



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 290 606**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04025897 .2**

(86) Fecha de presentación : **05.10.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1518930**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2005**

(54) Título: **Procedimientos y composiciones para la inhibición del crecimiento celular neoplásico.**

(30) Prioridad: **13.10.1998 US 104080 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2008

(73) Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

(72) Inventor/es: **Ashkenazi, Avi;**
Goddard, Audrey;
Gurney, Austin L.;
Klein, Robert D.;
Napier, Mary;
Wood, William I. y
Yuan, Jean

(74) Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 290 606 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones para la inhibición del crecimiento celular neoplásico.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones para inhibir el crecimiento celular neoplásico. En particular, la presente invención se refiere a composiciones antitumorales y a procedimientos para el tratamiento de tumores. La invención se refiere además a procedimientos de cribado para identificar compuestos inhibidores del crecimiento, por ejemplo compuestos antitumorales.

10 **Antecedentes de la invención**

Los tumores malignos (cánceres) son la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, tras la enfermedad cardíaca (Boring *et al.*, CA Cancer J. Clin. 43:7, 1993).

El cáncer se caracteriza por el incremento del número de células anormales, neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan formando una masa tumoral, la invasión de tejidos contiguos a estas células tumorales neoplásicas, y la generación de células malignas que finalmente se extienden a través de la sangre o el sistema linfático a nódulos linfáticos regionales y a sitios distantes (metástasis). En un estado canceroso, la célula prolifera bajo condiciones en las que no crecerían las células normales. El cáncer se manifiesta en una amplia diversidad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasividad y agresividad.

La patente EP n° 0 861 894 A1 describe un polipéptido denominado Delta-1 humano, variantes y anticuerpos del mismo. El polipéptido se comenta en relación a la supresión de la diferenciación de células sanguíneas no diferenciadas y se indica que se espera que resulte utilizable en medicinas y en suministros médicos.

A pesar de los recientes avances en la terapia del cáncer, existe una gran necesidad de nuevos agentes terapéuticos capaces de inhibir el crecimiento celular neoplásico. Por consiguiente, es el objetivo de la presente invención identificar compuestos capaces de inhibir el crecimiento de las células neoplásicas, tales como las células de cáncer.

30 **Descripción resumida de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para la inhibición del crecimiento celular neoplásico y a usos relacionados. Más particularmente, la invención se refiere a composiciones para el tratamiento de tumores, incluyendo cánceres, tales como cáncer de mama, próstata, colon, pulmón, ovario, renal y del SNC, leucemia, melanoma, etc., en pacientes mamíferos, preferentemente seres humanos, y usuarios relacionados.

En un aspecto, la presente invención se refiere a composiciones de materia útiles para la inhibición del crecimiento celular neoplásico, que comprende una cantidad eficaz de un polipéptido PRO172 o fragmento del mismo, según se define en las reivindicaciones, o un agonista del mismo, en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización preferente, la composición de materia comprende una cantidad inhibidora del crecimiento de un polipéptido PRO172 o fragmento del mismo. En otra realización preferente, la composición comprende una cantidad citotóxica de un polipéptido PRO172 o fragmento del mismo.

Las composiciones de materia contienen uno o más agentes adicionales inhibidores del crecimiento y/o citotóxicos y/o otros agentes quimioterapéuticos.

En otro aspecto según se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la inhibición del crecimiento de una célula tumoral que comprende exponer la célula a una cantidad eficaz de un polipéptido PRO172, o fragmento del mismo.

En una todavía otra realización, la invención se refiere a un producto de fabricación, que comprende:

un recipiente; y

una composición que comprende un agente activo contenido dentro del recipiente; en la que la composición resulta eficaz para la inhibición del crecimiento celular neoplásico, por ejemplo el crecimiento de células tumorales, y el agente activo en la composición es un polipéptido PRO172, o fragmento del mismo, según se define en la reivindicación 1. Los productos de fabricación similares que comprende un polipéptido PRO172 o fragmento del mismo en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para el tratamiento de tumor también se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Los productos de fabricación comprenden un polipéptido PRO172 o fragmento del mismo, y un agente adicional inhibidor del crecimiento, agente citotóxico o agente quimioterapéutico.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B muestran una secuencia de nucleótidos (SEC ID nº 1) de un ADNc de PRO172 de secuencia nativa, en la que la SEC ID nº 1 es un clon denominado en la presente memoria “DNA35916-1161”.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID nº 2) derivada de la secuencia codificante de la SEC ID nº 1 mostrada en las figuras 1A-B.

Descripción detallada de la invención

El término “PRO172” referido a un polipéptido o proteína, tal como se utiliza en la presente invención abarca las variantes de PRO172 de secuencia nativa (que se definen adicionalmente en la presente invención). El polipéptido PRO172 puede aislarse a partir de una diversidad de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o a partir de otra fuente, o prepararse mediante procedimientos recombinantes y/o sintéticos.

Un “PRO172 de secuencia nativa” comprende un polipéptido que presenta la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido PRO172 tal como se deriva naturalmente. Dicho polipéptido PRO172 de secuencia nativa puede aislarse a partir de la Naturaleza o puede producirse mediante medios recombinantes y/o medios sintéticos. La expresión “secuencia nativa” referida a PRO172 específicamente abarca las formas truncadas o segregadas de origen natural (por ejemplo una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo formas alternativamente procesadas) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido PRO172. En una realización de la invención, el polipéptido PRO172 de secuencia nativa es un polipéptido PRO172 de secuencia nativa de longitud completa o maduro, tal como se muestra en la figura 2 (SEC ID nº 2). Además, aunque el polipéptido PRO172 dado a conocer en la figura 2 (SEC ID nº 2) se muestra que se inicia con el residuo metionina denominado en la misma posición aminoácida nº 1, resulta concebible y posible que pueda utilizarse como residuo aminoácido de partida para el polipéptido PRO172 otro residuo metionina situado cadena arriba o cadena abajo de la posición aminoácida nº 1 en la figura 2 (SEC ID nº 2).

El “dominio extracelular” o “ECD” de un polipéptido dado a conocer en la presente memoria se refiere a una forma del polipéptido que se encuentra esencialmente libre de los dominios transmembranal y citoplasmático. Habitualmente, un polipéptido ECD presentará menos de aproximadamente 1% de estos dominios transmembranal y/o citoplasmático y preferentemente presentará menos de aproximadamente 0,5% de estos dominios. Se entiende que cualquier dominio o dominios transmembranal identificados para los polipéptidos de la presente invención se identifican de acuerdo con los criterios utilizados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembranal pueden variar pero lo más probable es que no varíen en más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los dos extremos del dominio tal como se ha identificado inicialmente y tal como se muestra en las figuras adjuntas. Como tal, en una realización de la presente invención, el dominio extracelular de un polipéptido de la presente invención comprende los aminoácidos 1 a X de la secuencia madura de aminoácidos, en la que X es cualquier aminoácido a menos de 5 aminoácidos en cualquiera de los dos lados del límite dominio extracelular/dominio transmembranal.

La localización aproximada del “péptido de señal” de los polipéptidos PRO172 dados a conocer en la presente invención se muestra en las figuras adjuntas. Sin embargo, se indica que el límite C-terminal de un péptido de señal puede variar, pero lo más probable es que en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los dos lados del límite C-terminal del péptido de señal tal como se ha identificado inicialmente en la presente memoria, en el que el límite C-terminal del péptido de señal puede identificarse de acuerdo con los criterios utilizados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo Nielsen *et al.*, Prot. Eng. 10:1-6, 1996, y von Heinje *et al.*, Nucl. Acids Res. 14:4683-4690, 1986). Además, también se reconoce que, en algunos casos, el corte de una secuencia de señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, resultando en la existencia de más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, en los que el péptido de señal se corta a no más de aproximadamente 5 aminoácidos en ambos lados del límite C-terminal del péptido de señal tal como se identifica en la presente memoria, y los polinucleótidos que los codifican, se encuentran contemplados por la presente invención.

La expresión “polipéptido variante PRO172” se refiere a un polipéptido PRO172 activo (diferente de un polipéptido PRO172 de secuencia nativa) tal como se define posteriormente, que presente una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80% con la secuencia de aminoácidos de: (a) residuo 1 o aproximadamente 22 a 73 del polipéptido PRO172 mostrado en la figura 2 (SEC ID nº 2), (b) X a 723 del polipéptido PRO172 mostrado en la figura 2 (SEC ID nº 2), en el que X es cualquier residuo aminoácido entre 17 y 26 de la figura 2 (SEC ID nº 2), (c) 1 o aproximadamente 22 a X de la figura 2 (SEC ID nº 2), en la que X es cualquier aminoácido entre el aminoácido nº 543 y el aminoácido 552 de la figura 2 (SEC ID nº 2), o (d) otro fragmento derivado específicamente de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID nº 2).

Entre dichas variantes de PRO172 se incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO172 en los que se añaden o delecionan uno o más residuos aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal, así como dentro de uno o más dominios internos de la secuencia nativa.

ES 2 290 606 T3

Habitualmente, una variante de PRO172 presentará una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 81%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 82%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 83%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 84%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 85%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 86%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 87%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 88%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 89%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 90%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 91%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 92%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 93%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 94%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 95%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 96%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 97%, más preferentemente de por lo menos aproximadamente 98% y todavía más preferentemente de por lo menos aproximadamente 99% con: (a) los residuos 1 o aproximadamente 22 a 723 del polipéptido PRO172 mostrado en la figura 2 (SEC ID n° 2), (b) X a 723 del polipéptido PRO172 mostrado en la figura 2 (SEC ID n° 2), en la que X es cualquier residuo aminoácido entre 17 y 26 de la figura 2 (SEC ID n° 2), (c) 1 o aproximadamente 22 a X de la figura 2 (SEC ID n° 2), en la que X es cualquier aminoácido entre el aminoácido 543 y el aminoácido 552 de la figura 2 (SEC ID n° 2), o (d) otro fragmento de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID n° 2) derivado específicamente.

Habitualmente, los polipéptidos variantes de PRO172 presenta una longitud de por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos, con frecuencia de por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos, más frecuentemente de por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 40 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 60 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 70 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 80 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 90 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 150 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 200 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 250 aminoácidos, con más frecuencia de por lo menos aproximadamente 300 aminoácidos, o más.

Tal como se muestra posteriormente, la Tabla 1 proporciona el código fuente completo para el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Este código fuente puede compilarse rutinariamente para la utilización en un sistema operativo UNIX para proporcionar el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2.

Además, las Tablas 2A-2B muestran ejemplificaciones hipotéticas para utilizar el procedimiento anteriormente indicado para determinar el % de identidad de secuencia de aminoácidos (Tablas 2A-2B) y el % de identidad de secuencias de ácidos nucleicos (Tablas 2C-2D) utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que "PRO" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido PEACH hipotético de interés, "proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente a la que se compara el polipéptido "PRO" de interés, el "ADN de comparación" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácidos nucleicos frente a la que se compara la molécula de ácidos nucleicos "ADN de PRO", "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos aminoácidos hipotéticos, y "N", "L" y "V" representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

```

5  /*
   *
   * C-C increased from 12 to 15
10  * Z is average of EQ
   * B is average of ND
   * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
   */
15  #define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int    _day[26][26] = {
/*      A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
20  /* A */ { 2, 0, -2, 0, 0, -4, 1, -1, -1, 0, -1, -2, -1, 0, _M, 1, 0, -2, 1, 1, 0, 0, -6, 0, -3, 0},
   /* B */ { 0, 3, -4, 3, 2, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 0, 0, 0, -2, -5, 0, -3, 1},
   /* C */ {-2, -4, 15, -5, -5, -4, -3, -3, -2, 0, -5, -6, -5, -4, _M, -3, -5, -4, 0, -2, 0, -2, -8, 0, 0, -5},
   /* D */ { 0, 3, -5, 4, 3, -6, 1, 1, -2, 0, 0, -4, -3, 2, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 2},
25  /* E */ { 0, 2, -5, 3, 4, -5, 0, 1, -2, 0, 0, -3, -2, 1, _M, -1, 2, -1, 0, 0, 0, -2, -7, 0, -4, 3},
   /* F */ {-4, -5, -4, -6, -5, 9, -5, -2, 1, 0, -5, 2, 0, -4, _M, -5, -5, -4, -3, -3, 0, -1, 0, 0, 7, -5},
   /* G */ { 1, 0, -3, 1, 0, -5, 5, -2, -3, 0, -2, -4, -3, 0, _M, -1, -1, -3, 1, 0, 0, -1, -7, 0, -5, 0},
   /* H */ {-1, 1, -3, 1, 1, -2, -2, 6, -2, 0, 0, -2, -2, 2, _M, 0, 3, 2, -1, -1, 0, -2, -3, 0, 0, 2},
30  /* I */ {-1, -2, -2, -2, -2, 1, -3, -2, 5, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -2, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -5, 0, -1, -2},
   /* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
   /* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
35  /* L */ {-2, -3, -6, -4, -3, 2, -4, -2, 2, 0, -3, 6, 4, -3, _M, -3, -2, -3, -3, -1, 0, 2, -2, 0, -1, -2},
   /* M */ {-1, -2, -5, -3, -2, 0, -3, -2, 2, 0, 0, 4, 6, -2, _M, -2, -1, 0, -2, -1, 0, 2, -4, 0, -2, -1},
   /* N */ { 0, 2, -4, 2, 1, -4, 0, 2, -2, 0, 1, -3, -2, 2, _M, -1, 1, 0, 1, 0, 0, -2, -4, 0, -2, 1},
   /* O */ { _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M,
40  0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M,
   /* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
   /* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
   /* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
45  /* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
   /* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
   /* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
   /* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
50  /* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
   /* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
   /* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
55  /* Z */ { 0, 1, -5, 2, 3, -5, 0, 2, -2, 0, 0, -2, -1, 1, _M, 0, 3, 0, 0, 0, 0, -2, -6, 0, -4, 4}
};

```

ES 2 290 606 T3

```

/*
*/
5  #include <stdio.h>
   #include <ctype.h>

   #define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
   #define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
10  #define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
   #define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

   #define DMAT        3       /* value of matching bases */
   #define DMIS        0       /* penalty for mismatched bases */
15  #define DINS0        8       /* penalty for a gap */
   #define DINS1        1       /* penalty per base */
   #define PINS0        8       /* penalty for a gap */
   #define PINS1        4       /* penalty per residue */

20  struct jmp {
      short             n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
      unsigned short    x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                          /* limits seq to 2^16 -1 */

25  struct diag {
      int               score;           /* score at last jmp */
      long              offset;          /* offset of prev block */
      short             ijmp;           /* current jmp index */
      struct jmp         jp;            /* list of jmps */
};

30  struct path {
      int               spc;             /* number of leading spaces */
      short             n[JMPS];        /* size of jmp (gap) */
      int               x[JMPS];        /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

35  char               *ofile;           /* output file name */
char               *namex[2];          /* seq names: getseqs() */
char               *prog;              /* prog name for err msgs */
char               *seqx[2];           /* seqs: getseqs() */
40  int               dmax;             /* best diag: nw() */
int               dmax0;              /* final diag */
int               dna;                /* set if dna: main() */
int               endgaps;            /* set if penalizing end gaps */
int               gapx, gapy;          /* total gaps in seqs */
50  int               len0, len1;       /* seq lens */
int               ngapx, ngapy;        /* total size of gaps */
int               smax;               /* max score: nw() */
int               *xbm;               /* bitmap for matching */
int               offset;             /* current offset in jmp file */
55  long              offset;           /* holds diagonals */
struct diag        *dx;               /* holds path for seqs */
struct path        pp[2];

char               *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
60  char               *getseq(), *g_calloc();

```

65

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|((1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A'))), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|((1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A')))
};

main(ac, av)
int ac;
char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps(); /* get the actual jmps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    char      *px, *py;           /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int        *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;               /* score for each type */
    int        ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register   id;                /* diagonal index */
    register   ij;                /* jmp index */
    register   *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register   xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biot 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

...nw

```

5   for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
      mis = col0[yy-1];
      if (dna)
          mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
      else
          mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];
10
      /* update penalty for del in x seq;
       * favor new del over ongoing del
       * ignore MAXGAP if weighting endgaps
       */
15     if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
20         } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
25         if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
30             ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongoing del
     */
35     if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
40         } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
45         if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
50             ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */
55
60
65

```

...nw

```

id = xx - yy + lenl - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writeimps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < lenl) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+insl*(lenl-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+insl*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

```

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
5  * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
10 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

15 #include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256 /* maximum output line */
#define P_SPC    3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

25 print()
{
    int ix, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
30         fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
35     olen = 60;
    ix = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
40         pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
45         lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        ix -= lastgap;
    }
50     else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
55     pr_align();
}

```

print

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
5 getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
    int      lx, ly;                /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;     /* leading trailing overlap */
{
    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
55         nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

...getmat

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);

    fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
    if (gapy) {
        (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
            ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
        fprintf(fx, "%s", outx);
    }
    if (dna)
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
            smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
    else
        fprintf(fx,
            "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
            smax, PINS0, PINS1);
    if (endgaps)
        fprintf(fx,
            "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
            firstgap, (dna)? "base": "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
            lastgap, (dna)? "base": "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}

static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

pr_align

...pr_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
5         * do we have more of this sequence?
        */
        if (!*ps[i])
            continue;

10        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
20             */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
            * are we at next gap for this seq?
            */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                * we need to merge all gaps
                * at this location
                */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]] + +;
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]] + +;
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
50 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
*/
static
dumpblock()
{
55     register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
60
65

```

dumpblock

...dumpblock

```

5      (void)putc('\n', fx);
      for (i = 0; i < 2; i++) {
          if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
              if (i == 0)
                  nums(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  stars();
              putline(i);
              if (i == 0 && *out[1])
                  fprintf(fx, star);
              if (i == 1)
                  nums(i);
          }
      }
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int      ix;      /* index in out[] holding seq line */
    char      nline[P_LINE];
    register  i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax + P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void)putc(*pn, fx);
    (void)putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, {num}, seq, {num}): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                putline
{
    int      ix;

```

...putline

```

5      int          i;
      register char *px;

      for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
          (void)putc(*px, fx);
      for (; i < lmax+P_SPC; i++)
          (void)putc(' ', fx);

10     /* these count from 1:
       * ni[] is current element (from 1)
       * nc[] is number at start of current line
       */
      for (px = out[ix]; *px; px++)
          (void)putc(*px&0x7F, fx);
      (void)putc('\n', fx);
  }

20  /*
   * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
   */
   static
   stars()
25  {
      int          i;
      register char *p0, *p1, cx, *px;

      if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
30         !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1]) == ' '))
          return;
      px = star;
      for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
          *px++ = ' ';

35     for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
40                 cx = '*';
                 nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                 cx = '.';
            else
45                 cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
50     }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
  }

```

stars

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
5 stripname(pn)                                stripname
    char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
    register char    *px, *py;

10    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;

15    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

```

ES 2 290 606 T3

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
5  * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
10 #include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";      /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;

15 int    cleanup();                      /* cleanup tmp file */
long    lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
20 cleanup(i)
    int    i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
25     exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
30 char    *
getseq(file, len)
35     char    *file;    /* file name */
    int    *len;    /* seq len */
{
    char    line[1024], *pseq;
    register char    *px, *py;
    int    natgc, tlen;
    FILE    *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
60
65

```

cleanup

getseq

...getseq

```

5      py = pseq + 4;
      *len = tlen;
      rewind(fp);

      while (fgets(line, 1024, fp)) {
          if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
              continue;
10         for (px = line; *px != '\n'; px++) {
             if (isupper(*px))
                 *py++ = *px;
             else if (islower(*px))
                 *py++ = toupper(*px);
15             if (index("ATGCU", *(py-1)))
                 natgc++;
         }
      }
      *py++ = '\0';
      *py = '\0';
      (void) fclose(fp);
      dna = natgc > (tlen/3);
      return(pseq+4);
}

25 char *
g_alloc(msg, nx, sz)
      char *msg;          /* program, calling routine */
      int nx, sz;          /* number and size of elements */
{
30     char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
35             fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

40 /*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
45     int fd = -1;
      int siz, i0, i1;
      register i, j, xx;

      if (fj) {
50         (void) fclose(fj);
         if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
             fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
             cleanup(1);
         }
55     }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

g_alloc

readjmps

...readjumps

```

5         if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
10        }
            else
                break;
        }
        if (i >= JMPS) {
            fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
            cleanup(1);
15        }
        if (j >= 0) {
            siz = dx[dmax].jp.n[j];
            xx = dx[dmax].jp.x[j];
            dmax += siz;
20            if (siz < 0) { /* gap in second seq */
                pp[1].n[i1] = -siz;
                xx += siz;

                /* id = xx - yy + len1 - 1
                */
                pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                gapy++;
                ngapy -= siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
30            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
35            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
    }
    else
        break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
50 }
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
55 }
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
60 }
}

```

ES 2 290 606 T3

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw0
 */
writejumps(ix)                                writejumps
{
    int    ix;

    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

TABLA 2A

PRO XXXXXXXXXXXXXXXXX (Longitud = 15 aminoácidos)

Proteína de XXXXXYYYYYYY (Longitud = 12 aminoácidos)
comparación

% de identidad de secuencia de aminoácidos =
(número de residuos aminoácidos correspondientes
idénticamente entre las dos secuencias de polipéptido
según determina ALIGN-2) dividido por (número total de
residuos aminoácidos del polipéptido PRO) =
5 dividido por 15 = 33,3%

TABLA 2B

PRO XXXXXXXXXX (Longitud = 10 aminoácidos)

Proteína de XXXXXYYYYYYZZYZ (Longitud = 15 aminoácidos)
comparación

% de identidad de secuencia de aminoácidos =
(número de residuos aminoácidos correspondientes

ES 2 290 606 T3

idénticamente entre las dos secuencias de polipéptido según determina ALIGN-2) dividido por (número total de residuos aminoácidos del polipéptido PRO) =
5 5 dividido por 10 = 50%

TABLA 2C

ADN de PRO NNNNNNNNNNNNNN (Longitud = 14 nucleótidos)

ADN de NNNNNNLLLLLLLLLLLL (Longitud = 16 nucleótidos)
comparación

% de identidad de secuencia de nucleótidos =
(número de nucleótidos correspondientes idénticamente entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según determina ALIGN-2) dividido por (número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de ADN de PRO) =
6 dividido por 14 = 42,9%

TABLA 2D

ADN de PRO NNNNNNNNNNNNNN (Longitud = 12 nucleótidos)

ADN de NNNNLLLTVV (Longitud = 9 nucleótidos)
comparación

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =
(número de nucleótidos correspondientes idénticamente entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según determina ALIGN-2) dividido por (número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de ADN de PRO) =
4 dividido por 12 = 33,3%

La expresión “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a la secuencia del polipéptido PRO172 identificada en la presente invención se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en una secuencia de PRO172 tras alinear las secuencias e introducir los huecos, si resulta necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines

de determinar la el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que se encuentran dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo, utilizar software informático disponible públicamente, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente invención, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se obtienen tal como se describe posteriormente, mediante la utilización del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. El autor del programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 es Genentech, Inc., y el código fuente mostrado en la Tabla 2 ha sido presentado con la documentación de usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde se encuentra registrado bajo el n° de registro U.S. Copyright TXU510087. El programa ALIGN-2 se encuentra disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debe compilarse para la utilización en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de las comparaciones de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

Para los fines de la presente invención, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto a, o con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos A dada A que presenta o comprende un determinado % de identidad de secuencias de aminoácidos respecto a, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la manera siguiente:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

en la que X es el número de residuos aminoácidos registrados como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de este programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos aminoácidos en B. Se apreciará que en el caso de que la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto A no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto a A. Como ejemplos de los cálculos de % de identidad de secuencia de aminoácidos, las Tablas 2A-2B demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencias de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada “proteína de comparación” respecto a la secuencia de aminoácidos denominada “PRO”.

A menos que se indique específicamente lo contrario, los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos utilizados en la presente invención se obtienen tal como se ha indicado anteriormente utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. Sin embargo, el % de identidad de secuencias de aminoácidos también puede determinarse utilizando el programa de comparación de secuencias NCB1-BLAST2 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997). El programa de comparación de secuencias NCB1-BLAST2 puede descargarse desde <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. NCB1-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en el que todos aquellos parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto, incluyendo, por ejemplo, unmask = yes, strand = all, expected occurrences = 10, minimum low complexity length = 15/5, multi-pass e-value = 0,01, constant for multi-pass = 25, dropoff for final gapped alignment = 25 and scoring matrix = BLOSUM62.

En las situaciones en las que se utiliza NCB1-BLAST2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencias de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que alternativamente puede expresarse como que una secuencia de aminoácidos dada A que presenta o comprende un % determinado de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o contra una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la manera siguiente:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

en la que X es el número de residuos aminoácidos registrado como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias NCB1-BLAST2 en la alineación de este programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos aminoácidos de B. Se apreciará de que en el caso de que la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A respecto B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B respecto a A.

Además, el % de identidad de secuencia de aminoácidos también puede determinarse utilizando el programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266:460-480, 1996). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Aquellos no fijados a valores por defecto, es decir los parámetros ajustables, se fijan en los valores siguientes: overlap span = 1, overlap fraction = 0,125, word threshold (T) = 11, y scoring matrix = BLOSUM62. Para los fines de la presente invención, se determina un valor de % de identidad de secuencias de aminoácidos dividiendo (a) el número de residuos aminoácidos correspondientes idénticos entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés con una secuencia derivada del polipéptido PRO nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia respecto a la que se compara el polipéptido PRO de interés que puede ser un polipéptido PRO variante) según determina WU-BLAST-2, por (b) el número total de residuos aminoácidos del polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la expresión “un polipéptido

que comprende una secuencia de aminoácidos A que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos el 80% respecto a la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés.

5 El término “aislado” cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos dados a conocer en la presente invención, se refiere a un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Preferentemente, el polipéptido aislado se encuentra libre de asociaciones con todos los componentes con los que se encuentra asociado naturalmente. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que habitualmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y entre ellos pueden incluirse 10 enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferentes, el polipéptido se purifica (1) en un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. Entre 15 los polipéptidos aislados se incluyen un polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, debido a que por lo menos un componente el ambiente natural de PRO172 no se encontrará presente. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se prepara mediante por lo menos una etapa de purificación.

El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia 20 codificante operablemente ligada a un organismo huésped particular. Entre las secuencias de control que resultan adecuadas para los procariotas, por ejemplo, se incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador, y un sitio de unión ribosómica. Las células eucarióticas es conocido que utilizan promotores, señales de poliadenilación e intensificadores.

25 Los ácidos nucleicos se encuentran “operablemente ligados” cuando se sitúan en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor se une operablemente a ADN para un polipéptido si se expresa en forma de una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un intensificador se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión ribosómica se encuentra operablemente ligado a una secuencia codificante si se 30 sitúa de manera que facilite la traducción. Generalmente, “operablemente ligado” significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en el mismo marco de lectura. Sin embargo, los intensificadores no son necesariamente contiguos. El ligamiento se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si estos sitios no existen, se utilizan adaptadores o *linkers* oligonucleótidos de síntesis de acuerdo con la práctica convencional.

35 La expresión “etiquetada con epítipo” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido químico que comprende un polipéptido PRO172 fusionado con un “polipéptido de etiqueta”. El polipéptido etiqueta presenta suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que se puede preparar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto para no interferir con la actividad del polipéptido al que se encuentra fusionado. El polipéptido 40 etiqueta preferentemente también es bastante único de manera que el anticuerpo no reacciona cruzadamente de manera sustancial con otros epítipos. Los polipéptido etiqueta adecuados generalmente presentan por lo menos seis residuos aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos aminoácidos (preferentemente entre aproximadamente 10 y 20 residuos aminoácidos).

45 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “inmunoadhesina” se refiere a moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (de una “adhesina”) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es diferente el sitio de reconocimiento y unión de antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmunoadhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua 50 que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o de un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

55 El término “activo” o “actividad” para los fines de la presente invención se refiere a una o más formas de PRO172 que conservan una actividad biológica y/o inmunológica de PRO172 nativo o de origen natural en la que la actividad “biológica” se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) causada por una PRO172 nativa o de origen natural diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un PRO172 nativo o de origen natural y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción 60 de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un PRO172 nativo o de origen natural.

La expresión “actividad biológica” en el contexto de un anticuerpo u otro agonista que pueda identificarse mediante los ensayos de cribado dados a conocer en la presente invención (por ejemplo una molécula pequeña orgánica o inorgánica, un péptido, etc.) se utiliza para referirse a la capacidad de estas moléculas de inducir uno o más de los efectos indicados en la presente memoria en relación a la definición de una “cantidad terapéuticamente eficaz”. En una 65 realización específica, “actividad biológica” es la capacidad de inhibir el crecimiento o proliferación de células neoplásicas. Una actividad biológica preferente es la inhibición, incluyendo el entretimiento o la detención completa, del crecimiento de una diana celular tumoral (por ejemplo una célula cancerosa). Otra actividad biológica preferente es

la actividad citotóxica resultante en la muerte de la diana celular tumoral (por ejemplo una célula cancerosa). Todavía otra actividad biológica preferente es la inducción de la apoptosis de una diana celular tumoral (por ejemplo una célula cancerosa).

- 5 La expresión “actividad inmunológica” se refiere a reactividad cruzada inmunológica con por lo menos un epítipo de un polipéptido PRO172.

La expresión “reactividad cruzada inmunológica” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a que el polipéptido candidato es capaz de inhibir competitivamente la actividad biológica cualitativa de un polipéptido PRO172 que presenta dicha actividad con antisueros policlonales cultivados contra el polipéptido PRO172 activo conocido. Dichos antisueros se preparan de manera convencional mediante inyección en cabras o conejos, por ejemplo, por vía subcutánea con el análogo activo conocido en adyuvante completo de Freund, seguido de la inyección intraperitoneal o subcutánea de refuerzo en adyuvante incompleto de Freund. La reactividad cruzada inmunológica preferentemente es “específica”, lo que significa que la afinidad de unión de la molécula de reactividad cruzada inmunológica (por ejemplo un anticuerpo) identificada por el polipéptido PRO172 correspondiente es significativamente superior (preferentemente por lo menos aproximadamente 2 veces, más preferentemente por lo menos aproximadamente 4 veces, todavía más preferentemente por lo menos aproximadamente 6 veces, más preferentemente por lo menos aproximadamente 8 veces superior) que la afinidad de unión de dicha molécula por cualquier otro polipéptido nativo conocido.

- 20 El término “tumor” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, malignas o benignas, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refiere o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Entre los ejemplos más particulares de estos cánceres se incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer cervical, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer renal, cáncer vulvar, cáncer del tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

El término “tratamiento” se refiere a una intervención que se lleva a cabo con la intención de prevenir el desarrollo, o de alterar la patología, de un trastorno. Por consiguiente, el término “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Entre aquellos que necesitan tratamiento se incluyen aquellos que ya presentan el trastorno, así como aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. En el tratamiento de tumores (por ejemplo del cáncer), un agente terapéutico puede reducir directamente la patología de las células tumorales o provocar que las células tumorales sean más susceptibles al tratamiento con otros agentes terapéuticos, por ejemplo la radiación y/o la quimioterapia.

- 40 La “patología” del cáncer incluye todos los fenómenos que comprometen el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, el crecimiento celular anormal o incontrolable, la metástasis, la interferencia con el funcionamiento normal de células vecinas, la liberación de citoquinas o de otros productos secretorios a niveles anormales, la supresión o el agravamiento de la respuesta inflamatoria o inmunológica, etc.

- 45 Una “cantidad eficaz” de un polipéptido dado a conocer en la presente memoria o un agonista del mismo en referencia a la inhibición del crecimiento celular neoplásico es una cantidad capaz de inhibir, en algún grado, el crecimiento de las células diana. El término incluye una cantidad capaz de inducir un efecto inhibidor del crecimiento, citostático y/o citotóxico y/o la apoptosis de las células diana. Una “cantidad eficaz” de un polipéptido PRO172 o un agonista del mismo para los fines de inhibir el crecimiento celular neoplásico puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” en referencia al tratamiento de un tumor se refiere a una cantidad capaz de inducir uno o más de los efectos siguientes: (1) inhibición, en algún grado, del crecimiento tumoral, incluyendo, el enlentecimiento y detención completa del crecimiento; (2) reducción del número de células tumorales; (3) reducción del tamaño del tumor; (4) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la infiltración de células tumorales en órganos periféricos; (5) inhibición (es decir, reducción, enlentecimiento o detención completa) de la metástasis; (6) intensificación de la respuesta inmunológica antitumoral, que puede, aunque no necesariamente, resulta en agresión o rechazo del tumor; y/o (7) alivia, en algún grado, uno o más de los síntomas asociados con el trastorno. Una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un polipéptido PRO172 o un agonista del mismo para los fines del tratamiento de un tumor puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria.

Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un polipéptido PRO172 o de un agonista del mismo es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente de un tumor, por ejemplo de una célula cancerosa, *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un polipéptido PRO172 o de un agonista del mismo para los fines de inhibir el crecimiento celular neoplásico puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria.

Una “cantidad citotóxica” de un polipéptido PRO172 o de un agonista del mismo es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente de un tumor, por ejemplo de una célula cancerosa, *in vitro* o *in vivo*. Una

“cantidad citotóxica” de un polipéptido PRO172 o de un agonista del mismo para los fines de inhibir el crecimiento celular neoplásico puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria.

La expresión “agente citotóxico” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o que previene la función de las células y/o causa la destrucción de las mismas. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo I131, I125, Y90 y Re186), agentes quimioterapéuticos, y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico que resulta útil en el tratamiento de un tumor, por ejemplo de un cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinósido (“Ara-C”), ciclofosfamida, tiotepa, busulfán, citoxina, taxoides, por ejemplo paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (ver la patente US nº 4.675.187), melfalán y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También se incluyen en esta definición los agentes hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción hormonal sobre los tumores, tales como el tamoxifén y la onapristona.

Un “agente inhibidor del crecimiento” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto o a una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente de un tumor, por ejemplo de una célula cancerosa, sea *in vitro* o *in vivo*. De esta manera, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de las células diana en la fase S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un momento diferente de la fase S), tales como los agentes que inducen la detención de la fase G1 y la detención de la fase M. Entre los bloqueantes clásicos de la fase M se incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxol, y los inhibidores topo II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen la fase G también se desbordan hacia la detención de la fase S, por ejemplo los agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifén, prednisona, decarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn y Israel, editores, capítulo 1, titulado “Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs”, por Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13.

El término “citoquina” es un término genérico para las proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Entre los ejemplos de estas citoquinas se encuentran la hormona del crecimiento humana, la N-metionil-hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroide; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteínas, tales como la hormona folículo-estimulante (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento fibroblástico; prolactina; lactógeno placentario; factores α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β ; factores I y II de crecimiento similar a insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones, tales como los interferones α , β y γ , factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como el CSF de macrófagos (M-CSF), el CSF de granulocito-macróforo (GM-CSF) y CSF de granulocito (G-CSF), interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β , y otros factores polipéptidos, incluyendo LIF y ligando de kit (KL). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “citoquina” incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término “profármaco” tal como se utiliza en la presente solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menor citotóxica para las células tumorales comparado con el fármaco parental y que es capaz de activarse o convertirse enzimáticamente en la forma parental más activa (ver, por ejemplo, Wilman, “Prodrugs in Cancer Chemotherapy”, *Biochemical Society Transactions* 14:375-382, 615th Meeting Belfast, 1986, y Stella *et al.*, “Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery”, *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, editores, páginas 247 a 267, Humana Press, 1985. Entre los profármacos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los profármacos que contienen fosfato, los profármacos que contienen tiofosfato, los profármacos glicosilados o los profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, 5-fluorocitosina y entre otros fármacos 5-fluorouridina que pueden derivatizarse en una forma profármaco para la utilización en la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, aquellos agentes quimioterapéuticos indicados anteriormente.

El término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido PRO172 nativo dado a conocer en la presente invención. Entre las moléculas agonistas adecuadas se incluyen anticuerpos agonistas o fragmentos de anticuerpo, fragmentos o variantes de secuencia de aminoácidos de polipéptidos PRO172 nativos, péptidos, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los procedimientos para identificar agonistas de un polipéptido PRO172 pueden comprender poner en contacto una célula tumoral con un agonista candidato y medir la inhibición del crecimiento de la célula tumoral.

La administración “crónica” se refiere a la administración del agente o agentes en un modo continuo, por oposición a un modo agudo, de manera que se mantenga el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo

prolongado. La administración “intermitente” es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que más bien es de naturaleza cíclica.

El término “mamífero” para los fines del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo el ser humano, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, de competición o de compañía, tales como perros, gatos, vacas, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

El término “portadores” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que resultan no tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones utilizadas. Con frecuencia, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina sérica, la gelatina o las inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como la polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactante que resulta útil para la administración de un fármaco (tal como un polipéptido PRO173) a un mamífero. Los componentes del liposoma comúnmente se disponen en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

Una “molécula pequeña” se define en la presente invención como aquella molécula con un peso molecular inferior a aproximadamente 500 daltons.

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Polipéptidos PRO172 de longitud completa

La presente exposición proporciona secuencias de nucleótidos identificados y aislados que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como PRO172. En particular, se ha identificado y aislado ADNc codificante de polipéptido PRO172, tal como se da a conocer en más detalle en los Ejemplos posteriormente.

Tal como se da a conocer en los Ejemplos posteriormente, se ha depositado en la ATCC un clon de ADNc codificante del polipéptido PRO172. La secuencia de nucleótidos real del clon puede ser fácilmente determinada por un experto en la materia mediante secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos rutinarios de la técnica. La secuencia de aminoácidos teórica puede determinarse a partir de la secuencia de nucleótidos utilizando conocimientos ordinarios en la materia. Para el polipéptido PRO172 y ácido nucleico codificante indicados en la presente invención, los Solicitantes han identificado lo que se considera el marco de lectura mejor identificable con la información de secuencia disponible en la actualidad.

B. Variantes de PRO172

Además del polipéptido PRO172 de secuencia nativa de longitud completa indicado en la presente invención, se contempla que puedan prepararse variantes de PRO172. Las variantes de PRO172 pueden prepararse introduciendo cambios apropiados de nucleótidos en el ADN de PRO172 y/o mediante síntesis del polipéptido PRO172 deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios aminoácidos pueden alterar procesos post-traduccionales del polipéptido PRO172, tales como cambiar el número o la posición de los sitios de glucosilación o alterando las características de anclaje a membrana.

Pueden realizarse variaciones del PRO172 nativo de secuencia de longitud completa o de diversos dominios de PRO172 indicados en la presente invención, por ejemplo utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para las mutaciones conservativas y no conservativas indicadas, por ejemplo, en la patente US n° 5.364.934. Las variaciones pueden ser sustituciones, deleciones o inserciones de uno o más codones codificantes de PRO172 que resultan en un cambio en la secuencia de aminoácido de PRO172 en comparación con PRO172 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de PRO172. Pueden encontrarse directrices para determinar qué residuo aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar adversamente la actividad deseada comparando la secuencia de PRO172 con la de moléculas de proteína homólogas conocidas y minimizando el número de cambios de la secuencia de aminoácidos realizados en la regiones de homología elevada. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido con propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativas. Las inserciones o deleciones opcionalmente pueden ser de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinar-

se realizando sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y analizando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia de longitud completa o la secuencia nativa madura.

5 En la presente invención se proporcionan fragmentos de polipéptido PRO172. Estos fragmentos pueden truncarse en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo en comparación con una proteína nativa de longitud completa. Determinados fragmentos carecen de residuos aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO172.

10 Pueden prepararse fragmentos de PRO172 mediante cualquiera de entre varias técnicas convencionales. Pueden sintetizarse químicamente fragmentos de péptido deseados. Un enfoque alternativo implica generar fragmentos de PRO172 mediante digestión enzimática, por ejemplo mediante el tratamiento de la proteína con un enzima que es conocido que corta proteínas en sitios definidos por residuos aminoácidos particulares, o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuados y aislando el fragmento deseado. Todavía otra técnica adecuada más im-
15 plica aislar y amplificar un fragmento de ADN codificante de un fragmento de polipéptido deseado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizan oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos de polipéptido PRO172 comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO172 nativo mostrado en la figura 2 (SEC ID nº 2).

20 En realizaciones particulares, se muestran las sustituciones conservativas en la Tabla 3 bajo el título de sustituciones preferentes. Si estas sustituciones resultan en un cambio de actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 3, o que se describen en más detalle posteriormente en referencia a las clases de aminoácidos, y se criban los productos.

TABLA 3

30	Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
	Ala (A)	val; leu; ile	val
35	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
	Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
	Asp (D)	glu	glu
40	Cys (C)	ser	ser
	Gln (Q)	asn	asn
	Glu (E)	asp	asp
45	Gly (G)	pro; ala	ala
	His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
50	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
	Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
55	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
60	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
	Pro (P)	ala	ala
	Ser (S)	thr	thr
65	Thr (T)	ser	ser

Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala;	leu
	norleucina	

Se consiguen modificaciones sustanciales de función o de identidad inmunológica del polipéptido PRO172 seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo de conformación de hoja o de hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de sus cadenas laterales:

- (1) hidrofóbicos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutros hidrofílicos: cys, ser, thr;
- (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, ain, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen sobre la orientación de cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas suponen intercambiar un miembro de estas clases por un miembro de otra clase. Estos residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones pueden llevarse a cabo utilizando procedimientos conocidos de la técnica, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (sitio-dirigida), el escaneo de alaninas, y la mutagénesis por PCR. Puede llevarse a cabo mutagénesis sitio-dirigida (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res. 13:4331, 1986; Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res. 10:6487, 1987), mutagénesis por inserción de casete (Wells *et al.*, Gene 34:315, 1985), mutagénesis de selección por restricción (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317:415, 1986) u otras técnicas conocidas sobre el ADN clonado con el fin de producir ADN variante de PRO211, de PRO228, de PRO538, de PRO172 o de PRO182.

También puede utilizarse el análisis de escaneo de aminoácidos para identificar uno o más aminoácidos junto con una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de escaneo preferentes se encuentran los aminoácidos neutros de tamaño relativamente reducido. Entre estos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de escaneo preferente de entre este grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante (Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085, 1989). La alanina habitualmente también resulta preferente debido a que es el aminoácido más frecuente. Además, con frecuencia se encuentra en posiciones tanto enterradas como expuestas ((Creighton, The Proteins, W.H. Freeman & Co., N.Y.), Choithia, J. Mol. Biol. 150:1, 1976)). Si la sustitución de alaninas no proporciona cantidades adecuadas de variante, puede utilizarse un aminoácido isotérico.

C. Modificaciones de PRO172

Las modificaciones covalentes de PRO172 se encuentran comprendidas dentro del alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos aminoácidos diana de un polipéptido PRO172 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N-terminales o C-terminales de PRO172. La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil, por ejemplo, para entrecruzar PRO172 con una matriz de soporte insoluble en agua o a una superficie para la utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO172 y viceversa. Entre los agentes reticulantes utilizados comúnmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de succinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano, y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Entre otras modificaciones se incluyen la desamidación de los residuos glutaminilo y asparaginilo para formar los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de prolina y de lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86, 1983), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO172 comprendido dentro del alcance de la presente invención comprende alterar el patrón de glucosilación nativo del polipéptido. La expresión “alterar el patrón de glucosilación nativo” pretende para los fines de la presente invención delecionar uno o más grupos carbohidrato encontrados en el PRO172 de secuencia nativa (eliminando el sitio de glucosilación subyacente o delecionando la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el PRO172 de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio de la naturaleza y las proporciones de los diversos grupos carbohidratos presentes.

Puede conseguirse la adición de sitios de glucosilación al polipéptido PRO172 mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos. La alteración puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la adición o sustitución de uno o más residuos de serina o de treonina al PRO172 de secuencia nativa (para sitios de glucosilación O-ligados). La secuencia de aminoácidos de PRO172 puede alterarse opcionalmente mediante cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN codificante del polipéptido PRO172 en bases preseleccionadas de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para incrementar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido PRO172 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptidos. Estos procedimientos se describen en la técnica, por ejemplo en la patente WO n° 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259 a 306, 1981.

La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido PRO172 puede conseguirse químicamente o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones codificantes de residuos aminoácidos que sirven como dianas para la glucosilación. Se conocen en la técnica técnicas químicas de desglucosilación y que se describen, por ejemplo, en Hakimuddin *et al.*, Arch. Biochem. Biophys 259:52, 1987, y en Edge *et al.*, Anal. Biochem. 118:1311, 1981. El corte enzimático de grupos carbohidrato en los polipéptidos puede conseguirse mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas, tal como describen Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol. 138:350, 1987.

Otro tipo de modificación covalente de PRO172 comprende unir el polipéptido PRO172 a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera indicada en las patentes US n° 4.640.835, n° 4.496.689, n° 4.301.144, n° 4.670.417, n° 4.791.192 o n° 4.179.337.

El polipéptido PRO172 de la presente invención también puede modificarse de manera que se forme una molécula quimérica que comprende PRO172 fusionado con otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido PRO172 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede ligarse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta epítipo generalmente se sitúa en el extremo amino-terminal o carboxi-terminal del polipéptido PRO172. La presencia de estas formas etiquetadas con epítipo del polipéptido PRO172 pueden detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la provisión del epítipo etiqueta permite la fácil purificación del polipéptido PRO172 mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítipo etiqueta. Son bien conocidos de la técnica diversos polipéptidos etiqueta y sus anticuerpos respectivos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas polihistidina (poli-His) o poli-histidina-glicina (poli-His-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.*, Mol. Cell Biol. 8:2159-2165, 1988); la etiqueta c-myc y los anticuerpos de la misma 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616, 1985) y la etiqueta glucoproteína D del virus del herpes simplex (gD) y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, Protein Engineering 3(6):547-553, 1990). Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.*, BioTechnology 6:1204-1210, 1988), el epítipo péptido KT3 (Martin *et al.*, Science 255:192-194, 1992); un epítipo péptido α -tubulina (Skinner *et al.*, J. Biol. Chem. 266:15163-15166, 1991); y la etiqueta péptido de la proteína del gen 10 de T7 (Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6393-6397, 1990).

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del polipéptido PRO172 con una inmunoglobulina o con una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada “inmunoadhesina”), dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones de Ig preferentemente incluyen la sustitución de una forma soluble (con deleción o inactivación del dominio transmembranal) de un polipéptido PRO172 en lugar de por lo menos una región variable interior de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra CH1, CH2 y CH3 de una molécula de Ig1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina ver también la patente US n° 5.428.130, publicada el 27 de junio de 1995.

D. Preparación de PRO172

La descripción posteriormente se refiere principalmente a la producción de PRO172 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico de PRO172. Evidentemente se contempla que puedan utilizarse procedimientos alternativos, que son bien conocidos de la técnica, para preparar PRO172. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido PRO172, o partes del mismo, pueden producirse mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida (ver, por ejemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA, 1969; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963). La síntesis de proteínas

in vitro puede llevarse a cabo utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede conseguirse, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Diversas partes del polipéptido PRO211 pueden sintetizarse químicamente de manera separada y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido PRO211 de longitud completa.

1. Aislamiento de ADN codificante de PRO172

El ADN codificante de PRO172 puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO172 y que lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, puede obtenerse convenientemente el ADN de PRO172 humano a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen codificante de PRO172 también puede obtenerse a partir de una biblioteca genómica mediante procedimientos sintéticos (por ejemplo síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Pueden cribarse bibliotecas con sondas (tales como anticuerpos contra PRO172 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20 a 80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o de la biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándares, tales como lo descritos en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen codificante de PRO172 es utilizar metodología de PCR (Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenback *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

Los Ejemplos posteriormente describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de suficiente longitud y suficientemente no ambiguas para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido preferentemente se marca de manera que pueda detectarse tras la hibridación con ADN en la biblioteca que se está cribado. Son conocidos de la técnica los procedimientos de marcaje, y entre ellos se incluyen la utilización de marcajes radioactivos, tales como el ATP marcado con ³²P, la biotinylation o el marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en estos procedimientos de cribado de biblioteca pueden compararse y alinearse a otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas, tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencias (a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa, puede determinarse utilizando procedimientos conocidos de la técnica y tal como se describe en la presente invención.

Los ácidos nucleicos que presentan secuencia codificante de proteína pueden obtenerse cribando bibliotecas seleccionadas de ADNc o genómicas con la secuencia de aminoácidos deducida que se da a conocer en la presente invención por primera vez y, si resulta necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión de cebadores, tal como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, para la detección de precursores y el procesamiento de intermediarios de ARNm que posiblemente no han sido transcritos inversamente para formar ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped se transfectan o se transforman con vectores de expresión o de clonación descritos en la presente invención para la producción de PRO172 y se cultivan en medio nutritivo convencional según resulte apropiado para inducir los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar los genes codificantes de las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como los medios, la temperatura, el pH y similares, pueden ser seleccionados por el experto en la materia sin experimentación excesiva. En general pueden encontrarse principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, editor (IRL Press, 1991) y en Sambrook *et al.*, *supra*.

Los procedimientos de transfección de células eucarióticas y de transformación de células procarióticas son conocidos para el experto ordinario en la materia, por ejemplo CaCl₂, CaPO₄, mediada por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se lleva a cabo utilizando técnicas estándar apropiadas para estas células. El tratamiento con calcio utilizando cloruro de calcio, tal como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación generalmente se utiliza para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de determinadas células vegetales, tal como describen Shaw *et al.*, Gene 23:315, 1983, y la patente WO n° 89/05859, publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin estas paredes celulares, puede utilizarse el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology 52:456-457, 1978. Los aspectos generales de las transfecciones de sistemas de célula huésped de mamífero se han descrito en la patente US n° 4.399.216. Las transformaciones en las levaduras habitualmente se llevan a cabo de acuerdo con el procedimiento de van Solingen *et al.*, J. Bact. 130:946, 1977, y de Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:3829, 1979. Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos para introducir ADN en las células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policondicionamiento, por ejemplo polibreno o poliornitina. Para las diversas técnicas para transformar células de mamífero ver Keown *et al.*, Methods in Enzymology 185:527-537, 1990, y Mansour *et al.*, Nature 336:348-352, 1988.

Entre las células huésped adecuadas para la clonación y la expresión de ADN en los vectores de la presente invención se incluyen las células de procariotas, de levadura o de eucariotas superiores. Entre los procariotas adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, eubacterias, tales como los organismos Gram-negativos y Gram-positivos, por ejemplo *Enterobacteriaceae*, tales como *E. coli*. Se encuentran públicamente disponibles diversas cepas de *E. coli*, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC n° 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC n° 31.537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC n° 27.325) y K5772 (ATCC n° 53.635). Entre otras células huésped procarióticas adecuados se incluyen *Enterobacteriaceae* tales como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo *Serratia marcescens*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo *B. licheniformis* 41P, dada a conocer en la patente DD n° 266.710, publicada el 12 de abril de 1989); *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos. La cepa W3110 es un huésped particularmente preferente o huésped parental debido a que es una cepa común de huésped para las fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para producir una mutación genética en los genes codificantes de proteínas endógenas al huésped, incluyéndose entre los ejemplos de estos huéspedes *E. coli* W3110 cepa 1A2, que presenta el genotipo tonA completo; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que presenta el genotipo tonA ptr3 completo; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC n° 55.244), que presenta el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT karf; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que presenta el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación por delección degP no resistente a la canamicina; y una cepa de *E. coli* con una proteasa periplásmica mutante dada a conocer en la patente US n° 4.946.783, publicada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, resultan adecuados los procedimientos *in vitro* de clonación, por ejemplo PCR u otras reacciones de polimerasa de ácidos nucleicos.

Además de los procariotas, los microbios eucarióticos, tales como hongos filamentosos o levaduras, resultan huéspedes de expresión o de clonación adecuados para vectores codificantes de PRO172. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado comúnmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature 290:140, 1981; patente EP n° 139.383, publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (patente US n° 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology 9:968-975, 1991), tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol. 737, 1983), *K. fragilis* (ATCC n° 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC n° 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC n° 24.178), *K. waltii* (ATCC n° 56.500), *K. drosophilae* (ATCC n° 36.906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology 8:135, 1990), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (patente EP n° 402.226); *Pichiapastoris* (patente EP n° 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol. 28:265-278, 1988); *Candida*: *Trichoderma reesia* (patente EP n° 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5259-5263, 1979); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (patente EP n° 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (patente WO n° 91/00357, publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-289, 1983); Tilburn *et al.*, Gene 26:205-221, 1983; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474, 1984), y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J. 4:475-479, 1985). Las levaduras metilotróficas resultan adecuadas en la presente invención e incluyen, aunque sin limitarse a ellas, levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas de entre los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras puede encontrarse en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs 269, 1982.

Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO172 glucosilado se derivan a partir de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen células de insecto, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Entre los ejemplos de células huésped de mamífero se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células COS. Entre ejemplos más específicos se incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL n° 1651), la línea renal embrionaria humana (células 293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59, 1977; células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980), células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251, 1980); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (HepG2, HB 8065), y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL 51). La selección de la célula huésped apropiada se considera que se encuentra dentro de los conocimientos del experto en la materia.

3. Selección y utilización de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo ADNc o ADN genómico) codificante de PRO172 puede insertarse en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Se encuentran públicamente disponibles diversos vectores. El vector puede encontrarse, por ejemplo, en la forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, se inserta ADN en uno o más sitios apropiados de restricción por endonucleasa utilizando técnicas conocidas de la técnica. Entre los componentes de vector se incluyen generalmente, aunque sin limitarse a ellos, uno o más de entre una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor, y una secuencia de terminación de transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utilizando técnicas estándar de ligación que son conocidas para el experto en la materia.

PRO172 puede producirse recombinantemente no sólo directamente, sino también en forma de polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que presenta un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN codificante de PRO172 que se inserta en el vector.

La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, de entre el grupo de fosfatasa alcalina, penicilasa, Ipp, o líderes de la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en la levadura, la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder invertasa de levadura, el líder factor alfa (incluyendo los líderes de factor α de *Saccharomyces* y de *Kluyveromyces*, éste último descrito en la patente US nº 5.010.182), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (patente EP nº 362.179, publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en la patente WO 90/t3646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión celular de mamífero, las secuencias de señal de mamífero pueden utilizarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias de señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de una especie relacionada, así como líderes secretorios víricos.

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Estas secuencias son bien conocidas en una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 resulta adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ resulta adecuado para las levaduras, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) resultan útiles para la clonación de vectores en células de mamífero.

Los vectores de expresión y de clonación habitualmente contienen un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) proporcionan resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo a ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo el gen codificante de la D-alanina racemasa para los Bacilli.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para incorporar el ácido nucleico codificante de PRO172, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal como se describe en Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980. Un gen de selección adecuado para la utilización en las levaduras es el gen *trpI* presentes en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature 282:39, 1979; Kingsman *et al.*, Gene 7:141, 1979; Tschemper *et al.*, Gene 10:157, 1980). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC nº 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85:12, 1977).

Los vectores de expresión y de clonación habitualmente contienen un promotor ligado operablemente a una secuencia de ácido nucleico codificante de PRO172 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por una diversidad de potenciales células huésped son bien conocidos. Los promotores adecuados para la utilización con huésped procarióticos incluyen los sistemas promotores de la β -lactamasa y de la lactosa (Chang *et al.*, Nature 275:615, 1978; Goeddel *et al.*, Nature 281:544, 1979), la fosfatasa alcalina, un sistema promotor triptófano (*trp*) (Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980, patente EP nº 36.776) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* (deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25, 1983). Los promotores para la utilización en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operablemente ligada al ADN codificante de PRO172.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuados para la utilización con huéspedes levaduras e incluyen promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) u otros enzimas glicolíticos (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland, Biochemistry 17:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura que son promotores inducibles con la ventaja adicional de que la transcripción se encuentra controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas degradativos asociados al metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y de la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en sistemas de expresión de levadura se describen adicionalmente en la patente EP nº 73.657.

La transcripción de PRO172 a partir de vectores en células huésped de mamífero se encuentra controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como el virus polioma, el poxvirus aviar (patente UK nº 2.211.504, publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tales como el adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 del simio (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, por ejemplo el promotor actina o un promotor inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, con la condición de que estos promotores sean compatibles con los sistemas celulares huésped.

La transcripción de un ADN codificante de PRO172 por eucariotas superiores puede incrementarse insertando una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente de aproximadamente entre 10 y 300 pb, que actúan sobre un promotor incrementando su transcripción. En

la actualidad se conocen muchas secuencias intensificadoras de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se utiliza un intensificador de un virus de célula eucariótica. Entre los ejemplos se incluyen el intensificador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), el intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus. El intensificador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia codificante de PRO172, pero preferentemente se sitúa en un sitio 5' respecto al promotor.

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (levaduras, hongos, células de insecto, planta, animal, ser humano, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contienen secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Estas secuencias se encuentran disponibles comúnmente de regiones no traducidas 5' y ocasionalmente 3' respecto a ADNs o ADNc víricos o eucarióticos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm codificante de PRO172.

Se describen todavía otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuadas para la adaptación a la síntesis de PRO172 en cultivo recombinante de células de vertebrado, en Gething *et al.*, Nature 293:620-625, 1981; Mantei *et al.*, Nature 281:40-46, 1979, patentes EP n° 117.060 y n° 117.058.

4. Detección de la amplificación/expresión génica

La amplificación y/o expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo mediante transferencia southern convencional, transferencia northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205, 1980), transferencia en mancha (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda apropiadamente marcada, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, y dúplex híbridos ADN-ARN o dúplex ADN-proteína. Los anticuerpos, a su vez, pueden marcarse y el ensayo llevarse a cabo donde el dúplex se encuentra unido a una superficie, de manera que tras la formación de dúplex sobre la superficie, pueda detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

La expresión génica, alternativamente, puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tal como la tinción inmunohistoquímica de células o de secciones de tejido y el ensayo del cultivo celular o de líquidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos que resultan útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de líquidos de muestra pueden ser monoclonal o policlonal, y puede prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido PRO172 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de PRO172 y codificante de un epítipo de anticuerpo específico.

5. Purificación de polipéptido

Pueden recuperarse formas de PRO172 a partir de medio de cultivo o a partir de lisados de células huésped. Si se encuentra unido a membrana, puede liberarse de la membrana utilizando una solución detergente adecuada (por ejemplo Triton-X100) o mediante corte enzimático. Las células utilizadas en la expresión de PRO172 pueden romperse mediante diversos medios físicos o químicos, tales como el ciclado de congelación-descongelación, sonicación, disrupción mecánica o agentes de lisado celular.

Puede desearse purificar PRO172 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los procedimientos siguientes son ejemplares de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-sefárosa para eliminar contaminantes, tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo de PRO172. Pueden utilizarse diversos procedimientos de purificación de proteínas y estos procedimientos son conocidos de la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology 182, 1990; Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York, 1992. La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción utilizado y del PRO172 particular producido.

E. Identificación de proteínas capaces de inhibir el crecimiento o proliferación de células neoplásicas

Las proteínas dadas a conocer en la presente solicitud han sido sometidas a ensayo en un panel de 60 líneas de células tumorales utilizadas en la actualidad en el cribado *in vitro* experimental para el descubrimiento de fármacos del National Cancer Institute (NCI). El propósito de este cribado es identificar moléculas que presentan actividad citotóxica y/o citostática contra diferentes tipos de tumores. El NCI criba más de 10.000 nuevas moléculas al año (Monks *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 83:757-766, 1991; Boyd, Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update 3(10):1-12, 1989). Las líneas de células tumorales utilizadas en el presente estudio han sido descritas en Monks *et al.*, *supra*. Las líneas celulares cuyo crecimiento ha resultado significativamente inhibido por las proteínas de la presente solicitud se especifican en los Ejemplos.

Los resultados demuestran que las proteínas sometidas a ensayo muestran actividades citostáticas y, en algunas casos y concentraciones, actividades citotóxicas en una diversidad de líneas de células cancerosas y por lo tanto resultan candidatos útiles para la terapia tumoral.

- 5 También pueden utilizarse otros ensayos basados en células y modelos animales para los tumores (por ejemplo para cánceres) con el fin de verificar los resultados del cribado de cáncer del NCI, y para entender adicionalmente la relación entre la proteína identificada en la presente invención y el desarrollo y la patogénesis del crecimiento celular neoplásico. Por ejemplo, los cultivos primarios derivados de tumores en animales transgénicos (tal como se describe posteriormente) pueden utilizarse en los ensayos basados en células de la presente invención, aunque resultan preferente las líneas celulares estables. Las técnicas para derivar líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Small *et al.*, Mol. Cell Biol. 5:642-648, 1985).

F. Modelos animales

- 15 Puede utilizarse una diversidad de modelos animales bien conocidos para entender adicionalmente el papel de las moléculas identificadas en la presente invención en el desarrollo y en la patogénesis de los tumores, y para someter a ensayo la eficacia de los agentes terapéuticos candidatos, incluyendo los anticuerpos, y otros agonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo los agonistas de molécula pequeña. La naturaleza *in vivo* de estos modelos los convierte en particularmente predictivos de las respuestas producidas en pacientes humanos. Entre los modelos animales de tumores y cánceres (por ejemplo cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, etc.) se incluyen los animales tanto no recombinantes como recombinantes (transgénicos). Entre los modelos animales no recombinantes se incluyen, por ejemplo, los modelos de roedor o murinos. Estos modelos pueden generarse mediante la introducción de células tumorales en ratones singénicos utilizando técnicas estándar, por ejemplo la inyección subcutánea, la inyección en la vena de la cola, la implantación en el bazo, la implantación intraperitoneal, 25 la implantación bajo la cápsula renal, o la implantación de ortopina, por ejemplo células de cáncer de colon implantadas en tejido colónico (ver, por ejemplo, la publicación PCT n° WO 97/33551, publicada el 18 de septiembre de 1997).

- Probablemente las especies animales utilizadas más frecuentemente en los estudios oncológicos son los ratones inmunodeficientes y, en particular, los ratones desnudos. La observación de que el ratón desnudo con hipo/aplasia puede actuar con éxito como huésped para los xenoinjertos de tumor humano ha conducido a su utilización generalizada con este propósito. El gen recesivo autosómico *nu* ha sido introducido en un número muy grande de cepas congénicas diferentes de ratón desnudo, incluyendo, por ejemplo, ASW, A/He, AKR, BALB/c, B10.LP, C17, C3H, C57BL, C57, CBA, DBA, DDD, I/st, NC, NFR, NFS, NFS/N, NZB, NZC, NZW, P, RIII y SJL. Además, se han criado y utilizado 30 como receptores de xenoinjertos tumorales una amplia diversidad de otros animales con defectos inmunológicos heredados diferentes del ratón desnudo. Para más detalles ver, por ejemplo, The Nude Mouse in Oncology Research, E. Boven y B. Winograd, editores, CRC Press, Inc., 1991.

- Las células introducidas en estos animales pueden derivarse de líneas celulares tumorales/cancerosas conocidas, tales como cualquiera de las líneas celulares tumorales indicadas anteriormente, y, por ejemplo, la línea celular B104-1-1 (línea celular NIH-3T3 estable transfectada con el protooncogén *neu*); células NIH-3T3 transfectadas con ras; Caco-2 (ATCC n° HTB-37); una línea celular de adenocarcinoma de colon humano de grado II moderadamente bien diferenciado, HT-29 (ATCC n° HTB-38) o de tumores y cánceres. Las muestras de células tumorales o cancerosas pueden obtenerse de pacientes sometidos a cirugía utilizando condiciones estándar que implican la congelación y el 45 almacenamiento en nitrógeno líquido (Karmali *et al.*, Br. J. Cancer 48:689-696, 1983).

- Las células tumorales pueden introducirse en animales, tales como los ratones desnudos, mediante una diversidad de procedimientos. El espacio subcutáneo (s.c.) en ratones resulta muy adecuado para la implantación de tumores. Los tumores pueden trasplantarse s.c. en forma de bloques sólidos, como biopsias con aguja mediante la utilización de una aguja de punción, o en forma de suspensiones celulares. Para la implantación de un bloque sólido o una 50 aguja de punción, se introducen fragmentos de tejido tumoral de tamaño adecuado en el espacio s.c. Las suspensiones celulares se preparan frescas a partir de tumores primarios o de líneas celulares tumorales estables, y se inyectan subcutáneamente. Las células tumorales también pueden implantarse como implantes subdérmicos. En esta localización, el inóculo se deposita entre la parte inferior del tejido conectivo dérmico y el tejido s.c. (Boven y Winograd, 1991, *supra*). Pueden generarse modelos animales de cáncer de mama, por ejemplo, mediante la implantación de células de neuroblastoma de rata (a partir de los que se aisló inicialmente el oncogén *neu*) o células NIH-3T3 transformadas con *neu* en ratones desnudos, esencialmente tal como describen Drebin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9129-9133, 1986.

- De manera similar, pueden generarse modelos animales de cáncer de colon subcultivando células de cáncer de colon en animales, por ejemplo ratones desnudos, conduciendo a la aparición de tumores en estos animales. Se ha descrito un modelo de trasplante ortotópico de cáncer de colon humano en ratones desnudos, por ejemplo en Wang *et al.*, Cancer Research 54:4726-4728, 1994, y en Too *et al.*, Cancer Research 55:681-684, 1995. Este modelo se basa en el denominado "METAMOUSE" comercializado por AntiCancer, Inc. (San Diego, California).

- 65 Los tumores que surgen en los animales pueden extirparse y cultivarse *in vitro*. Las células procedentes de cultivos *in vitro* seguidamente pueden subcultivarse en animales. Estos tumores pueden servir como dianas para el ensayo adicional o para el cribado de fármacos. Alternativamente, los tumores resultantes del subcultivo pueden aislarse y el

ARN de las células pre-subcultivo y las células aisladas tras una o más rondas o subcultivos, pueden analizarse para la expresión diferencial de genes de interés. Estas técnicas de subcultivo pueden llevarse a cabo con cualquier línea celular tumoral o cancerosa conocida.

Por ejemplo, Meth A, CMS4, CMS5, CMS21 y WEHI-164 son fibrosarcomas inducidos químicamente de ratones BALB/c hembra (DeLeo *et al.*, J. Exp. Med. 146:720, 1977) que proporcionan un sistema modelo altamente controlable para estudiar las actividades antitumorales de diversos agentes (Palladino *et al.*, J. Immunol. 138:4023-4032, 1987). En resumen, las células tumorales se propagan *in vitro* en cultivo celular. Previamente a la inyección en los animales, las líneas celulares se lavan y se suspenden en tampón, a una densidad celular de aproximadamente 10×10^6 a 10×10^7 células/ml. Los animales seguidamente se infectan subcutáneamente con 10 a 100 μ l de la suspensión celular, dejando una a tres semanas para que aparezca un tumor.

Además, el carcinoma pulmonar (3LL) de Lewis de ratón, que es uno de los tumores experimentales estudiado más a fondo, puede utilizarse como un modelo experimental de tumor. La eficacia en este modelo tumoral se ha correlacionado con efectos beneficiosos en el tratamiento de los pacientes humanos diagnosticados con carcinoma de células pequeñas del pulmón (SCCL). Este tumor puede introducirse en ratones normales tras la inyección de fragmentos de tumor de un ratón afectado o de células mantenidas en cultivo (Zupi *et al.*, Br. J. Cancer 41, suppl. 4:309, 1980) y la evidencia indica que los tumores pueden iniciarse a partir de la inyección de incluso una sola célula y que sobrevive una proporción muy elevada de células tumorales infectadas. Para más información sobre este modelo tumoral ver Zacharski, Haemostasis 16:300-320, 1986.

Además, el carcinoma pulmonar (3LL) de Lewis de ratón, que es uno de los tumores experimentales estudiado más a fondo, puede utilizarse como un modelo experimental de tumor. La eficacia en este modelo tumoral se ha correlacionado con efectos beneficiosos en el tratamiento de los pacientes humanos diagnosticados con carcinoma de células pequeñas del pulmón (SCCL). Este tumor puede introducirse en ratones normales tras la inyección de fragmentos de tumor de un ratón afectado o de células mantenidas en cultivo (Zupi *et al.*, Br. J. Cancer 41, suppl. 4:309, 1980) y la evidencia indica que los tumores pueden iniciarse a partir de la inyección de incluso una sola célula y que sobrevive una proporción muy elevada de células tumorales infectadas. Para más información sobre este modelo tumoral ver Zacharski, Haemostasis 16:300-320, 1986.

Los modelos animales recombinantes (transgénicos) pueden manipularse introduciendo la parte codificante de los genes identificados en la presente invención en el genoma de los animales de interés utilizando técnicas estándar para producir animales transgénicos. Entre los animales que pueden servir como diana para la manipulación transgénica se incluyen, sin limitarse a ellos, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo babuinos, chimpancés y monos. Entre las técnicas conocidas en la técnica para introducir un transgén en estos animales se incluyen la microinyección pronucleica (Hoppe y Wagner, patente US nº 4.873.191), la transferencia génica a líneas germinales medida por retrovirus (por ejemplo Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6148-615, 1985), el direccionamiento génico en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56:313-321, 1989); la electroporación de embriones (Lo, Mol. Cell Biol. 3:1803-1814, 1983); la transferencia génica mediada por espermia (Lavitrano *et al.*, Cell 57:717-73, 1989). Para una revisión ver, por ejemplo, la patente US nº 4.736.866.

Para el propósito de la presente invención, entre los animales transgénicos se incluyen aquellos que portan el transgén únicamente en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgén puede integrarse o en forma de transgén único, o en concatámeros, por ejemplo en tándems cabeza-a-cabeza o cabeza-a-cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo celular particular también resulta posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-636, 1992.

La expresión del transgén en animales transgénicos puede seguirse mediante técnicas estándar. Por ejemplo, puede utilizarse análisis de transferencia southern o amplificación por PCR para verificar que se ha producido la integración del transgén. A continuación, puede analizarse el nivel de expresión en ARNm utilizando técnicas tales como la hibridación *in situ*, el análisis de transferencia northern, PCR, o inmunocitoquímica. Los animales se examina adicionalmente para indicios de desarrollo de tumor o de cáncer.

La eficacia de los anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos identificados en la presente invención y otros fármacos candidatos, también puede someterse a ensayo en el tratamiento de tumores animales espontáneos. Una diana adecuada para estos estudios es el carcinoma oral felino de células escamosas (SCC). El SCC oral felino es un tumor maligno altamente invasivo que es el cáncer oral más frecuente de los gatos, explicando más del 60% de los tumores orales descritos para esta especie. En raras ocasiones se produce la metástasis a sitios distantes, aunque esta baja incidencia de la metástasis meramente podría ser un reflejo de los reducidos tiempos de supervivencia de los gatos que presentan este tumor. Estos tumores habitualmente no son accesibles a la cirugía, principalmente debido a la anatomía de la cavidad oral felina. En la actualidad no existe ningún tratamiento eficaz para este tumor. Previamente a la entrada en el estudio, cada gato se sometió a un examen clínico completo, a biopsia y recibe un escáner mediante tomografía computerizada (CT). Los gatos diagnosticados con tumores orales sublinguales de células escamosas se excluyeron del estudio. La lengua puede resultar paralizada como resultado de este tumor, e incluso si el tratamiento elimina el tumor, los animales pueden no ser capaces de alimentarse por sí mismos. Cada gato se trató repetidamente, a lo largo de un periodo más largo de tiempo. Se tomaron fotografías de los tumores diariamente durante el periodo de tratamiento, y en cada nueva comprobación posterior. Tras el tratamiento, cada gato se sometió a otro escaneo de CT. Posteriormente, los escaneos de CT y los radiogramas torácicos se evaluaron cada 8 semanas. Los datos se

evaluaron para diferencias de supervivencia, respuesta y toxicidad en comparación con los grupos de control. La respuesta positiva podría requerir evidencia de regresión tumoral, preferentemente con mejora de la calidad de vida y/o una esperanza de vida incrementada.

Además, también pueden someterse a ensayo otros tumores animales espontáneos, tales como fibrosarcoma, adenocarcinoma, linfoma, condroma, leiomiomasarcoma de perros, gatos y babuinos. De estos, el adenocarcinoma mamario en perros y en gatos es un modelo preferente debido a que la apariencia y el comportamiento son muy similares a aquellos en el ser humano. Sin embargo, la utilización de este modelo se ve limitada porque este tipo de humor se da raramente en los animales.

G. Ensayos de cribado para fármacos candidatos

Los ensayos de cribado para fármacos candidatos se diseñan para identificar compuestos que se unen competitivamente o se acoplejan con el receptor o receptores de los polipéptidos identificados en la presente invención, o que de otra manera señalizan a través de este receptor o receptores. Entre estos ensayos de cribado se incluyen los ensayos que pueden someterse a cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciendo que resulten particularmente adecuados para identificar fármacos candidatos de molécula pequeña. Entre las moléculas pequeñas contempladas se incluyen los compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, incluyendo péptidos, preferentemente péptidos solubles, fusiones de (poli)péptido-inmunoglobulina y, en particular, anticuerpos, incluyen, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones químicas y humanizadas de estos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanos. Los ensayos pueden llevarse a cabo en una diversidad de formatos, incluyendo ensayo de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que se encuentran bien caracterizados en la técnica.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, un receptor de un polipéptido codificada por el gen identificado en la presente invención o el fármaco candidato puede inmovilizarse en una fase sólida, por ejemplo en una placa de microtitulación, mediante enlaces covalentes o no covalentes. El enlace no covalente se consigue generalmente recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido y el secado. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido que debe inmovilizarse, para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se lleva a cabo mediante la adición del componente no inmovilizado, que puede marcarse con un marcaje detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se ha completado la reacción, se extraen los componentes no reaccionados, por ejemplo mediante lavado, y los complejos anclados en la superficie sólida se detectan. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta un marcaje detectable, la detección de marcaje inmovilizado sobre la superficie indica que se ha producido un acoplejamiento. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porta un marcaje, puede detectarse el acoplejamiento, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interacciona con un receptor particular aunque sin unirse a él, su interacción con este polipéptido puede someterse a ensayo mediante procedimientos bien conocidos para la detección de interacciones proteína-proteína. Entre estos ensayos se incluyen los enfoques tradicionales, tales como la reticulación, la coimmunoprecipitación y la copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden seguirse utilizando el sistema genético basado en una levadura descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London) 340:245-246, 1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9578-9582, 1991), tal como dan a conocer Chevray y Nathans (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5789-5793, 1991). Muchos activadores transcripcionales tales como GAL4 de levadura, consisten de dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura descrito en las publicaciones anteriores (generalmente denominado "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad, y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se encuentra fusionada con el dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas se encuentran fusionadas con el dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 mediante la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos interaccionantes se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos se encuentra disponible comercialmente de Clontech. Este sistema también puede extenderse al mapaje de dominios de proteína implicados en interacciones específicas de proteínas, así como para identificar residuos aminoácidos que resultan cruciales para estas interacciones.

H. Composiciones farmacéuticas

Los polipéptidos de la presente invención, los anticuerpos agonistas que se unen específicamente a las proteínas identificadas en la presente invención, así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de cribado dados a conocer en la presente invención, pueden administrarse para el tratamiento de tumores, incluyendo cánceres, en la forma de composiciones farmacéuticas.

En el caso de que se utilizan fragmentos de anticuerpo, el fragmento inhibidor mínimo que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana resulta preferente. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas péptido que conservan la capacidad de unirse a la secuencia proteica diana. Estos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:7889-7893, 1993).

La formulación en la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según resulte necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que intensifique su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citoquina, un agente quimioterapéutico, o un agente inhibidor del crecimiento. Estas moléculas se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito pretendido.

Las formulaciones terapéuticas de los polipéptidos identificados en la presente invención, o los agonistas de los mismos, se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del ingrediente activo con el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980) en la forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables resultan no tóxicos para los recipientes a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como el cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabens, tales como metil o propilparabén, catecol, resorcinol, ciclohexano, 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según resulte necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afecten negativamente entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquina o agente inhibidor del crecimiento. Estas moléculas se encuentran convenientemente presentes en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden encapsularse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidal (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980.

Las formulaciones a utilizar en la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, previamente o posteriormente a la liofilización y reconstitución.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención generalmente se introducen en un recipiente con una abertura de acceso estéril, por ejemplo una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón agujereable con una aguja de inyección hipodérmica.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, las cuales presentan la forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato) o alcohol polivinílico, poliláctidos (patente US nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolído) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y en posibles cambios de inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de enlaces S-S- intermoleculares a través de intercambio tiodisulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

I. Procedimientos de tratamiento

Se contempla que los polipéptidos de la presente invención y sus agonistas, incluyendo anticuerpos, péptidos y agonistas de molécula pequeña, puedan utilizarse para tratar diversos tumores, por ejemplo cánceres. Entre las condiciones o trastornos ejemplares que deben tratarse se incluyen los tumores benignos o malignos (por ejemplo renal, de hígado, de riñón, de vejiga, de mama, gástrico, ovárico, colorrectal, de próstata, pancreático, de pulmón, vulvar, del tiroides, carcinomas hepáticos; sarcomas; glioblastomas; y diversos tumores de cabeza y cuello); leucemias y cánceres linfoides; otros trastornos, tales como trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros trastornos glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, angiogénicos e inmunológicos. Los agentes antitumorales de la presente invención, incluyendo los polipéptidos dados a conocer en la presente invención y los agonistas que mimetizan su actividad, por ejemplo anticuerpos, péptidos y moléculas orgánicas pequeñas), se administran a un mamífero, preferentemente a un ser humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa en forma de bolo o mediante infusión continua a lo largo de un periodo de tiempo, o por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, intraocular, intraarterial, intralesional, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación.

Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración de los agentes anticáncer de la invención. Por ejemplo, el paciente que debe tratarse con estos agentes anticáncer también puede recibir terapia de radiación. Alternativamente, o adicionalmente, puede administrarse un agente quimioterapéutico al paciente. La preparación y programas de dosificación para estos agentes quimioterapéuticos puede llevarse a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante o según se determine empíricamente por el experto en la materia. La preparación y programas de dosificación para esta quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service*, editores: M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992. El agente quimioterapéutico puede ser anterior o posterior a la administración del agente antitumoral de la presente invención, o puede administrarse simultáneamente con el mismo. Los agentes anticáncer de la presente invención pueden combinarse con un compuesto antiestrógeno, tal como tamoxifeno o una antiprogesterona, tal como onapristona (ver la patente EP n° 616.812) en dosis conocidas para estas moléculas.

Puede resultar deseable administrar también anticuerpos contra antígenos asociados a tumores, tales como anticuerpos que se unen a ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o al factor vascular endotelial (VEGF). Alternativamente, o adicionalmente, pueden coadministrarse al paciente dos o más anticuerpos que se unen a dos o más antígenos diferentes o iguales asociados a cáncer. En ocasiones, puede resultar beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización preferente, los agentes anticáncer de la presente invención se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse en primer lugar, seguido de la administración de un agente anticáncer de la presente invención. Sin embargo, la administración simultánea o la administración de primero el agente anticáncer de la presente invención también se encuentra contemplada. Las dosis adecuadas de agente inhibidor del crecimiento son aquéllas utilizadas en la actualidad y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el anticuerpo de la presente invención.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un agente antitumoral de la presente invención dependerá del tipo de enfermedad que debe tratarse, tal como se ha indicado anteriormente, de la severidad y curso de la enfermedad, de si el agente se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, el historial clínico del paciente y de su respuesta al agente, y del criterio del médico responsable. El agente se administra convenientemente al paciente en una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Los experimentos animales proporcionan directrices fiables para la determinación de las dosis eficaces para la terapia en el ser humano. El escalado entre especies de las dosis eficaces puede llevarse a cabo siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W., "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", en: *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, editores, Pergamon Press, New York, 1989, páginas 42-96.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y severidad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 a 20 mg/kg) de un agente antitumoral es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria típica se encuentra comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores anteriormente indicados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se sostiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. El progreso de esta terapia se sigue con facilidad mediante técnicas y ensayos convencionales. En la literatura se proporcionan directrices sobre las dosis y procedimientos de administración particulares; ver, por ejemplo, las patentes US n° 4.657.760, n° 5.206.344 o n° 5.225.212. Se prevé que diferentes formulaciones resulten eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y para diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede requerir la administración de una manera diferente que para otro órgano o tejido.

J. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales que resultan útiles para el diagnóstico o para el tratamiento de los trastornos indicados anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y probetas. Los recipientes pueden formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta eficaz para diagnosticar o para tratar la condición y puede

presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón agujereable con una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es un agente antitumoral de la presente invención. La etiqueta sobre el recipiente o asociada al mismo indica que la composición se utiliza para diagnosticar o para tratar la condición de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y folletos en el paquete con instrucciones de utilización.

Los ejemplos siguientes se ofrecen únicamente a título ilustrativo, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

Ejemplos

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de las células identificadas en los ejemplos siguientes y a lo largo de toda la especificación con los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Ejemplo 1

Aislamiento de clones de ADNc codificantes de PRO172

PRO172

Las secuencias de dominio extracelular (ECD) (incluyendo la secuencia de señal de secreción, si existe alguna) de entre aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos pública swiss-Prot se utilizaron para la búsqueda de las bases de datos EST. Las bases de datos EST incluían bases de datos EST públicas (por ejemplo GenBank) y una base de datos EST propietaria (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se llevó a cabo utilizando el programa informático BLAST o BLAST2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology 266:460-480, 1996) para comparar las secuencias de proteínas de ECD con una traducción de 6 marcos de las secuencias EST. Aquellas comparaciones que resultaron en una puntuación BLAST de 70 (o, en algunos casos, de 90) o superior que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y se ensamblaron formando secuencias de ADN de consenso con el programa “phrap” (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Se ensambló una secuencia de ADN de consenso respecto a otras secuencias EST utilizando phrap, tal como se ha indicado anteriormente. La secuencia de consenso en la presente memoria se denomina DNA28765. En algunos casos, la secuencia de consenso derivada de una secuencia intermediaria de ADN de consenso que se extendió utilizando ciclos repetidos de BLAST y phrap para extender dicha secuencia de consenso intermediaria lo máximo posible utilizando las fuentes de secuencias EST comentadas anteriormente.

Basándose en la secuencia de consenso DNA28765 se sintetizaron oligonucleótidos con el fin de: 1) identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para la utilización como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa de PRO172. Los cebadores de PCR directos y reversos generalmente presentan una longitud comprendida entre 20 y 30 nucleótidos y con frecuencia se diseñan para proporcionar un producto PCR de aproximadamente 100 a 1.000 pb de longitud. Las secuencias de sonda presentan una longitud típica de 40 a 55 pb. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia de consenso es mayor de aproximadamente 1 a 1,5 kpb. Con el fin de cribar las bibliotecas para un clon de longitud completa, se cribó ADN procedente de bibliotecas mediante amplificación por PCR, tal como en Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, con el par de cebadores de PCR. A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar clones codificantes del gen de interés utilizando el oligonucleótido sonda y uno de los pares de cebadores.

Se sintetizaron cebadores de PCR (directos e inversos):

cebador PCR directo:

5'-GGATCTCGAGAACAGCTACTCC-3' (SEC ID nº 3)

cebador PCR inverso:

5'-TCGTCCACGTTGTCGTCACATG-3' (SEC ID nº 4)

Además, se construyó un oligonucleótido sonda de hibridación sintético a partir de la secuencia de consenso DNA28765 que presentaba la secuencia de nucleótidos siguiente:

sonda de hibridación:

5' -AAATCTGTGAATTGAGTGCCATGGACCTGTTGCGGACGGCCCTTGCTT-3' (SEC ID n° 5).

Se aisló ARN pAra la construcción de las bibliotecas de ADNc a partir de tejido de riñón fetal humano. Las bibliotecas de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc se construyeron mediante procedimientos estándar utilizando reactivos disponibles comercialmente, tales como aquellos de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligodT que contenía un sitio NotI, ligado con adaptadores romos a hemiquinasados con SalI, se cortó con NotI, se estimó su tamaño apropiadamente mediante electroforesis en gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SfiI; ver Holmes *et al.*, Science 253:1278-1280, 1991) en los sitios únicos XhoI y NotI.

La secuenciación de ADN de los clones aislados tal como se ha descrito anteriormente proporcionó la secuencia de ADN de longitud completa para un polipéptido PRO172 de longitud completa (denominado en la presente invención DNA35916-1161, figuras 1A-B, SEC ID n° 1) y la secuencia de proteína derivada para dicho polipéptido PRO172.

El clon de longitud completa identificado anteriormente contenía un único marco de lectura abierto con un sitio de inicio traduccional aparente en las posiciones nucleótidas 38 a 40 y una señal de parada en las posiciones nucleótidas 2.207 a 2.209 (figuras 1A-B, SEC ID n° 1). El polipéptido precursor teórico presenta una longitud de 723 aminoácidos. El análisis de la secuencia de PRO172 de longitud completa mostrada en la figura 2 (SEC ID n° 2) evidencia la presencia de una diversidad de dominios importantes del polipéptido, en los que las localizaciones proporcionadas para aquellos dominios de polipéptido importantes son aproximadas, tal como se ha indicado anteriormente. El análisis de la secuencia de PRO172 de longitud completa evidencia lo siguiente: un péptido de señal entre aproximadamente el aminoácido 1 y aproximadamente el aminoácido 21; un dominio transmembranal entre aproximadamente el aminoácido 548 y aproximadamente el aminoácido 568; un sitio de N-glucosilación entre aproximadamente el aminoácido 477 y aproximadamente el aminoácido 481; un sitio de fosforilación de proteína quinasa AMPc-dependiente y GMPc-dependiente entre aproximadamente el aminoácido 660 y aproximadamente el aminoácido 664; sitios de fosforilación de la caseína quinasa II entre aproximadamente el aminoácido 93 y aproximadamente el aminoácido 97, entre aproximadamente el aminoácido 131 y aproximadamente el aminoácido 135, entre aproximadamente el aminoácido 342 y aproximadamente el aminoácido 346, entre aproximadamente el aminoácido 344 y aproximadamente el aminoácido 348, entre aproximadamente el aminoácido 369 y aproximadamente el aminoácido 373, entre aproximadamente el aminoácido 457 y aproximadamente el aminoácido 461, entre aproximadamente el aminoácido 483 y aproximadamente el aminoácido 487, entre aproximadamente el aminoácido 495 y aproximadamente el aminoácido 499, entre aproximadamente el aminoácido 659 y aproximadamente el aminoácido 663, entre aproximadamente el aminoácido 670 y aproximadamente el aminoácido 674, entre aproximadamente el aminoácido 671 y aproximadamente el aminoácido 675, entre aproximadamente el aminoácido 698 y aproximadamente el aminoácido 702, sitios de fosforilación de tirosina quinasa entre aproximadamente el aminoácido 176 y aproximadamente el aminoácido 185 y entre aproximadamente el aminoácido 252 y aproximadamente el aminoácido 261; sitios de N-miristoilación entre aproximadamente el aminoácido 2 y aproximadamente el aminoácido 8, entre aproximadamente el aminoácido 37 y aproximadamente el aminoácido 43, entre aproximadamente el aminoácido 40 y aproximadamente el aminoácido 46, entre aproximadamente el aminoácido 98 y aproximadamente el aminoácido 104, entre aproximadamente el aminoácido 99 y aproximadamente el aminoácido 105, entre aproximadamente el aminoácido 262 y aproximadamente el aminoácido 268, entre aproximadamente el aminoácido 281 y aproximadamente el aminoácido 287, entre aproximadamente el aminoácido 282 y aproximadamente el aminoácido 288, entre aproximadamente el aminoácido 301 y aproximadamente el aminoácido 307, entre aproximadamente el aminoácido 310 y aproximadamente el aminoácido 316, entre aproximadamente el aminoácido 328 y aproximadamente el aminoácido 334, entre aproximadamente el aminoácido 387 y aproximadamente el aminoácido 393, entre aproximadamente el aminoácido 512 y aproximadamente el aminoácido 518, entre aproximadamente el aminoácido 676 y aproximadamente el aminoácido 682, entre aproximadamente el aminoácido 683 y aproximadamente el aminoácido 689, entre aproximadamente el aminoácido 695 y aproximadamente el aminoácido 701; sitios de hidroxilación de ácido aspártico y de asparagina entre aproximadamente el aminoácido 343 y aproximadamente el aminoácido 355, entre aproximadamente el aminoácido 420 y aproximadamente el aminoácido 432, y entre aproximadamente el aminoácido 458 y aproximadamente el aminoácido 480; un sitio de unión de lípido de lipoproteína membranal de procariota entre aproximadamente el aminoácido 552 y aproximadamente el aminoácido 563; firmas de patrón de cisteínas de dominio similar a EGF entre aproximadamente el aminoácido 243 y aproximadamente el aminoácido 255, entre aproximadamente el aminoácido 274 y aproximadamente el aminoácido 286, entre aproximadamente el aminoácido 314 y aproximadamente el aminoácido 326, entre aproximadamente el aminoácido 352 y aproximadamente el aminoácido 364, entre aproximadamente el aminoácido 391 y aproximadamente el aminoácido 403, entre aproximadamente el aminoácido 429 y aproximadamente el aminoácido 441, entre aproximadamente el aminoácido 467 y aproximadamente el aminoácido 479, y entre aproximadamente el aminoácido 505 y aproximadamente el aminoácido 517.

El clon DNA35916-1161 ha sido depositado en la ATCC el 28 de octubre de 1997 y se le ha asignado el número de depósito ATCC 209419.

Un análisis del a base de datos Dayhoff (versión 35.45, SwissProt 35) utilizando el análisis de alineación BLAST y FastAsequence de la secuencia de longitud completa mostrada en la figura 2 (SEC ID nº 2) evidenció una identidad de secuencia del 89% entre la secuencia de aminoácidos de PRO172 y la proteína de ratón delta-1.

5 Ejemplo 2

Expresión de PRO172 en E. coli

10 El presente ejemplo ilustra la preparación de una forma no glucosilada de PRO172 mediante expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN codificante de PRO172 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Puede utilizarse una diversidad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; ver Bolivar *et al.*, Gene 2:95, 1977) que contiene genes para resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. A continuación, la secuencia amplificada por PCR se liga en el vector. El vector preferentemente incluye secuencias que codifican para un gen de resistencia a antibiótico, un promotor trp, un líder poli-His (incluyendo los primeros seis codones STII, una secuencia poli-His, un sitio de corte de enteroquinasa), la región codificante de PRO172, terminador transcripcional lambda y un gen argU.

A continuación, la mezcla de ligación se utiliza para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada utilizando los procedimientos descritos en Sambrook *et al.*, *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad de crecer en placas LB y seguidamente se seleccionan las colonias resistentes a antibiótico. El ADN de plásmido puede aislarse y confirmarse mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Los clones seleccionados pueden cultivarse durante la noche en medio de cultivo líquido, tal como caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de la noche posteriormente puede utilizarse para inocular un cultivo a mayor escala. Después, las células se cultivan hasta una densidad óptica deseada, momento en el que se activa el promotor de expresión.

Tras cultivar las células durante varias horas más, las células pueden recolectarse mediante centrifugación. El pellet celular obtenido mediante centrifugación puede solubilizarse utilizando diversos agentes conocidos de la técnica, y la proteína PRO172 solubilizada seguidamente puede purificarse utilizando una columna quelante de metales bajo condiciones que permitan la unión fuerte de la proteína.

PRO172 puede expresarse en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His utilizando el procedimiento siguiente. El ADN codificante de PRO172 inicialmente se amplifica utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contienen sitios de enzimas de restricción que corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que permiten un inicio de traducción eficiente y fiable, una purificación rápida en una columna de quelación de metales, y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias amplificadas por PCR etiquetadas con poli-His seguidamente se ligan en un vector de expresión, que se utiliza para transformar un huésped *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) Ion galE rpoHts(thpRts) cLpP(lacIq). Los transformantes en primer lugar se cultivan en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 3 a 5. Los cultivos seguidamente se diluyen 50 a 100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico·2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de hicasa SF de Sheffield en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20 a 30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se extraen para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y el cultivo total se centrifuga para formar un pellet con las células. Los pellets celulares se congelan hasta su purificación y replegamiento.

Se resuspende pasta de *E. coli* procedente de 0,5 a 1 litro de fermentaciones (pellets de 6 a 10 g) en 10 volúmenes (p/v) de tampón guanidina 7 M, Tris 20 mM; pH 8. Se añaden sulfito sódico sólido y tetrionato sódico para preparar concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante la noche a 4°C. Esta etapa resulta en una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados mediante sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 minutos. El sobrenadante se diluye con 3 a 5 volúmenes de tampón de columna de quelato metálico (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificarlo. El extracto clarificado se carga en una columna de quelato metálico Ni²⁺-NTA de Qiagen de 5 ml equilibrada con el tampón de la columna de quelato metálico. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y se almacenan a 4°C. La concentración de proteína se estima a partir de su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.

65 Las proteínas se replegan mediante dilución de la muestra lentamente en tampón de replegamiento recién preparado consistente en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegamiento se seleccionan de manera que la concentración final de proteínas se encuentre comprendida entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegamiento se agita suavemente a 4°C durante 12 a 36 horas.

La reacción de replegamiento se refresca mediante la adición de TFA hasta una concentración final del 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo hasta una concentración final de entre 2% y 10%. La proteína replegada se cromatografía en una columna de fase reversa Pros RI/H utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución a través de un gradiente de acetonitrilo de 10% a 80%. Se analizan alícuotas de las fracciones de absorbancia A_{280} en geles de poliacrilamida-SDS y las fracciones que contienen proteína replegada homogénea se agrupan. Generalmente, las especies replegadas correctamente de la mayoría de proteínas eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, debido a que estas especies son las más compactas al estar sus interiores hidrofóbicos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas habitualmente se eluyen a concentraciones de acetonitrilo más elevadas. Además de resolver las formas mal plegadas de proteína de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

Las fracciones que contienen el polipéptido PRO172 plegado deseado se agrupan y el acetonitrilo se elimina utilizando un flujo suave de nitrógeno dirigido a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas hasta la esterilidad.

Ejemplo 3

Expresión de PRO172 en células de mamífero

El presente ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada de PRO172 mediante expresión recombinante en células de mamífero.

El vector, pRK5 (ver la patente EP n° 307-247, publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como el vector de expresión. Opcionalmente, se liga el ADN de PRO172 en pRK5 con enzimas de restricción seleccionados para permitir la inserción del ADN de PRO172 utilizando procedimientos de ligación tal como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-PRO172.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC n° CCL 1573) se cultivan hasta la confluencia en placas de cultivo de tejido en medio tal como DMEM suplementado con suero de feto bovino y opcionalmente componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 μ g de ADN pRK5-PRO172 con aproximadamente 1 μ g de ADN codificante del gen ARN VA [Thimmappaya *et al.*, Cell 31:543, 1982] y se disuelven en 500 μ l de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl_2 0,227 M. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 μ l de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO_4 1,5 mM y se deja que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja que sedimente durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se separa por aspiración y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS a lo largo de 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio libre de suero, se añade medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas tras las transfecciones, el medio de cultivo se elimina y se sustituye por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 μ Ci/ml de ^{35}S -cisteína y 200 μ Ci/ml de ^{35}S -metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro giratorio y se carga en un gel de SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del polipéptido PRO172. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse a incubación adicional (en medio libre de suero) y el medio se somete a ensayo en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, puede introducirse PRO172 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del dextrán sulfato descrito por Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. 12:7575, 1981. Se cultivan células 293 hasta la densidad máxima en un matraz rotatorio y se añaden 700 μ g de ADN pRK5-PRO172. En primer lugar las células procedentes del matraz rotatorio se concentran mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrán se incuba en el pellet celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el matraz rotatorio que contiene medio de cultivo de tejido, 5 μ g/ml de insulina bovina y 0,1 μ g/ml de transferrina bovina. Tras aproximadamente cuatro días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y residuos. A continuación, la muestra que contiene PRO172 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía de columna.

En otra realización, PRO172 puede expresarse en células CHO. El pRK5-PRO172 puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO_4 o DEAE-dextrano. Tal como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio sustituirse por medio de cultivo (solo o medio que contiene un marcaje radioactivo, tal como ^{35}S -metionina. Tras determinar la presencia de un polipéptido PRO172, el medio de cultivo puede sustituirse por medio libre de suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y después se recolecta el medio condicionado. El medio que contiene el polipéptido PRO172 expresado seguidamente puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

También puede expresarse PRO172 etiquetado con epítipo en células CHO huésped. PRO172 puede subclonarse para extraerlo del vector pRK5. La inserción subclonada puede someterse a PCR para fusionarlo en el mismo marco

de lectura de una etiqueta epítipo seleccionada, tal como una etiqueta poli-His en un vector de expresión baculovirus. La inserción de PRO172 etiquetada con poli-His seguidamente puede subclonarse en un vector controlado por SV40 que contenga un marcador de selección, tal como DHFR, para la selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal como se ha descrito anteriormente) con el vector controlado por SV40. Puede llevarse a cabo el marcaje, tal como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO172 etiquetado con poli-His que se ha expresado seguidamente puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad por Ni^{2+} -quelato.

PRO172 también puede expresarse en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante cualquier procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se lleva a cabo utilizando el procedimiento siguiente. Las proteínas se expresan en forma de constructo de IgG (inmunoadhesina) en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan con una secuencia de región constante de IgG I que contiene la bisagra, dominios CH2 y CH2, y/o como forma etiquetada con poli-His.

Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un vector de expresión CHO utilizando técnicas estándar tal como se describe en Ausubel *et al.*, Current Protocols of Molecular Biology, unidad 3.16, John Wiley and Sons, 1997. Los vectores de expresión CHO se construyen para que presenten sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir el transporte conveniente de los ADNc. El vector utilizado en la expresión en células CHO es tal como se describe en Lucas *et al.*, Nucl. Acids Res. 24:9(1774-1779), 1996, y utiliza el promotor temprano/intensificador para regular la expresión del ADNc de interés y de la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

Se introdujeron doce microgramos del ADN de plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células HO utilizando los reactivos de transfección disponibles comercialmente Superfect® (Qiagen), Dosper® o Eugene® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan tal como se describe en Lucas *et al.*, *supra*. Se congelaron aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para su cultivo y producción posteriores tal como se describe posteriormente.

Las ampollas que contenían el ADN de plásmido se descongelaron introduciéndolas en un baño de agua y se mezclaron en un vórtex. El contenido se introdujo con una pipeta en un tubo de centrifugación que contenía 10 ml de medio y se centrifugó a 1.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a través de $0,2 \mu\text{m}$ con suero de feto bovino al 5% diafiltrado por $0,2 \mu\text{m}$). A continuación, se prepararon alícuotas de las células en un tubo de centrifuga de 100 ml que contenía 90 ml de medio selectivo. Tras 1 a 2 días, las células se transfirieron a un tubo de centrifuga de 250 ml lleno con 150 ml de medio de cultivo selectivo y se incubaron a 37°C. Tras 2 a 3 días adicionales, se sembraron tubos de centrifuga de 250 ml, de 500 ml y de 2.000 ml con 3×10^5 células/ml. El medio celular se intercambió por medio fresco mediante centrifugación y se resuspendió en medio de producción. Aunque pueden utilizarse medios CHO adecuados, de hecho puede utilizarse un medio de producción descrito en la patente US n° 5.122.469, publicada el 16 de junio de 1992. Se sembró un tubo de centrifuga de producción de 3 litros con $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determinó el número de células y el pH. El día 1, se muestreo el tubo de centrifuga y se inició el burbujeó con aire filtrado. El día 2, se muestreo el tubo de centrifuga, se modificó la temperatura a 33°C, y se extrajeron 30 ml de 500 g/l de glucosa y 0,6 ml de antiespumante al 10% (por ejemplo emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, emulsión de grado médico Dow Corning 365). Durante la producción, se ajustó el pH según resultase necesario para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Tras 10 días, o hasta que la viabilidad cayese por debajo del 70%, se recolectó el cultivo celular mediante centrifugación y filtración a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. El filtrado se almacenó a 4°C o se cargó inmediatamente en columnas para la purificación.

Para los constructos etiquetados con poli-His, las proteínas se purificaron utilizando una columna de Ni^{2+} -NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombeó por una columna de Ni^{2+} -NTA de 6 ml equilibrada en tampón Hepes 20 mM, pH 7,5, que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4 a 5 ml/min a 4°C. Tras la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluyó con tampón de equilibración que contenía imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada posteriormente se desaló en tampón de almacenamiento que contenía Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacenó a -80°C.

Se purificaron constructos de inmunoadhesina (que contenía Fc) a partir del medio acondicionado de la manera siguiente. El medio acondicionado se bombeó por una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que había sido equilibrada en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Tras la carga, la columna se lavó extensivamente con tampón de equilibración antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contenían 275 μl de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada posteriormente se desaló en tampón de almacenamiento tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad se evaluó en geles de SDS-poliacrilamida y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminales por degradación de Edman.

PRO172 se expresó establemente en células CHO mediante el procedimiento anteriormente indicado. Además, se expresó PRO172 en células CHO mediante el procedimiento de expresión transitoria.

Ejemplo 4

Expresión de PRO172 en levaduras

- 5 El procedimiento siguiente describe la expresión de PRO172 en levaduras.

En primer lugar, se construyeron vectores de expresión levadura para la producción intracelular o la secreción de PRO172 a partir del promotor ADH2/GAPDH. Se insertó ADN codificante de PRO172 y el promotor en sitios adecuados de enzima de restricción en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO172. Para la secreción, puede clonarse ADN codificante de PRO172 en el plásmido seleccionado, junto con ADN codificante del

10 promotor ADH2/GAPDH, un péptido de señal PRO172 nativo u otro péptido de señal de mamífero, o por ejemplo, un factor alfa de levadura o señal secretoria de invertasa/secuencia líder, y secuencias líker (si resultan necesarias) para la expresión de PRO172.

15 Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de levadura, seguidamente pueden transformarse con los plásmidos de expresión indicados anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformada pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE seguido de tinción de los genes con tinción de azul de Coomassie.

20 Posteriormente puede aislarse PRO172 recombinante, y purificarse eliminando las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y después concentrando el medio utilizando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene PRO172 puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía de columna seleccionadas.

Ejemplo 5

Expresión de PRO172 en células de insecto infectadas por baculovirus

- El procedimiento siguiente describe la expresión recombinante en células de insecto infectadas por baculovirus.

30 La secuencia codificante de PRO172 se fusiona cadena arriba de una etiqueta epítipo contenida dentro de un vector de expresión baculovirus. Entre estas etiquetas epítipo se incluyen etiquetas poli-His y etiquetas inmunoglobulina (por ejemplo regiones Fc de IgG). Puede utilizarse una diversidad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia codificante de PRO172 o la parte deseada de la secuencia codificante de PRO172 (tal como la secuencia codificante del dominio extracelular de una proteína transmembranal o la secuencia codificante de la proteína madura si la proteína es extra-

35 celular) se amplifica por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzima de restricción (seleccionados) flanqueantes. A continuación, el producto se digiere con esos enzimas de restricción seleccionados y se subclona en el vector de expresión.

40 Se genera un baculovirus recombinante mediante la cotransfección del plásmido anteriormente indicado y el ADN vírico BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC nº CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Tras 4 a 5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recolectan y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección vírica y la expresión de proteínas se lleva a cabo tal como describen O'Reilly *et al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press, 1994.

A continuación, puede purificarse PRO172 etiqueta con poli-His que se ha expresado, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad por Ni²⁺-quelato, de la manera siguiente. Se preparan extractos a partir de células Sf9 infectadas por virus recombinante, tal como se describe en Rupert *et al.*, Nature 362:175-179, 1993. Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 0,1%, KCl 0,4 M) y se sonicán dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se clarifican mediante centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 mm. Se prepara una columna de

55 Ni²⁺-NTA agarosa (disponible comercialmente de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a un caudal de 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la A₂₈₀ de línea base con tampón de carga, punto en el que se inicia la recolección de fracciones. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye no específicamente proteína unida. Tras alcanzar la línea base A₂₈₀ nuevamente, la columna se revela con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia western con Ni²⁺-NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen PRO172 etiquetado con His10 eluidas se agrupan y se dializan frente a tampón de carga.

65 Alternativamente, puede llevarse a cabo la purificación de PRO172 etiquetado con IgG (o etiquetado con Fc) utilizando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo por ejemplo, cromatografía de columna con proteína A o con proteína G.

Tras la amplificación por PCR, las secuencias codificantes respectivas se subclonan en un vector de expresión baculovirus (pb.PH.IgG para las fusiones de IgG, y pb.PH.His.c para las proteínas etiquetadas con poli-His), y el vector y el ADN vírico Baculogold® (Pharmingen) se cotransfectan en 10^5 células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC nº CRL 1711) utilizando lipofectina (Gibco BRL). pb.PH.IgG y pb.PH.His son modificaciones del vector de expresión baculovirus disponible comercialmente pVL1393 (Pharmingen), con regiones polilinker modificadas para que incluyan las secuencias de etiqueta His o Fc. Las células se cultivan en medio TNM-FH de Hink suplementado con FBS al 10% (Hyclone). Las células se incuban durante 5 días a 28°C. Se recoge el sobrenadante y posteriormente se utiliza para la primera amplificación vírica mediante la infección de células Sf9 en medio TNM-FH de Hink suplementado con FBS al 10% a una multiplicidad de infección (MOI) aproximada de 10. Las células se incuban durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recoge y la expresión de los constructos en el vector de expresión baculovirus se determina mediante unión por lotes de 1 ml de sobrenadante a 25 ml de perlas de Ni^{2+} -NTA (Qiagen) para las proteínas etiquetadas con histidina o perlas de proteína A-sefariosa CL-4B (Pharmacia) para las proteínas etiquetadas con IgG, seguido de análisis de SDS-PAGE comparando con una concentración conocida de estándar de proteína mediante tinción de azul de Coomassie.

El sobrenadante de la primera amplificación vírica se utilizó para infectar un cultivo celular en tubo de centrifuga (500 ml) de células Sf9 cultivadas en medio ESF-921 (Expression Systems LLC) a una MOI aproximada de 0,1. Las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y se filtró. Se repitió la unión por lotes y el análisis de SDS-PAGE, según resultase necesario, hasta confirmar la expresión del cultivo en tubo de centrifuga.

El medio acondicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 litros) se recolectó mediante centrifugación para separar las células y se filtró a través de filtros de 0,22 micrómetros. Para los constructos etiquetados con poli-His, el constructo de proteína se purificó utilizando una columna de Ni^{2+} -NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombeó por una columna de Ni^{2+} -NTA de 6 ml equilibrada en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4 a 5 ml/min a 4°C. Tras la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluyó con tampón de equilibración que contenía imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada posteriormente se desaló en un tampón de almacenamiento que contenía Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacenó a -80°C.

Se purificaron constructos de inmunoadhesina (que contenía Fc) del medio acondicionado de la manera siguiente. El medio acondicionado se bombeó por una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que había sido equilibrada en tampón de fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Tras la carga, la columna se lavó extensivamente con tampón de equilibración antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contenían 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada posteriormente se desaló en tampón de almacenamiento, tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad de las proteínas se verificó mediante electroforesis en gel de SDS-polacrilamida (PEG) y secuenciación de aminoácidos N-terminales por la degradación de Edman.

PRO172 se expresó en células de insecto Sf9 infectadas por baculovirus.

Alternativamente, puede utilizarse un procedimiento con baculovirus modificado incorporando células "High 5". En este procedimiento, el ADN codificante de la secuencia deseada se amplifica con sistemas adecuados, tales como Pfu (Stratagene) o se fusiona más arriba (5'-of) de una etiqueta epítipo contenida en un vector de expresión baculovirus. Entre estas etiquetas epítipo se incluyen etiquetas poli-His y etiquetas inmunoglobulina (tales como regiones Fc de IgG). Puede utilizarse una diversidad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos disponibles comercialmente, tales como pIE 1-1 (Novagen). Los vectores pIE11 y pIE1-2 están diseñados para la expresión constitutiva de proteínas recombinantes desde el promotor ie1 de baculovirus en células de insecto transformadas establemente (1). Los plásmidos difieren únicamente en la orientación de los múltiples sitios de clonación y contienen todas las secuencias de promotor que es conocido que resultan importantes para la expresión génica mediada por ie1 en células de insecto no infectadas, así como el elemento intensificador hr5. pIE1-1 y pIE1-2 incluyen el sitio de inicio de traducción y pueden utilizarse para producir proteínas de fusión. Brevemente, la secuencia deseada de la parte deseada de la secuencia (tal como la secuencia codificante del dominio extracelular de una proteína transmembranal) se amplifica por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzima de restricción (seleccionados) flanqueantes. A continuación, el producto se digiere con esos enzimas de restricción seleccionados y se subclona en el vector de expresión. Por ejemplo, los derivados de pIE1-1 pueden incluir la región Fc de IgG humana (pb.PH.IgG) o una etiqueta de 8 histidinas (pb.PH.His) más abajo (3'-Of) de la secuencia deseada. Preferentemente, el constructo vector se secuenciará para la confirmación.

Las células High-5 se cultivan hasta una confluencia del 50% bajo las condiciones siguientes: 27°C, sin CO_2 , sin pen./strep. Para cada placa de 150 mm, se mezclaron 30 μg de vector basado en pIE que contenía la secuencia con 1 ml de medio Ex-Cell (medios: Ex-Cell 401 + 1/100 de L-glu, JRH Biosciences nº 14401-78P (nota: este medio es fotosensible)), y en un tubo separado, se mezclaron 100 μl de Cellfectin (Cellfectin, Gibco BRL nº 10362-010) (mezclado con vórtex) con 1 ml de medio Ex-Cell. Las dos soluciones se agruparon y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron 8 ml de medio Ex-Cell a los 2 ml de mezcla de ADN/Cellfectin y ésta se utilizó para recubrir células high-5 que habían sido lavadas una vez con medio Ex-Cell. A continuación, la placa se incubó en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de ADN/Cellfectin seguidamente se aspiró, y las células se lavaron una vez con Ex-Cell para eliminar el exceso de Cellfectin, se añadieron 30 ml de

medio Ex-Cell fresco y las células se incubaron durante 3 días a 28°C. Se recolectó el sobrenadante y se determinó la expresión de la secuencia en el vector de expresión baculovirus mediante unión por lotes de 1 ml de sobrenadante a 25 ml de perlas de Ni²⁺-NTA (Qiagen) para las proteínas etiquetadas con histidina o perlas de proteína A-sefarosa CL-4B (Pharmacia) para las proteínas etiquetadas con IgG, seguido de análisis de SDS-PAGE comparando una concentración conocida de estándar de proteína mediante tinción con azul de Coomassie.

El medio acondicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 litros) se recolectó mediante centrifugación para separar las células y se filtró a través de filtros de 0,22 micrómetros. Para los constructos etiquetados con poli-His, la proteína que comprendía la secuencia se purificó utilizando una columna de Ni²⁺-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombeó por una columna de Ni²⁺-NTA de 6 ml equilibrada en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un caudal de 4 a 5 ml/minutos a 48°C. Tras la carga, la columna se lavó con tampón de equilibración adicional y la proteína eluida con tampón de equilibración que contenía imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada seguidamente se desaló en un tampón de almacenamiento que contenía Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacenó a -80°C.

Se purificaron constructos de inmunoadhesina (que contenía Fc) a partir del medio acondicionado de la manera siguiente. El medio acondicionado se bombeó por una columna de proteína A de 5 ml (Pharmacia) que había sido equilibrada en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Tras la carga, la columna se lavó extensivamente con tampón de equilibración antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contenía 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada posteriormente se desaló en tampón de almacenamiento, tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad de la secuencia se evaluó con geles de SDS-poliacrilamida y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminales por la degradación de Edman y otros procedimientos analíticos según se desease o resultase necesario.

PRO172 se expresó utilizando el procedimiento con baculovirus anteriormente indicado, utilizando células high-5.

Ejemplo 6

Preparación de anticuerpos ligantes de PRO172

El presente ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden ligarse específicamente a PRO172.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas de la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que pueden utilizarse se incluyen PRO172 purificado, proteínas de fusión que contienen PRO172 y células que expresan PRO172 recombinante sobre la superficie celular. La selección del inmunógeno puede ser llevada a cabo por el experto en la materia sin necesidad de experimentación excesiva.

Se inmunizan ratones, tales como Balb/c, con el inmunógeno PRO172 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se les inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente una cantidad de entre 1 y 100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas plantares traseras del animal. A continuación, los animales inmunizados reciben un refuerzo 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Seguidamente, durante varias semanas, los ratones también pueden recibir un refuerzo con inyecciones de inmunización adicionales. Pueden obtenerse muestras de suero periódicamente de los ratones mediante sangrado retroorbital para el análisis en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-PRO172.

Tras detectar un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para los anticuerpos pueden recibir una inyección intravenosa final de PRO172. Tres a cuatro días después, se sacrifican los ratones y se recolectan las células del bazo. A continuación, las células de bazo se fusionan (utilizando polietilenglicol al 35%) con una línea celular de mieloma murino seleccionada, tal como P3X63AgU.1, disponible de ATCC, nº CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que después pueden sembrarse en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, los híbridos de mieloma y los híbridos de células de bazo.

Las células de hibridoma se criban en una ELISA para reactividad contra PRO172. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secreten los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO172 se encuentra comprendido dentro de los conocimientos de la técnica.

Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones Balb/c singénicos para producir ascites que contiene los anticuerpos monoclonales anti-PRO172. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse en matraces de cultivo de tejido o botellas roller. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en el ascites puede conseguirse mediante precipitación con sulfato amónico, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede utilizarse cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpo a proteína A o a proteína G.

Ejemplo 7

Purificación de polipéptidos PRO172 utilizando anticuerpos específicos

Pueden purificarse polipéptidos PRO172 nativos o recombinantes mediante una diversidad de técnicas estándar en la técnica de la purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifica polipéptido pro-PRO172, polipéptido PRO172 maduro o polipéptido pre-PRO172 mediante cromatografía de inmunoadfinidad utilizando anticuerpos específicos del polipéptido PRO172 de interés. En general, se construye una columna de inmunoadfinidad acoplando covalentemente el anticuerpo anti-polipéptido PRO172 a una resina cromatografía activada.

Se preparan inmunoglobulinas policlonales a partir de sueros inmunológicos mediante precipitación con sulfato amónico o mediante purificación en proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). De manera similar, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de líquido ascites de ratón mediante precipitación con sulfato amónico o cromatografía en proteína A inmovilizada. Se une covalentemente una inmunoglobulina parcialmente purificada a una resina cromatográfica, tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea, y la resina derivada se lava siguiendo las instrucciones del fabricante.

Dicha columna de inmunoadfinidad se utiliza en la purificación del polipéptido PRO172 preparando una fracción a partir de células que contienen el polipéptido PRO172 en una forma soluble. Esta preparación se deriva mediante solubilización de la célula completa o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o mediante otros procedimientos bien conocidos de la técnica. Alternativamente, puede secretarse polipéptido PRO172 soluble que contiene una secuencia de señal, en cantidad útil hacia el medio en el que se cultivan las células.

Se pasa una preparación que contiene polipéptido PRO172 soluble sobre la columna de inmunoadfinidad, y la columna se lava bajo condiciones que permiten la absorción preferente del polipéptido PRO172 (por ejemplo tampones de elevada fuerza iónica en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye bajo condiciones que alteran la unión de anticuerpo/polipéptido PRO172 (por ejemplo un tampón de pH reducido, tal como pH de aproximadamente 2 a 3, o una concentración elevada de caótopo, tal como urea o ión tiocianato) y se recoge el polipéptido PRO172.

Ejemplo 8

Cribado de fármacos

La presente invención resulta particularmente útil para cribar compuestos mediante la utilización de polipéptido PRO172 o un fragmento ligante del mismo en una diversidad de técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido PRO172 o fragmento utilizado en dicho ensayo puede encontrarse libre en solución, fijo a un soporte sólido, transportado sobre una superficie celular, o situado intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármacos utiliza células huésped eucarióticas o procarióticas que se transforman establemente con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO172 o fragmento. Se criban fármacos frente a dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Estas células, en forma viable o fija, pueden utilizarse para ensayos de unión estándares. Puede medirse, por ejemplo, la formación de complejos entre un polipéptido PRO172 o un fragmento y el agente sometido a ensayo. Alternativamente, puede examinarse la reducción de formación de complejo entre el polipéptido PRO172 y su célula diana o receptores diana causada por el agente sometido a ensayo.

De esta manera, la presente invención proporciona procedimiento de criba de fármacos o de cualquier otro agente que pueda afectar a una enfermedad o trastorno asociado al polipéptido PRO172. Estos procedimientos comprenden poner en contacto dicho agente con un polipéptido PRO172 o fragmento del mismo y ensayar para: (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO172 o fragmento, o (ii) para la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO172 o fragmento y la célula, mediante procedimientos bien conocidos de la técnica. En estos procedimientos de unión competitiva, el polipéptido PRO172 o fragmento típicamente se marca. Tras una incubación adecuada, el polipéptido PRO172 o fragmento libres se separan del presente en forma ligada, y la cantidad de marcaje libre o no acomplexado es una medida de la capacidad del agente particular de ligar el polipéptido PRO172 o de interferir con el complejo polipéptido PRO172/célula.

Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona el cribado de alto rendimiento de compuestos que presentan la afinidad de unión adecuada por un polipéptido y se describe en detalle en la patente WO n° 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. Brevemente, se sintetizan un gran número de diferentes compuestos péptidos pequeños de ensayo sobre un sustrato sólido, tal como clavijas de plástico o alguna otra superficie. Aplicado a un polipéptido PRO172, los compuestos péptidos de ensayo se hacen reaccionar con el polipéptido PRO172 y se lavan. El polipéptido PRO172 unido se detecta mediante procedimientos bien conocidos de la técnica. También pueden recubrirse directamente placas con el polipéptido PRO172 purificado para la utilización en las técnicas de cribado de fármacos anteriormente indicadas. Además, pueden utilizarse anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

La presente invención también contempla la utilización de ensayos de cribado de fármaco competitivos en los que anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a un polipéptido PRO172 compiten específicamente con un compuesto

de ensayo para la unión al polipéptido PRO172 o a fragmentos del mismo. De esta manera, los anticuerpos pueden utilizarse para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO172.

5 Ejemplo 9

Diseño racional de fármacos

10 El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de un polipéptido biológicamente activo de interés (es decir, un polipéptido PRO172) o de moléculas pequeñas con las que interacciona, por ejemplo agonistas, antagonistas o inhibidores. Puede utilizarse cualquiera de estos ejemplos para diseñar fármacos que resulten más activos, o formas estables del polipéptido PRO172, o que intensifiquen o interfieran con la función del polipéptido PRO172 *in vivo* (c.f., Hodgson, *Bio/Technology* 9:19-21, 1991).

15 En un enfoque, se determina la estructura tridimensional del polipéptido PRO172, o de un complejo de polipéptido PRO172-inhibidor, mediante cristalografía de rayos X, mediante modelado informático o, más típicamente, mediante una combinación de los dos enfoques. Debe determinarse tanto la forma como las cargas del polipéptido PRO172 para elucidar la estructura y para determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Menos frecuentemente, puede obtenerse información útil sobre la estructura del polipéptido PRO172 mediante modelado basado en la estructura de 20 las proteínas homólogas. En ambos casos, se utiliza información estructural relevante para diseñar moléculas análogas similares al polipéptido PRO172 o para identificar inhibidores eficientes. Entre los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos se incluyen moléculas que presentan actividad o estabilidad mejorada, tal como demuestran Braxton y Wells, *Biochemistry* 31:7796-7801, 1992, o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos, tal como demuestran Athauda *et al.*, *J. Biochem.* 113:742-746, 1993.

25 También resulta posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado mediante un ensayo funcional, tal como se ha descrito anteriormente, y después resolver su estructura cristalina. Este enfoque, en principio, proporciona un fármaco nuclear a partir del que se puede basar el posterior diseño de fármacos. Resulta posible evitar por completo la cristalografía de la proteína generando anticuerpos antiidiotípicos (anti-ids) contra un anticuerpo funcional 30 farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, el sitio de unión de los anti-ids previsiblemente resultaría un análogo del receptor original. El anti-id seguidamente podría utilizarse para identificar y para aislar péptidos a partir de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados después podrían actuar como el fármaco nuclear.

35 En virtud de la presente invención, pueden obtenerse cantidades suficientes del polipéptido PRO172 para llevar a cabo estudios analíticos tales como la cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO172 proporcionado en la presente invención proporciona una guía para aquellos que utilizan técnicas de modelado informático en lugar de, o además de, la cristalografía de rayos X.

40 Ejemplo 10

Ensayo antitumoral in vitro

45 La actividad antiproliferativa de los polipéptidos PRO172 se determinó en el ensayo *in vitro* investigacional orientado a enfermedades de exploración de fármacos anticáncer del National Cancer Institute (NCI) utilizando un ensayo de unión con pigmento sulforodamina B (SRB) esencialmente tal como describen Skehan *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-1112, 1990. Las 60 líneas celulares tumorales utilizadas en este estudio ("el panel de la NCI"), así como las condiciones para su mantenimiento y cultivo *in vitro*, han sido descritas por Monks *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 83:757-766, 1991. El propósito de este cribado es evaluar inicialmente la actividad citotóxica y/o citostática de los compuestos 50 de ensayo frente a diferentes tipos de tumores (Monks *et al.*, *supra*; Boyd, *Cancer Princ. Pract. Oncol. Update* 3(10):1-12, 1989).

Se recolectaron células de aproximadamente 60 líneas celulares tumorales humanas con tripsina/EDTA (Gibco), se lavaron una vez, se resuspendieron en IMEM y se determinó su viabilidad. Las suspensiones celulares se añadieron 55 mediante pipeta (volumen: 100 μ l) a placas de microtitulación separadas de 96 pocillos. La densidad celular para la incubación de 6 días era inferior a la de la incubación de 2 días para evitar el crecimiento excesivo. Los inóculos se dejaron reposar durante un periodo preincubación de 24 horas a 37°C para su estabilización. En el tiempo 0 se añadieron diluciones al doble de la concentración de ensayo deseada en alícuotas de 100 μ l a los pocillos de la placa de microtitulación (dilución 1:2). Los compuestos de ensayo se evaluaron a 5 diluciones semilogarítmicas (1.000 a 60 100.000 veces). Las incubaciones tuvieron lugar durante dos días y durante seis días en una atmósfera de 5% de CO₂ y de 100% de humedad.

Tras la incubación, el separó el medio y las células se fijaron en 0,1 ml de ácido tricloroacético al 10% a 40°C. Las placas se enjuagaron cinco veces con agua desionizada, se tiñeron durante 30 minutos con 0,1 ml de pigmento 65 sulforodamina B al 0,4% (Sigma) disuelto en ácido acético al 1%, se enjuagaron cuatro veces con ácido acético al 1% para eliminar el pigmento no unido, se secaron, y se extrajo el pigmento durante cinco minutos con 0,1 ml de base Tris 10 mM (tris(hidroximetil)aminometano), pH 10,5. La absorbancia (DO) de la sulforodamina a 492 nm se midió utilizando un lector de placas de microtitulación de 96 pocillos conectado a un ordenador.

ES 2 290 606 T3

Una muestra de ensayo se considera positiva si muestra un efecto inhibitor del crecimiento de por lo menos el 40% a una o más concentraciones. Se muestran los resultados en la Tabla 4 siguiente, en la que las abreviaturas de tipos celulares tumorales son las siguientes:

5 NSCL = carcinoma pulmonar de células no pequeñas; SNC = sistema nervioso central

TABLA 4

10	Compuesto	Concentración	Días	Tipo de célula tumoral	Denominación
15	PRO172	1,25 nM	2	Mama	T-470
	PRO172	1,25 nM	6	NSCL	NCI-H460
	PRO172	1,25 nM	6	Colon	KM 12
20	PRO172	1,25 nM	6	SNC	SF-295
	PRO172	1,25 nM	6	Melanoma	UAC-62
25	PRO172	1,25 nM	2	Mama	MDA-MB-231/ATCC
	PRO172	1,25 nM	6	Leucemia	CCRF-CEM
	PRO172	1,25 nM	6	Leucemia	MOLT4
30	PRO172	1,25 nM	6	NSCL	NCI-H460
	PRO172	1,25 nM	6	Colon	HCT-116
	PRO172	1,25 nM	6	Colon	HT29
35	PRO172	1,25 nM	6	SNC	SF-295
	PRO172	1,25 nM	6	SNC	U251
	PRO172	1,25 nM	6	Melanoma	LOX IMVI
40	PRO172	1,25 nM	6	Melanoma	UACC-62
	PRO172	1,25 nM	6	Ovario	OVCAR-8
	PRO172	1,25 nM	6	Renal	RXF 393
45	PRO172	1,25 nM	6	Mama	T-470

Depósito de material

50 Los materiales siguientes han sido depositados en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

55	Material	ATCC Dep. nº	Fecha de depósito
	DNA35916-1161	209419	28-October-1997

60 Estos depósitos se realizaron bajo las disposiciones del Tratado de Budapest acerca del reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes y las regulaciones en virtud del mismo (Tratado de Budapest). Este tratado garantiza el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha de depósito. Los depósitos serán proporcionados por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y bajo un acuerdo entre Genentech Inc. y la ATCC, que garantiza una disponibilidad permanente y no limitada de la progenie del cultivo del depósito para el público tras concederse la patente US pertinente, o tras abrir al público cualquier solicitud de patente US o extranjera, lo que ocurra primero, y garantiza la disponibilidad de la progenie para una persona que el U.S. Commissioner of Patentes and Trademarks determinará que posee el derecho a ello de conformidad con la disposición 35 U.S.C. 122 y las normas del comisario al amparo de la misma (incluyendo la disposición 37 CFR 1.14, con referencia particular a la disposición 886 OG 638).

ES 2 290 606 T3

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales bajo depósito muriese o se perdiese o resultase destruido estando en cultivo bajo las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente sustituidos tras su advertimiento por otro cultivo igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para la práctica de la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con su legislación en materia de patentes.

La especificación escrita anterior se considera suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no se encuentra limitada en su alcance por el constructo depositado, debido a que la realización depositada se proporciona únicamente a título ilustrativo de determinados aspectos de la invención y otros constructos que son funcionalmente equivalentes se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención, según se define en las reivindicaciones. El depósito de material en la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente memoria resulta inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe interpretarse como limitativo del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. En efecto, se pondrán de manifiesto diversas modificaciones, además de las mostradas y descritas en la presente memoria, a los expertos en la materia a partir de la descripción proporcionada anteriormente.

REIVINDICACIONES

5 1. Utilización de un agente en la preparación de un medicamento para inhibir el crecimiento de una célula tumoral, en el que dicho agente es:

(i) un polipéptido PRO172 que comprende una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80% con:

10 (a) los residuos 1 o aproximadamente 22 a 723 mostrados en la figura 2 (SEC ID nº 2),

(b) los residuos X a 723 mostrados en la figura 2 (SEC ID nº 2), en los que X es cualquier residuo aminoácido entre 17 y 26 de la figura 2 (SEC ID nº 2), o

15 (c) residuos 1 o aproximadamente 22 a X de la figura 2 (SEC ID nº 2), en los que X es cualquier aminoácido entre el aminoácido 543 y el aminoácido 552 de la figura 2 (SEC ID nº 2),

en la que la identidad de secuencia se determina a lo largo de la longitud completa de la secuencia recitada;

20 o (ii) un fragmento del polipéptido PRO172 mostrado en la figura 2 (SEC ID nº 2),

en la que el agente presenta actividad antiproliferativa en el ensayo de exploración *in vitro* de fármacos anticáncer del NATIONAL CANCER INSTITUTE.

25 2. Procedimiento *in vitro* para la inhibición del crecimiento de una célula tumoral, que comprende exponer dicha célula tumoral a una cantidad eficaz de un agente según se define en la reivindicación 1.

3. Utilización o procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en la que el nivel de identidad es de por lo menos 85%.

30 4. Utilización o procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en la que el nivel de identidad es de por lo menos 90%.

35 5. Utilización o procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en la que el nivel de identidad es de por lo menos 95%.

6. Utilización o procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido PRO172 comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID nº 2).

40 7. Utilización o procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en la que el polipéptido PRO172 consiste de:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID nº 2),

(b) el dominio extracelular de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID nº 2) o

45 (c) la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID nº 2), sin el péptido de señal.

8. Utilización o procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicho tumor es un cáncer.

50 9. Utilización o procedimiento según la reivindicación, en la que el cáncer se selecciona de entre el grupo que consiste de cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer renal, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer del sistema nervioso central, melanoma y leucemia.

55 10. Composición útil para la inhibición del crecimiento celular neoplásico, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, y que adicionalmente comprende un agente adicional inhibidor del crecimiento, agente citotóxico o agente quimioterapéutico.

60 11. Artículo de fabricación que comprende:

un recipiente;

65 una composición, contenida en el interior del recipiente, que comprende un agente, tal y como se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, y que comprende adicionalmente un agente inhibidor del crecimiento adicional, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico.

FIGURA 1A

TGGGGGGCCCCCAGGCTCGCGCGTGGAGCGAAGCAGCATGGGCAGTCGGTGGCGGCTGGCCC
 TGGCGGTGCTCTCGGCCTTGCTGTGTGAGGTCTGGAGCTCTGGGGTGTTCGAAGTGAAGCTG
 CAGGAGTTCTGTAACAAGAAGGGGCTGCTGGGSAACCGCAATTGCTGCCGCGGGGGCGCGGG
 GCCACCGCCGTGGCGCTGCCGGACCTTCTTCGCGGTGTGCTCAAGCACTACCAGGCCAGCG
 TGTCCCCCGAGCGGCCCTGCACCTACGGCAGCGCCGTACCCCCGTGCTGGGCGTGGACTCC
 TTCAGTCTGCCCGACGGCGGGGGCGCGGACTCCGGCTTCAGCAACCCCATCCGCTTCCCCCTT
 CGGCTTCACCTGGCCGGGACCTTCTCTCTGATTATTGAAGCTCTCCACACAGATTCTCTTG
 ATGACCTCGCAACAGAAAACCCAGAAAGACTCATCAGCCGCTGGCCACCCAGAGGCACCTG
 ACGGTGGCCGAGGAGTGGTCCAGGACCTGCACAGCAGCGGGCCSACGGACCTCAAGTACTC
 CTACCGCTTCGTGTGTGACGAACACTACTACGGAGAGGGCTGCTCCGTTTTCTGCGGTCCCC
 GGGACGATGCCTTCGCCCACTTCACCTGTGGGGAGCGTGGGGAGAAAGTGTGCAACCCCTGGC
 TGGAAAGGGCCCTACTGCACAGAGCCGATCTGCTGCTGCTGATGTGATGAGCAGCATGGATT
 TTGTGACAAACCAAGGGGAATGCAAGTGCAGAGTGGGCTGGCAGGGCCGGTACTGTGACGAGT
 GTATCCGCTATTCAGGCTGTCTCCATGGCACCTGCCAGCAGCCCTGGCAGTSCAACTGCCAG
 GAAGGCTGGGGGGGCTTTTCTGCAACCAGGACCTGAAGTACTGCACACACCATAAGCCCTG
 CAAGAATGGAGCCACCTGCACCAACACGGGGCCAGGGGAGCTACACTTCCCTCTTCCCGGCTG
 GGTACACAGGTGCCACCTGCCAGCTGGGGATTGACGAGTGTGACCCGAGCCCTTGTAAAGAAC
 GGAGGGAGCTGCACCGATCTCGAGAACAGCTACTTCTGTACCTGCCCCACCCGGCTTCTACGG
 CAAAATCTGTGAATTGAGTGCCATGACCTGTGCGGACGGCCCTTGCTTTAAGGGGGTGGST
 GCTCAGACAGCCCCGATGGAGCGTACAGCTGCCGCTGCCCGGTGGGCTACTTGGGCTTCAACTGT
 GAGAAGAAAATTGACTACTGCAGCTCTTACCCCTGTTCTTAATGGTGGCAAGTGTGTGACCT
 CGGTGATGCCCTACCTGTGCGGCTGCCAGGCCGGCTTCTCGGGGAGGCACTGTGACGACAAGG
 TGGACGACTGGGCTTCTCCCCGTGCCCCAAACGGGGGACCTGCCCGGATGGGCTGAAGGAC
 TTCTCTTGACCTGCCCGCTGGCTACACGGGCAGGAATSCAGTGGCCCCCTCAGGAGGTG
 CGAGCAGGCACCTGCCACAATGGGGCCACCTGCCACGACAGGGCCACCCCTATGTTGTGG
 AGTGTGCCCGAGGCTACGGGGTCCCAACTGCCAGTTCTGTCTCCCCGAGCTGGCCCCGGGG
 CCAGCGGTGGTGGACCTCACTGASAAGCTAGAGGGCCAGGGCCGGGATTCCTCTGGGTGGC
 CGTGTGCCCGGGGTGATCCTTGTCTCATGTGCTGCTGGGCTGTGGCGCTGTGGTGGTCT
 GCGTCCGGGTGAGGCTGCAGAACCAACGGCCCCCAGCCGACCCCTGCCGGCGGGAGACXIAU

FIGURA 1B

ACCATGAACAACCTGGCCAACTGCCAGCGTGAGAAGGACATCTCAGTCAGCATCATCGGGGC
 CACGCAGATCAAGAACACCAACAAGAAGGCGGACTTCCACGGGGACCACAGCGCCGACAAGA
 ATGGCTTCAAGGCCCGCTACCCAGCGGTGGACTATAACCTCGTGCAGGACCTCAAGGGTGAC
 GACACCGCCGTCAGGGACGCGCACAGCAAGCGTGACACCAAGTGCCAGCCCCAGGGCTCCTC
 AGGGGAGGAGAAGGGGACCCCCACCACACTCAGGGGTGGAGAAGCATCTGAAGAAGGAGGC
 CGGACTCGGGCTGTTCAACTTCAAAAGACACCAAGTACCAGTCGGTGTACGTCTATCCGAG
 GAGAAGGATGAGTGCGTCATAGCAACTGAGGTGTAAAATGGAAGTGAGATGGCAAGACTCCC
 GTTCTCTTAAATAAGTAAATTCGAAGGATATATGCCCCAACGAATGCTGCTGAAGAGGA
 GGGAGGCCCTCGTGACTGCTGCTGAGAAACCGAGTTCCAGACCGAGCAGGTTCTCTCTCTGAG
 GTCTCGACGCTGCGGACAGCCTGTCGGGGCCCCGGCCCCCTGCGGCACTGCCTTCCCTGACCT
 CGCCCTTGCACTATGGACAGTTGCTCTTAAGAGAATATATATTTAAATGGGTCAACTGAATT
 ACGCATAAGAAGCATGCACTGCCTGAGTGTATATTTTGCATTCTTATGAGCCAGTCTTTTTCT
 TGAATTAGAAACACAAACACTGCCTTTATTGTCTTTTTTGATACGAAGATGTGCTTTTTCTA
 GATGGAAAAGATGTGTCTTATTTTTTGGATTTGTAAAAATATTTTTCATCATATCTGTAAAG
 CTTGAGTATTTTGTGATGTTCTTTTTTATAATTTAAATTTTGGTAAATATGTACAAAGGCA
 CTTCGGCTCTATGTGACTATATTTTTTTGTATATAAATGTATTTATGGAATATTGTGCAAT
 GTTATTTGAGTTTTTCTACTGTTTTTGTAAATGAAGAAATTCCTTTTTTAAATATTTTCCAAA
 ATAAATTTTATGAATGACAAAAA
 AAAAAAAAAA
 AAAAAAAAAA

FIGURA 2

MGSRCALALAVLSAILLCQVWSSGVFELKLQEFVNKKGLLGNNRNCRCGGAGPPPCACRTFFRV
 CLKHYQASVSPEPPCTYGSVTPVLGVDSFSLPDGGGADSAFSNPFRFPFGFTWPGTFSLII
 EALHTDSPDDLATENPERLISRLATQRHLTVGEEWSQDLHSSGRDLDKYSYRFVCDHIYYGE
 GCSVFRCRPRDDAFGHFTCGERGEKVCNPGWKOPYCTEPICLPGCDEQHGFCDKPGECKCRVG
 WQGRYCDCEIRYPGCLHGTCQOPWQCNCQEGWGGLFCNQDLNYCTIHKPKNGATCTNTGQG
 SYTCSCRPGYTGATCELGIDECDFSPCKNGGSCTDLENSYSCTCPPGFGYKICELSAMTCAD
 GPCFNGGRCSDSPDGGYSRCPPVGYSGFNCEKKIDYCESSPCSNAGAKCVDLGDAYLCRCQAG
 FSGRHCDNVDDCASSPCANGGTCRDGVNDFSCCTCPPGYTGRNCSAPVSRCEHAPCHNGATC
 HERGHRYVCECARGYGGPNCQFLLPELPPGPAVVDLTEKLEGQGGPFPWVAVCAGVILVLM
 LLGCAAVVVCVRLRLQKHRPPADPCRGETETMNNLANCQREKDISVSIIGATQIKNTNKKAD
 FHGDHSADKNGFKARYPAVDYNLVQDLKDDTAVRDAHSKRDTKCQPGQSSGEEKGTPTTLR
 GGEASERKRPFDSGCSTSKDTKYQSVYVISEEKDECVIATEV

Péptido de señal	Amino acids 1-21
Dominio transmembranal	Amino acids 548-568
Sitio de N-glucosilación	Amino acids 477-481
Sitio de fosforilación de proteína quinasa AMPc- y GMPc-dependiente	Amino acids 660-664
Sitios de fosforilación de caseína quinasa II	Amino acids 93-97; 131-135; 154-158; 203-207; 342-346; 344-348; 359-373; 457-461; 483-487; 495-499; 659-663; 670-674; 671-675; 698-702
Sitios de fosforilación de tirosina-quinasa	Amino acids 176-185; 252-261
Sitios de N-miristoilación	Amino acids 2-6; 37-43; 40-46; 98-104; 99-105; 262-268; 281-287; 282-288; 301-307; 310-316; 328-334; 340-346; 378-384; 387-393; 512-518; 576-682; 683-689; 695-701
Sitios de hidroxilación de ácido aspártico y de asparagina	Amino acids 343-355; 420-432; 458-480
Sitio de unión de lípido de lipoproteína membranal procariótica	Amino acids 552-563
Firmas de patrón de cisteínas de dominio similar a EGF	Amino acids 243-255; 274-286; 314-326; 352-364; 391-403; 429-441; 467-479; 505-517

ES 2 290 606 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

5 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR
NEOPLÁSICO

10 <130> P1694R1 PCT

<140> EP 04025897.2

<141> 1999-10-05

15 <150> EP 99970398.6

<151> 1999-10-05

20 <150> PCT/US99/23089

<151> 1999-10-05

<150> US 60/109.080

25 <151> 1998-10-13

<210> 1

<211> 2933

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

35
tggggggcccc ccaggctcgc gcgtggagcg aagcagcatg ggcagtcggt 50
gcgcgctggc cctggcggtg ctctcgccct tgctgtgtca ggtctggagc 100
tctgggggtgt tcgaactgaa gctgcaggag ttcgtcaaca agaaggggct 150
gctgggggaac cgcaattgct gccgcggggg cgcggggcna ccgcctgctg 200
45 cctgccggac cttcttccgc gtgtgcctca agcactacca ggccagcgtg 250
tcccccgagc cgccctgcac ctacggcagc gccgtcacc cctgtctggg 300

50

55

60

65

ES 2 290 606 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60

cgtcgactcc ttcagtctgc ccgacggcgg gggcgccgac tccgcgttca 350
 gcaaccccat ccgcttcccc ttccggcttca cctggccggg caccttctct 400
 ctgattattg aagctctcca cacagattct cctgatgacc tcgcaacaga 450
 aaacccagaa agactcatca gccgcctggc caccagagg cacctgacgg 500
 tgggcgagga gtgggtccag gacctgcaca gcagcggccg cagggaacct 550
 aagtactcct accgcttcgt gtgtgacgaa cactactacg gagagggctg 600
 ctccgttttc tgccgtcccc gggacgatgc cttcggccac ttacacctgt 650
 gggagcgtgg ggagaaagtg tgcaaccctg gctggaaagg gccctactgc 700
 acagagccga tctgcctgcc tggatgtgat gagcagcatg gattttgtga 750
 caaaccaggg gaatgcaagt gcagagtggg ctggcagggc cggctactgt 800
 acgagtgtat ccgctatcca ggctgtctcc atggcacctg ccagcagccc 850
 tggcagtga actgccagga aggctggggg ggccttttct gcaaccagga 900
 cctgaactac tgcacacacc ataagccctg caagaatgga gccacctgca 950
 ccaacacggg ccaggggagc tacacttgc tttgccggcc tgggtacaca 1000
 ggtgccacct gcgagctggg gattgacgag tgtgaccca gcccttgtaa 1050
 gaacggaggg agctgcacgg atctcgagaa cagctactcc tgtacctgcc 1100
 caccgggctt ctacggcaaa atctgtgaat tgagtgccat gacctgtgcg 1150
 gacggccctt gctttaacgg gggtcgggtg tcagacagcc ccgatggagg 1200
 gtacagctgc cgctgccccg tgggctactc cggcttcaac tgtgagaaga 1250
 aaattgacta ctgcagctct tcacctgtt ctaatgggtg caagtgtgtg 1300
 gacctcgggt atgcctacct gtgccgctgc caggccggct tctcggggag 1350
 gcactgtgac gacaacgtgg acgactgcgc ctctccccg tgcgccaacg 1400
 ggggcacctg ccgggatggc gtgaacgact tctcctgcac ctgcccgcct 1450
 ggctacacgg gcaggaactg cagtgcctcc gtcagcaggt gcgagcacgc 1500
 accctgccac aatggggcca cctgccacga gagggggcac cgctatgtgt 1550
 gcgagtgtgc ccgaggctac ggggggtcca actgccagtt cctgctcccc 1600
 gagctgcccc cgggcccagc ggtgggtggc ctactgaga agctagaggg 1650
 ccaggggcgg ccattcccc tgggtggcgt gtgcgcggg gtcactcttg 1700
 tcctcatgct gctgctgggc tgtgccgctg tgggtgtctg cgtccggctg 1750
 aggctgcaga agcacgggc cccagccgac cctgcccgg gggagacgga 1800
 gaccatgaac aacctggcca actgccagcg tgagaaggac atctcagtca 1850
 gcatcatcgg ggccacgcag atcaagaaca ccaacaagaa ggcggacttc 1900

ES 2 290 606 T3

cacggggacc acagcgccga caagaatggc ttcaaggccc gctacccagc 1950
 ggtggactat aacctcgtgc aggacctcaa gggtgacgac accgccgtca 2000
 5 gggacgcgca cagcaagcgt gacaccaagt gccagcccca gggctcctca 2050
 ggggaggaga aggggacccc gaccacactc aggggtggag aagcatctga 2100
 10 aagaaaaagg ccggactcgg gctgttcaac ttcaaaagac accaagtacc 2150
 agtcggtgta cgtcatatcc gaggagaagg atgagtgcgt catagcaact 2200
 gaggtgtaaa atggaagtga gatggcaaga ctcccgtttc tcttaaaata 2250
 15 agtaaaatcc caaggatata tgccccaacg aatgctgctg aagaggaggg 2300
 aggcctcgtg gactgctgct gagaaaccga gttcagaccg agcaggttct 2350
 20 cctcctgagg tcctcgacgc ctgccgacag cctgtcgcgg cccggccgcc 2400
 tgcggcactg ccttcctgta cgtcgcctgt gcactatgga cagttgctct 2450
 taagagaata tatatttaaa tgggtgaact gaattacgca taagaagcat 2500
 25 gcactgcctg agtgtatatt ttggattctt atgagccagt cttttcttga 2550
 attagaaaca caaacactgc ctttattgtc ctttttgata cgaagatgtg 2600
 30 ctttttctag atggaaaaga tgtgtgttat tttttggatt tgtaaaaata 2650
 tttttcatga tatctgtaaa gcttgagtat tttgtgatgt tcgtttttta 2700
 taatttaaat tttggtaaat atgtacaaag gcacttcggg tctatgtgac 2750
 35 tatatTTTTT tgtatataaa tgtatttatg gaatattgtg caaatgttat 2800
 ttgagttttt tactgttttg ttaatgaaga aattcctttt taaaatattt 2850
 40 ttccaaaata aatttttatga atgacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2900
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2933

45 <210> 2
 <211> 723
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50
 <400> 2

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

ES 2 290 606 T3

	Pro	Cys	Thr	Tyr	Gly	Ser	Ala	Val	Thr	Pro	Val	Leu	Gly	Val	Asp
					80					85					90
5	Ser	Phe	Ser	Leu	Pro	Asp	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Ser	Ala	Phe	Ser
					95					100					105
	Asn	Pro	Ile	Arg	Phe	Pro	Phe	Gly	Phe	Thr	Trp	Pro	Gly	Thr	Phe
					110					115					120
10	Ser	Leu	Ile	Ile	Glu	Ala	Leu	His	Thr	Asp	Ser	Pro	Asp	Asp	Leu
					125					130					135
	Ala	Thr	Glu	Asn	Pro	Glu	Arg	Leu	Ile	Ser	Arg	Leu	Ala	Thr	Gln
15					140					145					150
	Arg	His	Leu	Thr	Val	Gly	Glu	Glu	Trp	Ser	Gln	Asp	Leu	His	Ser
					155					160					165
20	Ser	Gly	Arg	Thr	Asp	Leu	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Arg	Phe	Val	Cys	Asp
					170					175					180
	Glu	His	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Gly	Cys	Ser	Val	Phe	Cys	Arg	Pro	Arg
					185					190					195
25	Asp	Asp	Ala	Phe	Gly	His	Phe	Thr	Cys	Gly	Glu	Arg	Gly	Glu	Lys
					200					205					210
	Val	Cys	Asn	Pro	Gly	Trp	Lys	Gly	Pro	Tyr	Cys	Thr	Glu	Pro	Ile
					215					220					225
30	Cys	Leu	Pro	Gly	Cys	Asp	Glu	Gln	His	Gly	Phe	Cys	Asp	Lys	Pro
					230					235					240
	Gly	Glu	Cys	Lys	Cys	Arg	Val	Gly	Trp	Gln	Gly	Arg	Tyr	Cys	Asp
35					245					250					255
	Glu	Cys	Ile	Arg	Tyr	Pro	Gly	Cys	Leu	His	Gly	Thr	Cys	Gln	Gln
					260					265					270
40	Pro	Trp	Gln	Cys	Asn	Cys	Gln	Glu	Gly	Trp	Gly	Gly	Leu	Phe	Cys
					275					280					285
	Asn	Gln	Asp	Leu	Asn	Tyr	Cys	Thr	His	His	Lys	Pro	Cys	Lys	Asn
					290					295					300
45	Gly	Ala	Thr	Cys	Thr	Asn	Thr	Gly	Gln	Gly	Ser	Tyr	Thr	Cys	Ser
					305					310					315
	Cys	Arg	Pro	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala	Thr	Cys	Glu	Leu	Gly	Ile	Asp
					320					325					330
50	Glu	Cys	Asp	Pro	Ser	Pro	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Thr	Asp
					335					340					345
	Leu	Glu	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Thr	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Tyr	Gly
					350					355					360
55	Lys	Ile	Cys	Glu	Leu	Ser	Ala	Met	Thr	Cys	Ala	Asp	Gly	Pro	Cys
					365					370					375
60	Phe	Asn	Gly	Gly	Arg	Cys	Ser	Asp	Ser	Pro	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser
					380					385					390
65															

ES 2 290 606 T3

	Cys Arg Cys Pro Val Gly Tyr Ser Gly Phe Asn Cys Glu Lys Lys	395	400	405
5	Ile Asp Tyr Cys Ser Ser Ser Pro Cys Ser Asn Gly Ala Lys Cys	410	415	420
	Val Asp Leu Gly Asp Ala Tyr Leu Cys Arg Cys Gln Ala Gly Phe	425	430	435
10	Ser Gly Arg His Cys Asp Asp Asn Val Asp Asp Cys Ala Ser Ser	440	445	450
	Pro Cys Ala Asn Gly Gly Thr Cys Arg Asp Gly Val Asn Asp Phe	455	460	465
15	Ser Cys Thr Cys Pro Pro Gly Tyr Thr Gly Arg Asn Cys Ser Ala	470	475	480
	Pro Val Ser Arg Cys Glu His Ala Pro Cys His Asn Gly Ala Thr	485	490	495
	Cys His Glu Arg Gly His Arg Tyr Val Cys Glu Cys Ala Arg Gly	500	505	510
25	Tyr Gly Gly Pro Asn Cys Gln Phe Leu Leu Pro Glu Leu Pro Pro	515	520	525
	Gly Pro Ala Val Val Asp Leu Thr Glu Lys Leu Glu Gly Gln Gly	530	535	540
30	Gly Pro Phe Pro Trp Val Ala Val Cys Ala Gly Val Ile Leu Val	545	550	555
	Leu Met Leu Leu Leu Gly Cys Ala Ala Val Val Val Cys Val Arg	560	565	570
35	Leu Arg Leu Gln Lys His Arg Pro Pro Ala Asp Pro Cys Arg Gly	575	580	585
	Glu Thr Glu Thr Met Asn Asn Leu Ala Asn Cys Gln Arg Glu Lys	590	595	600
	Asp Ile Ser Val Ser Ile Ile Gly Ala Thr Gln Ile Lys Asn Thr	605	610	615
45	Asn Lys Lys Ala Asp Phe His Gly Asp His Ser Ala Asp Lys Asn	620	625	630
	Gly Phe Lys Ala Arg Tyr Pro Ala Val Asp Tyr Asn Leu Val Gln	635	640	645
50	Asp Leu Lys Gly Asp Asp Thr Ala Val Arg Asp Ala His Ser Lys	650	655	660
	Arg Asp Thr Lys Cys Gln Pro Gln Gly Ser Ser Gly Glu Glu Lys	665	670	675
55	Gly Thr Pro Thr Thr Leu Arg Gly Gly Glu Ala Ser Glu Arg Lys	680	685	690
60	Arg Pro Asp Ser Gly Cys Ser Thr Ser Lys Asp Thr Lys Tyr Gln	695	700	705

65

ES 2 290 606 T3

Ser Val Tyr Val Ile Ser Glu Glu Lys Asp Glu Cys Val Ile Ala
710 715 720

5 Thr Glu Val
723

<210> 3

<211> 22

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15

<223> Oligonucleótido sonda sintético

<400> 3

20

ggatctcgag aacagctact cc

22

<210> 4

<211> 22

25

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30

<223> Oligonucleótido sonda sintético

<400> 4

35

tcgtccacgt tgcgtcaca tg

22

<210> 5

<211> 48

40

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

45

<223> Oligonucleótido sonda sintético

<400> 5

50

aaatctgtga attgagtgcc atggacctgt tgcggacggc ccttgctt

48

55

60

65