensible a IL-1 en estos ensayos, lo que indicaba que, al contrario de algunas otros miembros de la familia IL-1R, el dominio citoplásmico de Xrec2 no media la transducción de señales por NF κ B.

35 Otros miembros de la familia de receptores de IL-1 funcionan como subunidades accesorias, similares a la IL-1R AcP, que es un componente de señalización requerido de IL-1R del tipo I. Para determinar si Xrec2 funciona como una subunidad accesoria del receptor de IL-1, se crearon una serie de receptores químéricos. El dominio citoplásmico de cada miembro prototípico identificado de la familia IL-1R se fusionó a los dominios extracelular y transmembranal tanto de IL-1R como de AcP, dando como resultado un panel de siete quimeras IL-1R y siete quimeras AcP. Las quimeras IL-1R y AcP se co-expresaron en todas las combinaciones posibles en una línea de células de linfoma de las células T murinas (S49.1) por electroporación, junto con un plásmido informador de luciferasa impulsado por NF κ B. Dos días después de la electroporación, las células se estimularon con IL-1 α (10 ng/ml) o IL-1 β (10 ng/ml) durante 4 horas, y se evaluó la actividad de luciferasa, como se ha descrito previamente en Born *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 273:29445-29450, 1998. Normalmente, las células S49.1 no son sensibles a IL-1.

45 Sin embargo, por sobreexpresión transitoria tanto de IL-1R como de AcP, las células S49.1 se vuelven sensibles a IL-1. Mientras que otras moléculas semejantes a AcP cooperaban en este sistema con otras moléculas semejantes a IL-1R para conferir sensibilidad de IL-1 a las células S49.1, Xrec2 no lo hacía así, como una quimera IL-1R o como una quimera AcP.

50

55

60

65

ES 2 325 165 T3

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo constituido por:

- 5 (a) la secuencia de DNA de SEQ ID NO: 2;
- (b) una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 4; y
- 10 (c) una molécula de ácido nucleico aislada degenerada de SEQ ID NO: 2 como resultado del código genético.
2. Un vector recombinante que dirige la expresión de la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
- 15 3. Un polipéptido aislado codificado por la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1.
4. Un polipéptido aislado de acuerdo con la reivindicación 3 en forma no glicosilada.
5. Un anticuerpo aislado que se fija a un polipéptido de la reivindicación 3.
- 20 6. Un anticuerpo aislado de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
7. Una célula hospedadora transfectada o transducida con el vector de la reivindicación 2.
- 25 8. Un método para la producción de un polipéptido Xrec2, que comprende cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 7 en condiciones que promueven la expresión, y recuperar el polipéptido del medio de cultivo.
9. El método de la reivindicación 8, en donde la célula hospedadora se selecciona del grupo constituido por células bacterianas, células de levadura, células de plantas, y células animales.
- 30 10. Un oligómero que comprende un polipéptido de la reivindicación 3.

35

40

45

50

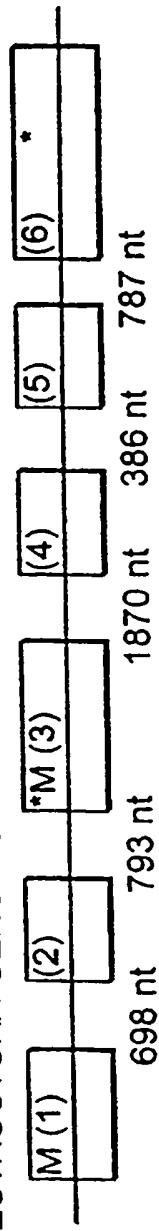
55

60

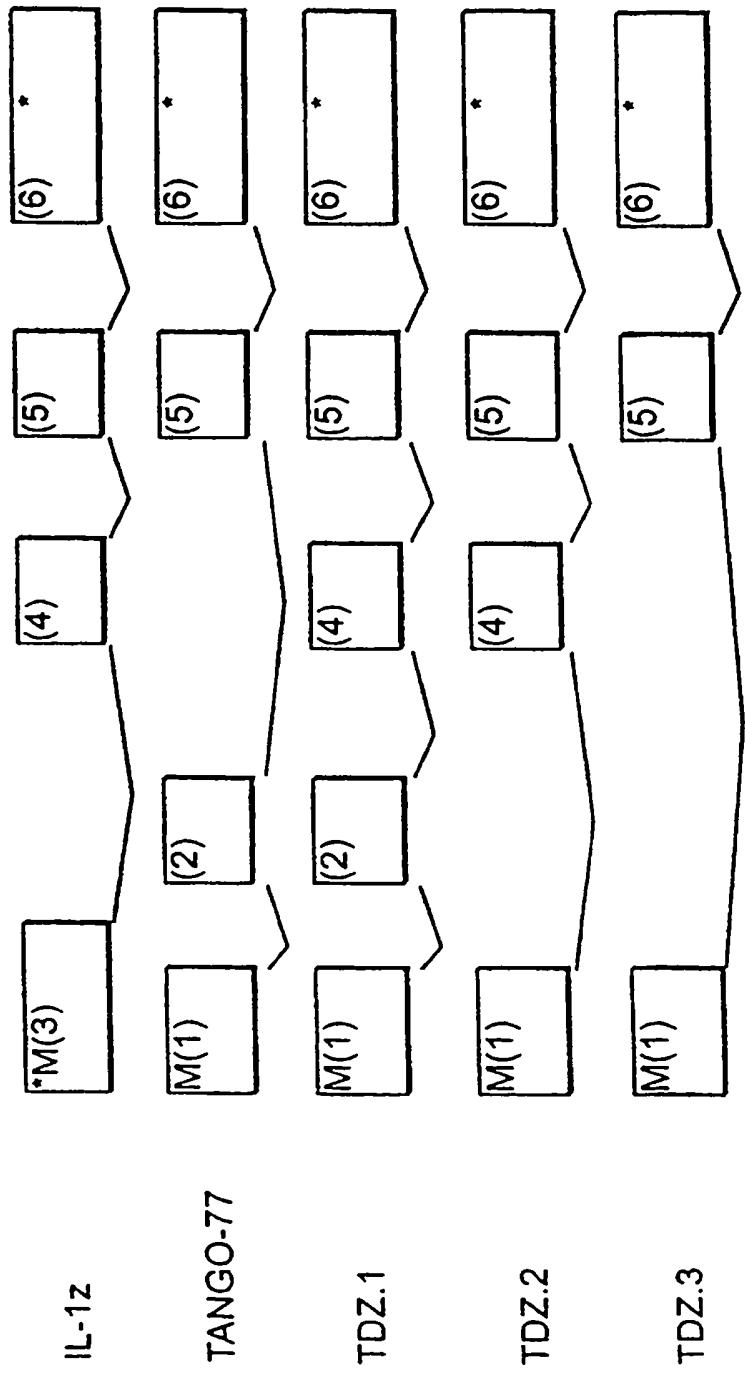
65

GENERACIÓN DE VARIANTES DE CORTE Y EMPALME DE IL-1z

ESTRUCTURA GENÓMICA DEL LOCUS IL-1z



CDNAs GENERADOS POR CORTE Y EMPALME ALTERNATIVOS:

**FIG. 1**

ES 2 325 165 T3

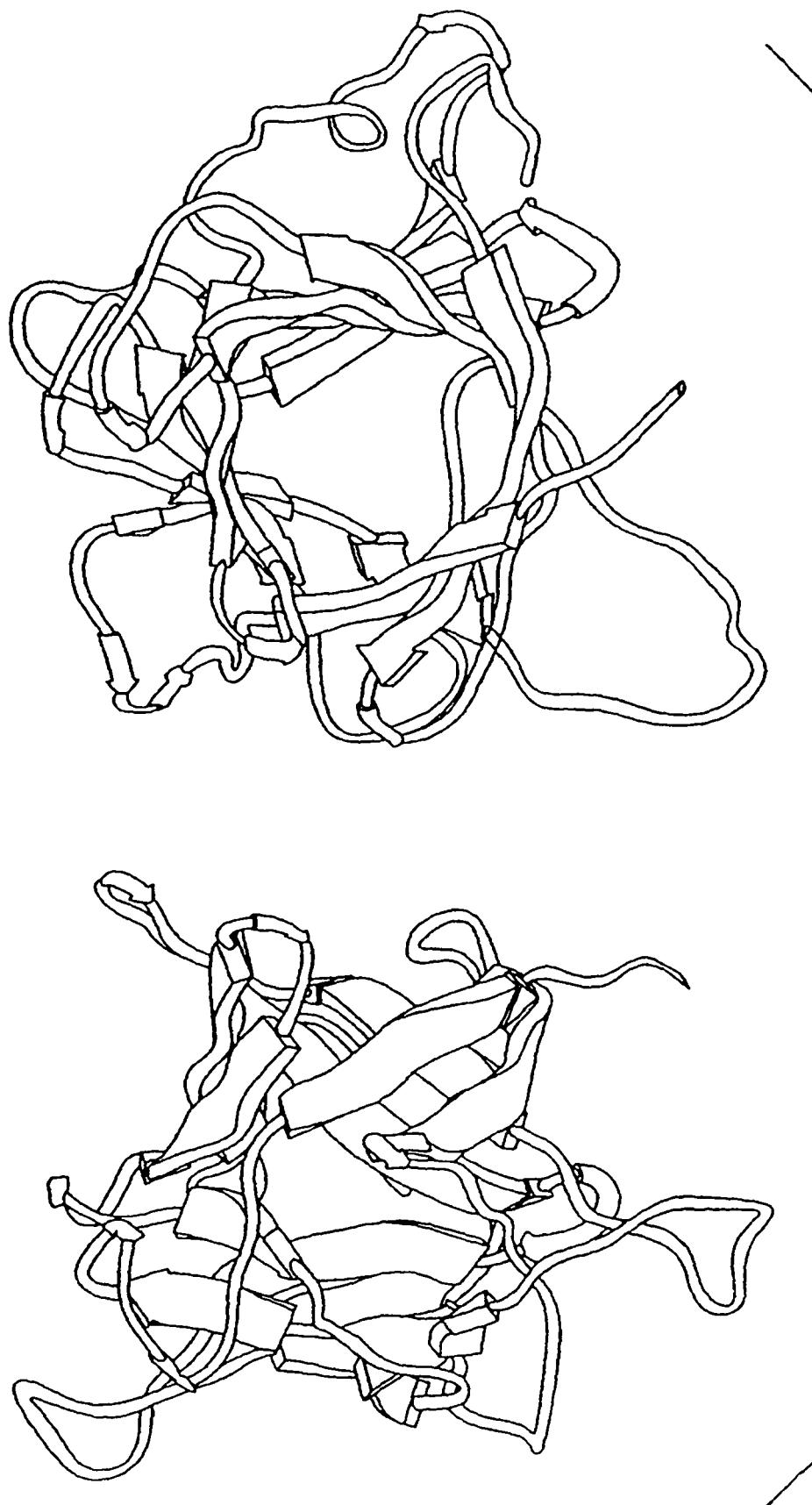


FIG. 2

ES 2 325 165 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Sims, John E.
Born, Teresa L.
Smith, Dirk E.

10 <120> IL-1 ZETA, VARIANTES DE CORTE Y EMPALME DE IL-1 ZETA Y DNAS Y POLIPÉPTIDOS DE
XREC2

15 <130> 03260.0088-00304

20 <140>
<141>

25 <150> 60/112.163
<151> 14-12-1998

30 <150> 60/146.675
<151> 10-11-1999

35 <160> 15
<170> PatentIn Ver. 2,0

40 <210> 1
<211> 579
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 1

50 atgtcaggct gtgataggag ggaaacagaa accaaaggaa agaacagctt taagaagcgc 60
ttaagaggtc caaaggtgaa gaacttaaac ccgaagaaat tcagcattca tgaccaggat 120
cacaaagtac tggtcctgga ctctggaat ctcatalogcag tcccgataaa aaactacata 180
cgcccagaga tcitcttgc attagcctca tccttgagct cagcctctgc ggagaaagga 240
agtccgattc tcctggggt ctctaaaggg gagtttgtc tctactgtga caaggataaa 300
ggacaaaagtc atccatccct tcagctgaaag aaggagaaac tcatgaagct ggctgcccaa 360
aaggaaatcag cacgcccccc cttcatctt tatagggcic aggtgggctc ctggAACATG 420
ctggagtcgg cggctcaccc cggatggttc atctgcaccc cctgcattt taatgagcct 480
gttgggggtga cagataaatt tgagaacagg aaacacattt aattttccatt tcaaccagg 540
tgcaaagctg aatgagccc cagtgggtc agcgattag 579

55 <210> 2
<211> 2091
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

60

ES 2 325 165 T3

<400> 2

```

atgaaagctc cgattccaca cttgattctc ttatacgcta cttttactca gagtttgaag 60
5      gttgtacca aaagaggctc cgccgatgga tgcactgact ggctatcga tatcaagaaa 120
tatcaagttt tggtgggaga gcctgttcga atcaaatgtg cactcttta tggttatatc 180
10     agaacaatt actcccttgc ccaaagtgc ggactcagg ttagtggta caaaagttct 240
ggcttggag actttgaaga gccaatagcc tttgacggaa gtagaatgag caaagaagaa 300
gactccattt ggttccggcc aacattgcta caggacagtg gtctctacgc ctgtgtcatc 360
15     agaaaactcca cttactgtat gaaagtatcc atctcaactga cagtgggtga aaatgacact 420
ggactctgct ataattccaa gatgaagtat tttgaaaaag ctgaacttag caaaagcaag 480
gaaatttcat gccgtgacat agaggattttt ctactgccaa ccagagaacc taaaatcctt 540
tggtacaagg aatgcaggac aaaaacatgg aggccaagta ttgtattcaa aagagatact 600
20     ctgcttataaa gagaagtcag agaagatgac attggaaatt atacctgtga attaaaatat 660
ggaggcttg ttgtgagaag aactactgaa ttaactgtta cagccctct gactgataag 720
ccacccaagc ttttgtatcc tatggaaagt aaactgacaa ttcaggagac ccagctgggt 780
25     gactctgcta atctaaccctg cagagcttc tttgggtaca gcggagatgt cagtccttta 840
atttactgga tgaaaggaga aaaatttattt gaagatctgg atgaaaatcg agtttggaa 900
30     agtacattha gaattcttaa ggagcatctt gggaaacagg aagttccat ctcattaatt 960
gtggactctg tggaaagg tggactggaa aattactcct gttatgtga aaatggaaat 1020
ggacgtcgac acgccagcgt tctccttcat aaacgagagc taatgtacac agtggactt 1080
35     gctggaggcc ttgggtctat actcttgcg cttgtatgtt tggtgaccat ctacaagtgt 1140
tacaagatag aaatcatgct cttctacagg aatcatttt gactgaaaga gctcgatgg 1200
gacaataaag attatgatgc atacttatca tacaccaaag tggatcctga ccagtggaaat 1260
40     caagagactg gggaaaaga acgtttgcc cttgaaatcc tacctgatat gcttggaaag 1320
cattatggat ataagttgtt tataccagat agagattaa tcccaactgg aacatacatt 1380
gaagatgtgg caagatgtgt agatcaaagc aagcggctga ttattgtcat gaccccaaat 1440
45     tacgtatgtt gaagggctg gacatctt gactggaaa ccagactcg aaatatgctt 1500
gtgactggag aaattaaagt gattctaatt gaatgcagtg aactgagagg aattatgaac 1560
taccaggagg tggaggccct gaagcacacc atcaagctcc tgacggcat taaaatggcat 1620
50     ggacccaaat gcaacaagtt gaactccaag ttctggaaac gtttacagta tgaaatgcct 1680
tttaagagga tagaaccat tacacatgag caggcttag atgtcagtga gcaagggcct 1740
tttggggagc tgcagactgt ctcggccatt tccatggccg cggccaccc cacagctcta 1800
55     gcccactgccc atccagatct ccgttctacc tttcacaaca cgtaccattc acaaatgcgt 1860
cagaaacact actaccgaag ctatgactac gacgtaccc tcaccggcac cctgcctt 1920
acctccatag gcaatcagca tacctactgt aacatcccta tgacactcat caacgggcag 1980
60     cggccacaga caaaatcgag cagggagcag aatccagatg aggcccacac aaacagtgcc 2040
atccctgccc tggccaaag ggagaccagt atatccagt tgatatggtg a 2091

```

65 <210> 3

<211> 192

<212> PRT

ES 2 325 165 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

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

50 <210> 4

<211> 696

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 325 165 T3

<400> 4

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

55

60

65

ES 2 325 165 T3

	Val Arg Arg Thr Thr Glu Leu Thr Val Thr Ala Pro Leu Thr Asp Lys			
225	230	235	240	
5	Pro Pro Lys Leu Leu Tyr Pro Met Glu Ser Lys Leu Thr Ile Gln Glu			
	245	250	255	
	Thr Gln Leu Gly Asp Ser Ala Asn Leu Thr Cys Arg Ala Phe Phe Gly			
10	260	265	270	
	Tyr Ser Gly Asp Val Ser Pro Leu Ile Tyr Trp Met Lys Gly Glu Lys			
	275	280	285	
15	Phe Ile Glu Asp Leu Asp Glu Asn Arg Val Trp Glu Ser Asp Ile Arg			
	290	295	300	
	Ile Leu Lys Glu His Leu Gly Glu Gln Glu Val Ser Ile Ser Leu Ile			
20	305	310	315	320
	Val Asp Ser Val Glu Glu Gly Asp Leu Gly Asn Tyr Ser Cys Tyr Val			
	325	330	335	
25	Glu Asn Gly Asn Gly Arg Arg His Ala Ser Val Leu Leu His Lys Arg			
	340	345	350	
	Glu Leu Met Tyr Thr Val Glu Leu Ala Gly Gly Leu Gly Ala Ile Leu			
30	355	360	365	
	Leu Leu Leu Val Cys Leu Val Thr Ile Tyr Lys Cys Tyr Lys Ile Glu			
	370	375	380	
35	Ile Met Leu Phe Tyr Arg Asn His Phe Gly Ala Glu Glu Leu Asp Gly			
	385	390	395	400
40	Asp Asn Lys Asp Tyr Asp Ala Tyr Leu Ser Tyr Thr Lys Val Asp Pro			
	405	410	415	
	Asp Gln Trp Asn Gln Glu Thr Gly Glu Glu Glu Arg Phe Ala Leu Glu			
45	420	425	430	
	Ile Leu Pro Asp Met Leu Glu Lys His Tyr Gly Tyr Lys Leu Phe Ile			
	435	440	445	
50	Pro Asp Arg Asp Leu Ile Pro Thr Gly Thr Tyr Ile Glu Asp Val Ala			
	450	455	460	
	Arg Cys Val Asp Gln Ser Lys Arg Leu Ile Ile Val Met Thr Pro Asn			
55	465	470	475	480
	Tyr Val Val Arg Arg Gly Trp Ser Ile Phe Glu Leu Glu Thr Arg Leu			
	485	490	495	
60	Arg Asn Met Leu Val Thr Gly Glu Ile Lys Val Ile Leu Ile Glu Cys			
	500	505	510	
	Ser Glu Leu Arg Gly Ile Met Asn Tyr Gln Glu Val Glu Ala Leu Lys			

ES 2 325 165 T3

	515	520	525
	His Thr Ile Lys Leu Leu Thr Val Ile Lys Trp His Gly Pro Lys Cys		
5	530	535	540
	Asn Lys Leu Asn Ser Lys Phe Trp Lys Arg Leu Gln Tyr Glu Met Pro		
	545	550	555
10	Phe Lys Arg Ile Glu Pro Ile Thr His Glu Gln Ala Leu Asp Val Ser		
	565	570	575
	Glu Gln Gly Pro Phe Gly Glu Leu Gln Thr Val Ser Ala Ile Ser Met		
15	580	585	590
	Ala Ala Ala Thr Ser Thr Ala Leu Ala Thr Ala His Pro Asp Leu Arg		
	595	600	605
20	Ser Thr Phe His Asn Thr Tyr His Ser Gln Met Arg Gln Lys His Tyr		
	610	615	620
	Tyr Arg Ser Tyr Glu Tyr Asp Val Pro Pro Thr Gly Thr Leu Pro Leu		
25	625	630	635
	Thr Ser Ile Gly Asn Gln His Thr Tyr Cys Asn Ile Pro Met Thr Leu		
	645	650	655
30	Ile Asn Gly Gln Arg Pro Gln Thr Lys Ser Ser Arg Glu Gln Asn Pro		
	660	665	670
	Asp Glu Ala His Thr Asn Ser Ala Ile Leu Pro Leu Leu Pro Arg Glu		
35	675	680	685
	Thr Ser Ile Ser Ser Val Ile Trp		
40	690	695	
	<210> 5		
	<211> 657		
	<212> DNA		
45	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 5		
50	atgtcccttg tggggagaaa ctcaggagtg aaaatggct ctgaggactg gaaaaaaagat 60 gaaccccagt gctgcttaga agacccggct gtaagcccccc tggAACCCAGG CCCAAGCCTC 120 cccacccatga attttgtca cacaagtcca aaggtgaaga acttaaaccc gaagaaattc 180 agcattcatg accagcatca caaagtactg gtcctggact ctggaaatct catagcagtt 240 ccagataaaa actacatacg cccagagatc ttctttgcat tagccatc cttgagctca 300 gcctctgcgg agaaaggaag tccgattctc ctgggggtct ctaaagggga gttttgtctc 360 tactgtgaca aggataaagg acaaaagtcat ccattcccttc agctgaagaa ggagaaaactg 420 atgaagctgg ctgccaaaaa ggaatcagca cgccggccct tcattttta tagggctcag 480 gtgggctctt ggaacatgct ggagtccggcg gtcaccccg gatggttcat ctgcacctcc 540 tgcaattgta atgagcctgt tgggtgaca gataaatttgc agaacaggaa acacattgaa 600 ttttcatttc aaccagtttgc caaagctgaa atgagccca gtgaggtcag cgattag 657		
55			
60			
65			

ES 2 325 165 T3

<210> 6
<211> 594
<212> DNA
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

10 atgtcctttg tggggagaaa ctcaggagtg aaaatggct ctgaggactg ggaaaaagat 60
 gaaccccaagt gctgcttaga aggtccaaag gtgaagaact taaaccgaa gaaattcagc 120
 attcatgacc aggatcacaa agtactggtc ctggactctg ggaatctcat agcagttcca 180
15 gataaaaact acatacgccc agagatcttc ttgcattag cctcatcctt gagctcagcc 240
 tctgcggaga aaggaagtcc gattctcctg ggggtctcta aaggggagtt ttgtctctac 300
 tgtgacaagg ataaaggaca aagtcatcca tcccttcagc tgaagaagga gaaactgatg 360
20 aagctggctg cccaaaagga atcagcacgc cggcccttca tctttatag ggctcaggtg 420
 ggctcctgga acatgctgga gtcggcggct caccccgat ggttcatctg cacccctgc 480
 aattgtaatg agcctgttgg ggtgacagat aaatttgaga acaggaaaca cattgaattt 540
25 tcatttcaac cagtttgc当地 agctgaaatg agccccc当地 aggtcagcga ttag 594

<210> 7
30 <211> 474
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 7

40 atgtcctttg tggggagaaa ctcaggagtg aaaatggct ctgaggactg ggaaaaagat 60
 gaaccccaagt gctgcttaga agagatcttc ttgcattag cctcatcctt gagctcagcc 120
 tctgcggaga aaggaagtcc gattctcctg ggggtctcta aaggggagtt ttgtctctac 180
 tgtgacaagg ataaaggaca aagtcatcca tcccttcagc tgaagaagga gaaactgatg 240
45 aagctggctg cccaaaagga atcagcacgc cggcccttca tctttatag ggctcaggtg 300
 ggctcctgga acatgctgga gtcggcggct caccccgat ggttcatctg cacccctgc 360
 aattgtaatg agcctgttgg ggtgacagat aaatttgaga acaggaaaca cattgaattt 420
50 tcatttcaac cagtttgc当地 agctgaaatg agccccc当地 aggtcagcga ttag 474

<210> 8
55 <211> 218
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

60

ES 2 325 165 T3

<400> 8

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

<210> 9

55 <211> 197

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60

65

ES 2 325 165 T3

<400> 9

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

50 <210> 10

<211> 157

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

60

65

ES 2 325 165 T3

<400> 10

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

40 <210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

45

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: péptido antigénico utilizado en proteínas de fusión

50 <400> 11

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

55

1 5

<210> 12

<211> 27

60 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido de cremallera de leucina

ES 2 325 165 T3

<400> 12

Pro Asp Val Ala Ser Leu Arg Gln Gln Val Glu Ala Leu Gln Gly Gln

5 1 5 10 15

Val Gln His Leu Gln Ala Ala Phe Ser Gln Tyr

10 20 25

<210> 13

<211> 33

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: polipéptido de cremallera de leucina

<400> 13

Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile

25 1 5 10 15

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu

30 20 25 30

Arg

35 <210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia polimórfica del exón 2 de Tango 77

45 <400> 14

Pro Ala Gly Ser Pro Leu Glu Pro

50 1 5

<210> 15

<211> 8

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

60 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: secuencia polimórfica del exón 2 de Tango 77

<400> 15

65 Pro Ala Val Ser Pro Leu Glu Pro

1 5