



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 279**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01) **A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **05011884 .3**

86 Fecha de presentación : **01.03.2000**

87 Número de publicación de la solicitud: **1621619**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.02.2006**

54 Título: **Polipéptidos secretados y transmembrana y los ácidos nucleicos que los codifican.**

30 Prioridad: **23.03.1999 US 125774 P**
23.03.1999 US 125778 P
24.03.1999 US 125826 P
31.03.1999 US 127035 P
05.04.1999 US 127706 P
21.04.1999 US 130359 P
27.04.1999 US 131270 P
27.04.1999 US 131272 P
27.04.1999 US 131291 P
04.05.1999 US 132371 P
04.05.1999 US 132379 P
04.05.1999 US 132383 P
25.05.1999 US 135750 P
08.06.1999 US 138166 P
20.07.1999 US 144791 P
03.08.1999 US 146970 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

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

72 Inventor/es: **Desnoyers, Luc;**
Eaton, Dan L.;
Goddard, Andrey;
Godowski, Paul J.;
Gurney, Austin L.;
Pan, James;
Stewart, Timothy A.;
Watanabe, Colin K.;
Wood, William I. y
Zhang, Zemin

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos secretados y transmembrana y los ácidos nucleicos que los codifican.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a la identificación y aislamiento de ADN nuevo y a la producción recombinante de polipéptidos nuevos.

10 **Antecedente de la invención**

Las proteínas extracelulares tienen funciones importantes en, entre otras cosas, la formación, diferenciación y mantenimiento de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación, o interacción con otras células, está gobernada habitualmente por la información recibida de otras células y/o el medio inmediato. Esta información es transmitida frecuentemente mediante polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos, y hormonas) que, a su vez, es recibida e interpretada por diversos receptores de células o proteínas unidas a membrana. Estos polipéptidos secretados o moléculas de señalización pasan normalmente a través del mecanismo secretor de las células para alcanzar su sitio de acción en el medio extracelular.

Las proteínas secretadas tienen varias aplicaciones industriales, incluyendo productos farmacéuticos, de diagnóstico, biosensores y biorreactores. La mayoría de los fármacos de proteínas disponibles actualmente, tales como agentes trombolíticos, interferones, interleuquinas, eritropoyetinas, factores estimulantes de colonias, y varias otras citoquinas, son proteínas secretoras. Sus receptores, que son proteínas de membrana, también tienen potencial como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Se están realizando esfuerzos tanto a nivel de industria como académica para identificar nuevas proteínas secretadas nativas. Muchos esfuerzos se centran en el cribado de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero para identificar las secuencias codificantes de proteínas secretadas nuevas. En la literatura se describen ejemplos de procedimientos de cribado y técnicas [véase, por ejemplo, Klein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 7108-7113 (1996); Patente de Estados Unidos No. 5.536.637].

Las proteínas unidas a membrana y receptores pueden tener funciones importantes en, entre otras cosas, la formación, diferenciación y mantenimiento de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, proliferación, migración, diferenciación, o interacción con otras células, está gobernada habitualmente por la información recibida de otras células y/o el medio inmediato. Esta información es transmitida frecuentemente mediante polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos, y hormonas) que, a su vez, es recibida e interpretada por diversos receptores de células o proteínas unidas a membrana. Entre dichas proteínas unidas a membrana y receptores de células se incluyen; pero no se limitan a, receptores de citoquina, quinasas receptoras, fosfatasa receptoras, receptores implicados en las interacciones célula-célula, y moléculas de adhesión celular, como selectinas e integrinas. Por ejemplo, la transducción de señales que regulan el crecimiento y la diferenciación celular está regulada en parte por la fosforilación de varias proteínas celulares. Las proteínas tirosina quinasas, enzimas que catalizan ese proceso, también pueden actuar como receptores de los factores de crecimiento. Entre los ejemplos se incluyen el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y el receptor del factor de crecimiento nervioso.

Las proteínas unidas a membrana y las moléculas receptoras tienen varias aplicaciones industriales, incluyendo como agentes farmacéuticos y de diagnóstico. Las inmunoadhesinas receptoras, por ejemplo, se pueden utilizar como agentes terapéuticos para bloquear las interacciones receptor-ligando. Las proteínas unidas a membrana también se pueden utilizar para cribar el péptido potencial o pequeñas moléculas inhibidoras de la interacción receptor/ligando pertinente.

Se están realizando esfuerzos tanto a nivel de industria como académica para identificar nuevas proteínas unidas a membrana o receptores nativos. Muchos esfuerzos se centran en el cribado de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero para identificar las secuencias codificantes de nuevas proteínas unidas a membrana o receptores.

55 **PRO4405**

Se están realizando muchos esfuerzos a nivel tanto industrial como académico para identificar nuevas proteínas receptoras transmembrana nativas. Muchos esfuerzos se centran en el cribado de bibliotecas de ADN recombinante de mamíferos para identificar las secuencias de codificación de nuevas proteínas receptoras transmembrana. En la presente invención se describe la identificación y caracterización de nuevos polipéptidos transmembrana, designados en la presente invención como polipéptidos PRO4405.

Descripción resumida de la invención65 **PRO4405**

Se ha identificado un clon de ADNc (DNA84920-2614) que codifica un polipéptido nuevo, designado en la presente invención como "PRO4405".

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada tal y como se define en las reivindicaciones que comprende ADN que codifica un polipéptido PRO4405.

En un aspecto, el ácido nucleico aislado comprende ADN que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la figura 1 (SEC ID No: 3) o la secuencia de codificación de longitud completa de la misma.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido PRO4405 que comprende ADN que se hibrida al complemento del ácido nucleico entre aproximadamente los nucleótidos 181 y aproximadamente 1008, ambos inclusive, de la figura 1 (SEC ID No: 3), bajo unas condiciones de hibridación y lavado astringentes.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende ADN que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia con (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por el ADNc de la proteína humana en el Depósito de ATCC No. 203966 (DNA84920-2614) o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a). En una realización preferida, el ácido nucleico comprende un ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por el ADNc de la proteína humana en el Depósito de ATCC No. 203966 (DNA84920-2614).

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende (a) ADN que codifica un polipéptido que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de residuos de aminoácidos desde aproximadamente 35 hasta aproximadamente 310, ambos inclusive de la figura 2 (SEC ID No: 4), o el complemento del ADN de (a).

En un aspecto específico, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende ADN que codifica un polipéptido PRO4405, con o sin la secuencia señal N-terminal y/o la metionina de iniciación, y sus variantes solubles (es decir, dominio transmembrana eliminado o inactivado) o es complementario de dicha molécula de ácido nucleico codificante. El péptido señal se ha identificado con ciertas dudas como la extensión de aproximadamente el aminoácido de la posición 1 hasta aproximadamente el aminoácido de posición 34 en la secuencia de la figura 2 (SEC ID No: 4). El dominio transmembrana se ha identificado con ciertas dudas como la extensión de aproximadamente el aminoácido de la posición 58 hasta aproximadamente el aminoácido de posición 76 en la secuencia de aminoácidos de PRO4405 (figura 2, SEC ID No: 4) y puede ser un dominio transmembrana de tipo II.

En otra realización, tal y como se define en las reivindicaciones, la presente invención proporciona el polipéptido PRO4405 aislado codificado por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico aisladas definidas anteriormente en la presente invención.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona el polipéptido PRO4405 aislado de secuencia nativa, que en una realización, incluye una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 35 a 310 de la figura 2 (SEC ID No: 4).

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido PRO4405 aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia con la secuencia de residuos de aminoácidos 35 o aproximadamente 310, ambos inclusive de la figura 2 (SEC ID No: 4).

En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido PRO4405 aislado, que comprende la secuencia de residuos de aminoácidos 35 a aproximadamente 310, ambos inclusive de la figura 2 (SEC ID No: 4).

Realizaciones adicionales

En otras realizaciones de la presente invención, la presente invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención. También se proporcionan las células huésped que comprenden dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, *E. coli* o levaduras. También se proporciona un procedimiento para fabricar cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente y comprende el cultivo de células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y la recuperación del polipéptido deseado del cultivo celular.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona moléculas químicas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención fusionados a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos.

Los ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención fusionados a una secuencia de epítipo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo de cadena única.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos nucleicos de la figura 1 (SEC ID No: 3) o la secuencia de codificación de longitud completa de la misma.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a la molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con el ADNc de proteína humana depositado con la ATCC en ATCC 203966.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO que es transmembrana con dominio eliminado o transmembrana con dominio inactivado, o es complementario a dicha secuencia de nucleótidos codificante, donde el dominio o dominios transmembrana de dicho polipéptido se describen en la presente invención. Por lo tanto, se contemplan dominios extracelulares solubles de los polipéptidos PRO descritos en la presente invención.

En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido PRO aislado codificado por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos aisladas identificadas anteriormente en la presente invención.

En un cierto aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido PRO aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximada-

mente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con un polipéptido PRO que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un polipéptido PRO aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNc de proteína humana depositados con el ATCC tal y como se describe en la presente.

En un aspecto específico, la presente invención proporciona un polipéptido PRO aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o la metionina de inicio y es codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos tal y como se ha descrito en la presente invención. Los procedimientos para fabricar el mismo también se describen en la presente invención, donde dichos procedimientos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido PRO y la recuperación del polipéptido PRO del cultivo celular.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un polipéptido PRO aislado que es transmembrana con dominio eliminado o bien transmembrana con dominio inactivado. Los procesos para producir los mismos también se describen en la presente invención, donde dichos procesos comprenden en cultivo de una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante adecuada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido PRO y la recuperación del polipéptido PRO del cultivo celular.

Un uso de la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de agonistas o antagonistas a un polipéptido PRO que comprende poner en contacto el polipéptido PRO con una molécula candidata y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO. Preferiblemente, el polipéptido PRO es un polipéptido PRO nativo.

Una aplicación de la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende un polipéptido PRO combinado con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

Otra realización de la presente invención está dirigida a la utilización de un polipéptido PRO, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una condición que es sensible al polipéptido PRO.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 3) de ADNc de PRO4405 de secuencia nativa, en la que SEC ID No: 3 es un clon designado en la presente invención como “DNA84920-2614”.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID No: 4) derivada de la secuencia de codificación de SEC ID NO: 3 mostrada en la figura 1.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

Los términos “polipéptido PRO” y “PRO” tal y como se utilizan en la presente invención y cuando va seguido inmediatamente por una denominación numérica se refiere a varios polipéptidos, en los que la denominación completa (es decir, PRO/número) se refiere a secuencias de polipéptido específicas tal y como se describen en la presente invención. Los términos “polipéptido PRO/número” y “PRO/número” en los que el término “número” se proporciona como una designación numérica real, tal y como se utiliza en la presente, comprenden polipéptidos de secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que se definen posteriormente en la presente invención). Los polipéptidos PRO descritos en la presente invención pueden aislarse de una variedad de orígenes, tales como tipos de tejido humano o de otras orígenes, o prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos.

Un “polipéptido PRO de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido PRO derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos PRO de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido PRO de secuencia nativa” comprende específicamente formas secretadas o truncadas naturales del polipéptido PRO específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme (“spliced”) alternativas) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En varias realizaciones de la presente invención, los polipéptidos PRO de secuencia nativa descritos en la presente invención son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras que se acompañan. Los codones de inicio y detención se muestran en letra negrita y están subrayados en las figuras. Sin embargo, aunque el polipéptido descrito en las figuras acompañantes se muestra que empieza con residuos de metionina designados en la presente invención como posición 1 de los aminoácidos en las figuras, es concebible y posible que se puedan utilizar otros residuos de metionina situados en dirección 5' o dirección 3' desde la posición 1 de los aminoácidos en las figuras como el residuo de aminoácido de partida de los polipéptidos PRO.

El “dominio extracelular” o “ECD” del polipéptido PRO se refiere a una forma del polipéptido PRO que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmico. Normalmente, el ECD del polipéptido PRO tendrá menos de un 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplásmicos y preferiblemente, tendrá menos de un 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos PRO de la presente invención se identifica según el criterio utilizado habitualmente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana puede variar pero probablemente por no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio según se ha identificado inicialmente en la presente invención. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido PRO puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier parte del límite del dominio transmembrana/dominio extracelular tal y como se identifica en los Ejemplos o la descripción y la presente invención contempla dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica.

La localización aproximada de los “péptidos señal” de los diversos polipéptidos descritos en la presente invención se muestra en la descripción y/o las figuras que se acompañan. Sin embargo, hay que indicar que el extremo C-terminal de un péptido señal puede variar, pero probablemente por no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier parte del extremo C-terminal del péptido señal según se ha identificado inicialmente en la presente invención, donde el extremo C-terminal del péptido señal se puede identificar según el criterio utilizado habitualmente en la técnica para identificar ese tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen *et al.*, *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) y von Henje *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la división de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, dando lugar a más de una especie secretada. La presente invención también contempla estos polipéptidos maduros, en los que el péptido señal se divide en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier parte del extremo C-terminal del péptido señal según se ha identificado inicialmente en la presente invención, y los polinucleótidos que los codifican.

La “variante de polipéptido PRO” significa un polipéptido PRO activo tal y como se ha definido anteriormente o posteriormente que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido PRO que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Entre dichas variantes de polipéptido PRO se incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden, o se eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de

aminoácidos nativa de longitud completa. Habitualmente, una variante de polipéptido PRO tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente, una secuencia de polipéptido PRO que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Habitualmente, los polipéptidos variantes de PRO tienen por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del polipéptido PRO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de polipéptido PRO, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el 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 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizando este procedimiento, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada “Proteína de comparación”

a la secuencia de aminoácidos denominada “PRO”, en la que “PRO” representa la secuencia de aminoácidos de un hipotético polipéptido PRO de interés, “Proteína de comparación” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que se está comparando el polipéptido “PRO” de interés, y “X”, “Y” y “Z” representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos.

5 A menos que se afirme específicamente lo contrario, los valores en % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad en la secuencia de aminoácidos también se pueden obtener tal y como se describe a continuación mediante la utilización del 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. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento (“overlap span”) = 1, fracción de solapamiento (“overlap fraction”) = 0,125, umbral de palabra (“word threshold”) T = 11, y matriz de puntuación (“scoring matrix”) = BLOSUM 62. Cuando se utiliza WU-BLAST-2, el valor en % de identidad en la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido PRO nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara el polipéptido PRO de interés que puede ser un polipéptido variante PRO) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la afirmación “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de 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.

25 El porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos también se puede determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o bien se obtiene del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo, por ejemplo, no desenmascarado = sí, cadena = todos, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, e-valor de multipaso = 0,01, constante para multipaso = 25, caída para alineación con espacios final (“dropoff for final gapped alignment”) = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62.

35 En las situaciones en las que se utiliza NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

40
$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A.

El “polipéptido variante PRO” o “secuencia de ácidos nucleicos variante de PRO” significa una molécula de ácido nucleico que codifica una polipéptido PRO activo tal y como se define a continuación y que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Habitualmente, un polinucleótido variante PRO tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativa-

mente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

Normalmente, los polinucleótidos variantes PRO tienen por lo menos 30 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifica el PRO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de PRO de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se generan utilizando el 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 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos denominada “ADN de comparación” a la secuencia de ácidos nucleicos denominada “ADN de PRO”, en la que “ADN de PRO” representa una hipotética secuencia de ácidos nucleicos que codifica PRO de interés, “ADN de comparación” representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que se está comparando la molécula de ácido nucleico “ADN de PRO” de interés, y “N”, “L” y “V” representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos.

A menos que se afirme específicamente lo contrario, los valores en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se pueden obtener tal y como se describe a continuación mediante la utilización del 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. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento (“overlap span”) = 1, fracción de solapamiento (“overlap fraction”) = 0,125, umbral de palabra (“word threshold”) T = 11, y matriz de puntuación

(“scoring matrix”) = BLOSUM 62. Cuando se utiliza WU-BLAST-2, el valor en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se determina dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de secuencia nativa y la molécula de ácido nucleico de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés que puede ser un polipéptido variante PRO) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la afirmación “un molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a la secuencia de ácidos nucleicos de B”, la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácidos nucleicos B es la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés.

El porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se puede determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o bien se obtiene del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo, por ejemplo, no desenmascarado = sí, cadena = todos, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, e-valor de multipaso = 0,01, constante para multipaso = 25, caída para alineación con espacios final “(dropoff for final gapped alignment)” = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62.

En las situaciones en las que se utiliza NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

$$100 \text{ veces la fracción } W/Z$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C.

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes PRO son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido PRO activo y que es capaz de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado estrictas, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido PRO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Los polipéptidos variantes PRO pueden ser aquellos codificados por un polinucleótido variante PRO.

El término “positivos”, en el contexto de comparación de secuencias realizado tal y como se ha descrito anteriormente, incluye residuos en las secuencias comparadas que no son idénticos pero que tiene propiedades similares (por ejemplo, como resultado de sustituciones conservativas, ver Tabla 6 a continuación). Para los objetivos de la presente invención, el valor en % de positivos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos que indican un valor positivo entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada de la secuencia de polipéptido PRO nativa y la secuencia de aminoácidos de interés (es decir, la secuencia de aminoácidos contra la que se está comparando la secuencia de polipéptido PRO) según se determina en la matriz BLOSUM62 de WU-BLAST-2 entre (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO de interés.

A menos que se afirme específicamente lo contrario, los valores en % de positivos se calculan tal y como se ha descrito en el párrafo inmediatamente anterior. Sin embargo, en el contexto de las comparaciones de identidad en la secuencia de aminoácidos realizadas con ALIGN-2 y NCBI-BLAST-2 tal y como se ha descrito anteriormente, incluye residuos de aminoácidos en las secuencias comparadas que no son idénticas pero también aquellas que tienen propiedades similares. Los residuos de aminoácidos que identifican un valor positivo a un residuo de aminoácido de interés son aquellos que son idénticos al residuo de aminoácido de interés o son una sustitución preferida (tal y como se define en la Tabla 6 siguiente) del residuo de aminoácido de interés.

Para las comparaciones de las secuencias de aminoácidos que utilizan ALIGN-2 o NCBI-BLAST2, el valor en % de positivos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de positivos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

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

donde X es el número de residuos de aminoácidos que identifican un valor positivo tal y como se ha definido anteriormente por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 o NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de positivos de A a B no será igual al % de positivos de B a A.

El término “aislado” cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido PRO no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico “aislado” que codifica un polipéptido PRO u otro ácido nucleico “aislado” que codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica que codifica el polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan según la práctica convencional.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-PRO individuales (incluyendo agonista, antagonista, y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpo anti-PRO con especificidad poliepitópica, anticuerpos anti-PRO de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-PRO (ver a continuación). El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

La “astringencia” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones astringentes” o “condiciones de astringencia elevada”, tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquellas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma

de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de astringencia elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

5 Las “condiciones moderadamente astringentes” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluye la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato
10 sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

15 El término “epítipo etiquetado” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido PRO fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo frente al que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con
20 otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “inmunoadhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo
25 que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (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 otra a parte del reconocimiento y sitio de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina habitualmente es una secuencia de aminoácidos contigua
30 que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

“Activo” o “actividad” para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de un polipéptido
35 PRO que retiene una actividad biológica y/o inmunológica de PRO nativo o natural, donde actividad “biológica” se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) provocada por un PRO nativo o natural que es otra a parte de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un PRO nativo o natural y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un PRO nativo o natural.

40 El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido PRO nativo descrito en la presente invención. De forma similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido PRO nativo descrito en la presente invención. Entre las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas se incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o
45 variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos PRO nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, pequeñas moléculas orgánicas agonistas o antagonistas, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO puede comprender poner en contacto un polipéptido PRO con una molécula agonista o antagonista candidata y la medida de un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el
50 polipéptido PRO.

“Tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la condición o trastorno patológico objetivo. Entre aquéllos que necesitan el tratamiento se incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno así como aquéllos que son propensos a padecer el
55 trastorno o aquéllos a los que se debe prevenir el trastorno.

La administración “crónica” se refiere a la administración del agente o agentes en un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo largo de tiempo. La administración “intermitente” es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es bastante cíclico en su naturaleza.
60

“Mamífero” para los objetivos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de deporte o de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.
65

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

Los “potadores”, tal y como se utiliza en la presente invención, incluyen portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que son no tóxicos para la célula o el mamífero expuestos a los mismos en las dosis y concentraciones utilizadas. Frecuentemente el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada en el pH. Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diabodies; anticuerpos lineales (Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticas, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un sitio único de unión a antígeno y un fragmento “Fc” residual, una nomenclatura que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno.

“Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDRs confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de una serie de residuos en el carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de invertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácido del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varios de éstos se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena única” o “sFv” comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término “diabodies” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido (V_H - V_L). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

Un anticuerpo “aislado” es el que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que podrían interferir con las utilidades de diagnóstico y terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta 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 copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado

ES 2 288 279 T3

incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

5 La palabra “marcador” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo “marcado”. El “marcador” puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

10 Por “fase sólida” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas que se engloban en la presente invención se incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliácridamidas, poliestireno, polivinilalcohol y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149.

Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido PRO o un anticuerpo para el mismo) a un mamífero. 20 Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

Una “molécula pequeña” se define en la presente invención que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

TABLA 1

```

30 /*
   *
   * C-C increased from 12 to 15
   * Z is average of EQ
   * B is average of ND
35 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
   */
#define _M -8 /* value of a match with a stop */

int _day[26][26] = {
40 /* 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 */
/* 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},
/* 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},
45 /* 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},
/* 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, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
50 /* 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},
/* 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, _M, 0, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
55 /* 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},
/* 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},
60 /* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 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},
/* 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, 0, _M, 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},
65 /* 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}
};

```

```

/*
*/
#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 */
#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 */
#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 */

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 */

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 */
};

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) */
};

char             *ofile;      /* output file name */
char             *namex[2];   /* seq names: getseqs() */
char             *prog;       /* prog name for err msgs */
char             *seqx[2];    /* seqs: getseqs() */
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 */
int              len0, len1;   /* seq lens */
int              ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int              smax;        /* max score: nw() */
int              *xbm;        /* bitmap for matching */
long             offset;      /* current offset in jmp file */
struct diag      *dx;         /* holds diagonals */
struct path      pp[2];       /* holds path for seqs */

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

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: prog 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)                                main
{
    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 jumps */
    readjumps();                            /* get the actual jumps */
    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 diag", 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 Biol 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

...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
10         mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
        * favor new del over ongoing del
        * ignore MAXGAP if weighing endgaps
        */
15         if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
            if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                ndely[yy] = 1;
            } 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
            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;
            } else {
                delx -= ins1;
                ndelx++;
            }
        } else {
45         if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
        }

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

```

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 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
10    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
15        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
20 }
else {
    coll[yy] = dely(yy);
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely(yy) >= MAXJMP
25    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
30        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely(yy);
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely(yy);
35 }
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
40    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
50 }
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
55 (void) free((char *)coll);
}

```

```

/*
 *
 * print() - only routine visible outside this module
 *
 * 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()
 * numbs() - put out a number line: dumpblock()
 * 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
 */

#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 */

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

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        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);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        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);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

```

/*
 * 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        out[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",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);

```

```

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

10     fprintf(fx, ". gaps in second sequence: %d", gapy);
      if (gapy) {
          (void) sprintf(outr, "(%d %s%s)",
              ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
          fprintf(fx, "%s", outr);
      }
15     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",
25         lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
    else
        fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n");
}

30 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 */
35 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() */
40
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
45 pr_align()
{
    int      na;          /* char count */
    int      more;
    register i;

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

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

60     }

65

```

...getmat

pr_align

...pr_align

```

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

        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
            */
            *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] + 1];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i] + 1];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (i + nm == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

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

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

```

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
numb(ix)
25     int    ix;    /* index in out[] holding seq line */
{
    char      nline[P_LINE];
    register  i, j;
    register char *pn, *px, *py;

30     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);
}

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

```

nums

putline

...putline

```

int          i;
register char *px;

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

/* these count from 1:
10     * 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);
15     (void) putc('\n', fx);
  }

```

```

/*
20     * put a line of stars (scqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
     */
static

```

stars

```

stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

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

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
35             if (xbm["p0-'A'"] && xbm["p1-'A'"]) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day["p0-'A'"]["p1-'A'"] > 0)
                cx = '.';
40             else
                cx = ' ';

        }
        else
            cx = ' ';
            *px++ = cx;
45     }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

```

50     /*
     * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
     */
static

```

stripname

```

stripname(pn)
55     char      *pn;      /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

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

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

```

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * 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"
#include <sys/file.h>

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

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

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

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

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = nargc = 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'

```

cleanup

getseq

...getseq

```

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

      while (fgetc(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)                                g_alloc
    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) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
35         }
    }
    return(px);
}

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

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
50         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].jmp, i >= 0 && dx[dmax].p.x[j] >= xx, j--)

```

...readjumps

```

    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[umax].offset));
        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
    }
    else
        break;
}
if (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
if (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    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 */
        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 */
        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;
}
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;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): now()
 */
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 2

25	PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
30	Proteína de comparación	XXXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO) =

5 dividido por 15 = 33,3%

TABLA 3

50	PRO	XXXXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
55	Proteína de comparación	XXXXXXYYYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO) =

5 dividido por 10 = 50%

TABLA 4

PRO-ADN NNNNNNNNNNNNNN (Longitud = 14
nucleótidos)

ADN de NNNNNNLLLLLLLLLL (Longitud = 16
comparación nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =
(el número de nucleótidos que se emparejan de forma
idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos
según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el
número total de nucleótidos de la secuencia de ácido
nucleico PRO-ADN) =
6 dividido por 14 = 42,9%

TABLA 5

PRO-ADN NNNNNNNNNNNN (Longitud = 12
nucleótidos)

ADN de NNNNLLLTVV (Longitud = 9
comparación nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =
(el número de nucleótidos que se emparejan de forma
idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos
según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el
número total de nucleótidos de la secuencia de ácido
nucleico PRO-ADN) = 4 dividido por 12 = 33,3%

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Polipéptidos PRO de longitud completa

La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos a las que se hace referencia en la presente invención como polipéptidos PRO. En particular, se han identificado y aislado los ADNc que codifican varios polipéptidos PRO, tal y como se describe con mayor detalle en los posteriores ejemplos. Cabe indicar que las proteínas fabricadas en ciclos de expresión diferentes pueden ser números PRO diferentes determinados, pero el número UNQ es único para cualquier ADN determinado y la proteína codificada, y no cambiará. Sin embargo, por simplicidad, en el presente documento la proteína codificada por las moléculas de ácido nucleico nativo de longitud completa descritas en la presente invención así como todos los homólogos nativos adicionales y variantes incluidas en la definición anterior de PRO, se referirán como "PRO/número", independientemente de su origen o modo de preparación.

Tal y como se describe en los Ejemplos posteriores, se han depositado varias clases de ADNc con el ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de dichos clones se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia mediante la secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos rutinarios en la técnica. Para los polipéptidos PRO y los ácidos nucleicos codificantes descritos en la presente, los solicitantes han identificado lo que se cree que es el mejor marco de lectura identificable con la información de la secuencia disponible en el momento.

Polipéptidos PRO4405 de longitud completa

Según se conoce hasta la fecha, la secuencia DNA84920-2614 codifica un factor nuevo designado en la presente invención como PRO4405; utilizando los programas informáticos de alineación de secuencias WU-BLAST-2, se revelaron identidades de secuencia limitadas a proteínas conocidas.

B. Variantes del polipéptido PRO

Además de los polipéptidos PRO de secuencia nativa de longitud completa descritos en la presente, se contempla que se pueden preparar variantes de PRO. Las variantes de PRO se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de PRO, y/o mediante la síntesis del polipéptido PRO deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del PRO, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la membrana.

Las variaciones en el PRO de secuencia nativa de longitud completa o en varios dominios del PRO descritos en la presente, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente USA 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones que codifican el PRO que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del PRO en comparación con el PRO de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del PRO. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del PRO con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizadas en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de forma sistemática y probando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

En la presente invención se proporcionan fragmentos de polipéptido PRO. Dichos fragmentos se pueden truncar en el extremo N-terminal o C-terminal, o puede carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO.

Los fragmentos de PRO se pueden preparar mediante cualquiera del grupo de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de PRO mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Aún otra técnica implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores del extremo 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de polipéptido PRO comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO nativo descrito en la presente.

En realizaciones particulares, las sustituciones particulares de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones de ejemplo en la Tabla 6, o tal y como se describen posteriormente en referencia a las clases de aminoácidos, y se criban los productos.

TABLA 6

	Residuo original	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
5	Ala (A)	val; leu; ile	val
	Arg (R)	lys; gln; asn	lys
10	Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
	Asp (D)	Glu	glu
	Cys (C)	Ser	ser
15	Gln (Q)	Asn	asn
	Glu (E)	Asp	asp
20	Gly (G)	pro; ala	ala
	His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
	Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu
25		norleucina	
	Leu (L)	norleucina; ile; val; met;	ile
		ala; phe	
30	Lys (K)	arg; gln; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
	Phe (F)	leu; val; ile, ala; tyr	leu
35	Pro (P)	Ala	ala
	Ser (S)	Thr	thr
40	Thr (T)	Ser	ser
	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
45	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala;	Leu
		norleucina	

50 Las modificaciones sustanciales en la identidad funcional o inmunológica del polipéptido PRO se llevan a cabo mediante la selección de las sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el conjunto de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- 55 (1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr;
- 60 (3) ácida: asp, glu;
- (4) básica: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- 65 (6) aromática: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas comprenderá el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

5 Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para fabricar el ADN variante de PRO se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids. Res.*, 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells *et al.*, *Gene*, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

15 El análisis de aminoácido por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido entre este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena lateral de la variante [Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

C. Modificaciones de PRO

25 Las modificaciones covalentes de PRO están incluidas en el alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un polipéptido PRO con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del PRO. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular PRO con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, 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.

35 Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las 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)], acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

40 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en PRO de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el PRO de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

50 La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina al PRO de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos de PRO puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

60 Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido PRO es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259-306 (1981).

65 La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido PRO se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de deglicosilación químicas son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et al. Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge, *et al. Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato del polipéptido se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describen Thotakura *et al. Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de PRO comprende la unión del polipéptido PRO a uno del conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxiálquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

- 5 El PRO de la presente invención también se puede modificar de manera que forma una molécula quimérica que comprende PRO fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del PRO con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo- etiqueta se sitúa generalmente en el extremo terminal amino o carboxilo del PRO. La presencia de dichas formas epítipo etiquetadas del PRO se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el PRO se purifique fácilmente mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan *et al.*, *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex 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 péptido epítipo KT3 [Martin *et al.*, *Science*, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de α -rubulina [Skinner *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser a una región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido PRO en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de USA No. 5.428.130 publicada el 27 de junio de 1995.

D. Preparación de PRO

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de PRO mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de PRO. Naturalmente, se prevé que se pueden utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar PRO. Por ejemplo, la secuencia de PRO, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewan *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* se pueden realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes del PRO de forma separada y combinar utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir PRO de longitud completa.

1. Aislamiento del ADN que codifica PRO

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

Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para PRO u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica PRO es utilizar la metodología de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una librería de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficiente inequívoca que se minimizan los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ³²P, biotilación o 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 dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear a otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en los bancos de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otros bancos de datos de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen en la presente.

El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción de PRO y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un técnico en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos por el técnico en la materia, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento de calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en la levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown *et al.*, *Methods in enzymology*, 185:527-537 (1990) y Manssur *et al.*, *Nature*, 336. 348-352 (1988).

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* Ka12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Envinia*, *Klebsiella*, *Proreus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes, la Cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa huésped para fermentaciones de producto de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan'*; la cepa de *E. coli* W3110 37D6 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan'*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de estados unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican PRO. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt *et al.* *J. Bacterial.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al.*, *Bio/Technology*, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris*

(EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, *J. Basic. Microbiol.* 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma recai* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes
 5 *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* (Nelly y Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilótropas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionado del género que consiste en *Hansenula*,
 10 *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares huéspedes de mamíferos útiles se incluyen células
 15 de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO. Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de
 20 hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL151). La selección de la célula huésped apropiada se estima que está dentro de la técnica.

3. Selección y utilización de un vector replicable

25 El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica PRO se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los
 30 componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un técnico en la materia.

35 El PRO se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el PRO que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilina-
 40 Ipp o enterotoxinaII estable térmicamente líderes. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la invertasa de levadura líder, el factor alfa líder (incluyendo α -factor *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* líderes, el último descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o fosfatasa ácida líder, la *C. Albicans* glucoamilasa líder (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar
 45 para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como líderes virales secretores.

Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en uno o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, polio, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

55 Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrezato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

60 Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica PRO, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman *et al.*, *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper
 65 *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 clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica PRO para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales son conocidos. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang *et al.*, *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al.*, *Nature*, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 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 utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica PRO.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess *et al.*, *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], tal 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 levaduras, que son promotores inducibles que tiene la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657.

La transcripción de PRO desde vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el PRO por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias de potenciador se conocen actualmente de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de PRO, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN's o ADN's eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica PRO.

En Gething *et al.*, *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei *et al.*, *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de PRO en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

4. Detección de la amplificación/expresión de los genes

La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de AND), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basadas en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de manera que tras la formación del dúplex en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos al dúplex.

La expresión génica, alternativamente, se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de ejemplo pueden ser monoclonales o policlonales, y se puede preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido PRO 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 PRO que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

5. Purificación de polipéptido

Las formas de PRO se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisatos de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión de PRO se pueden interrumpir mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclo congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica, o agentes para lisar células.

Se puede desear purificar PRO a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefrosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo del PRO. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteína y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el PRO concreto producido.

E. Usos para PRO

Las secuencias de nucleótidos (o sus complementarias) que codifican PRO tiene varias aplicaciones en la disciplina de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en el mapeo de cromosomas y genes y en la generación de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico de PRO también será útil para la preparación de polipéptidos PRO mediante las técnicas recombinantes descritas en la presente invención.

El gen de PRO de secuencia nativa de longitud completa, o partes del mismo, se pueden utilizar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de PRO de longitud completa o para aislar incluso otros ADNcs (por ejemplo, aquéllos que codifican variantes naturales de PRO o PRO de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada a la secuencia de PRO nativa descrita en la presente. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación se pueden derivar de por lo menos regiones parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa en la que dichas regiones se pueden determinar sin una experimentación excesiva o de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de PRO de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen de PRO utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación se pueden marcar con una serie de marcadores, incluyendo radionucleótidos, tales como ³²P o ³⁵S, marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de los sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen de PRO de la presente invención se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar a qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen con mayor detalle en los siguientes Ejemplos.

Cualquier secuencia EST descrita en la presente solicitud se puede utilizar de forma similar como sondas, utilizando los procedimientos descritos en la presente invención.

Entre otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de PRO se incluyen oligonucleótidos antisentido y sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico de cadena única (ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm de PRO diana (sentido) o ADN de PRO (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido, según la presente invención, comprende un fragmento de la región codificante de ADN de PRO. Dicho fragmento comprende generalmente por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basado en una secuencia de ADN c que codifica una proteína determinada se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (*Cancer Res.*, 48:2659, 1988) y van der Krol *et al.* (*BioTechniques* 6:958, 1988).

La unión de oligonucleótidos sentido y antisentido a secuencias de ácidos nucleico diana da lugar a la formación de dúplex que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno de los diferentes medios, que incluyen la degradación aumentada de los dúplex, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o mediante cualquier otro medio. De este modo, los oligonucleótidos antisentido se puede utilizar para bloquear la expresión de proteínas PRO. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones a azúcares, tales como las descritas en WO 91/06629) y en los que dichas unión a azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones a azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero que mantienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

Entre otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido se incluyen aquellos nucleótidos que están unidos covalentemente a grupos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros grupos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácidos nucleicos diana, tal como poli-(L-lisina). Además, los agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos se pueden unir a oligonucleótidos sentido

o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido para la secuencia de nucleótidos diana.

Los oligonucleótidos sentido o antisentido se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante cualquier procedimiento de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, CaPO_4 mediada por la transfección de ADN, electroporación, o mediante la utilización de vectores de transferencia de genes, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido antisentido o sentido se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, *in vivo* o *ex vivo*. Entre los vectores retrovirales adecuados se incluyen, pero no se limitan a, los derivados de retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de copia doble designados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

Los oligonucleótidos sentido o antisentido también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión ligando, tal y como se describe en WO 91/04753. Las moléculas de unión ligandos se incluyen, pero no se limitan a, receptores de la superficie de las células, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie de las células. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión ligando para unirse a su correspondiente molécula o receptor, ni bloquea la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

Alternativamente, un oligonucleótido sentido o antisentido se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal y como se describe en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia preferiblemente en el interior de la célula mediante una lipasa endógena.

Las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido son generalmente por lo menos aproximadamente 5 bases de longitud, aproximadamente 10 bases de longitud, aproximadamente 15 bases de longitud, aproximadamente 20 bases de longitud, aproximadamente 25 bases de longitud, aproximadamente 30 bases de longitud, aproximadamente 35 bases de longitud, aproximadamente 40 bases de longitud, aproximadamente 45 bases de longitud, aproximadamente 50 bases de longitud, aproximadamente 55 bases de longitud, aproximadamente 60 bases de longitud, aproximadamente 65 bases de longitud, aproximadamente 70 bases de longitud, aproximadamente 75 bases de longitud, aproximadamente 80 bases de longitud, aproximadamente 85 bases de longitud, aproximadamente 90 bases de longitud, aproximadamente 95 bases de longitud, aproximadamente 100 bases de longitud, o más.

Las sondas también se pueden utilizar en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para la identificación de secuencias de codificación de PRO estrechamente relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un PRO también se puede utilizar para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica el PRO y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden mapear a un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de unión contra marcadores cromosómicos conocidos, y el cribado de hibridación con bibliotecas.

Cuando las secuencias codificantes de PRO codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el PRO es un receptor), el PRO se puede utilizar en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos procedimientos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión también se pueden utilizar para cribar inhibidores o agonistas de péptidos o moléculas pequeñas de la interacción de unión. Además, el receptor PRO se puede utilizar para aislar el ligando o ligando correlativos. Los ensayos de cribado se pueden diseñar para encontrar compuestos candidatos que imitan la actividad biológica de un PRO nativo o un receptor para PRO. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribar con un alto rendimiento bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar pequeñas moléculas como fármacos candidatos. Entre las pequeñas moléculas contempladas se incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican PRO o sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual se introdujo en el animal o en un antecesor del animal en estado prenatal, por ejemplo, una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADN que codifica PRO se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica PRO según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica PRO. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, se marcarían células concretas para la incorporación del transgén de PRO con potenciadores específicos de tejido. Se pueden utilizar animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica PRO introducido en la línea germinal del animal en

una etapa embrionaria, para examinar el efecto de la expresión aumentada de ADN que codifica PRO. Dichos animales se pueden utilizar como animales de prueba para reactivos pensados para conferir protección de, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. Según este aspecto de la invención, el tratamiento de un animal con el reactivo y la reducción de la incidencia de la condición patológica, en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial en la condición patológica.

Alternativamente, se pueden utilizar los homólogos no humanos de PRO para construir un animal “knock out” con PRO que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica PRO como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica PRO y el ADN genómico alterado que codifica PRO introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica PRO se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica PRO según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica PRO se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madres embrionarias (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en *Teralocarcinomas y Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152]. A continuación, un embrión quimérico se puede implantar en un animal criado hembra pseudoembarazada adecuado y el embrión producido para crear un animal “knock out”. La progenie que esconde el ADN recombinado homológamente en las células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y utilizada para criar animales en los que todas las células de los mismos contienen el ADN recombinado homológamente. Los animales knock out se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido PRO.

El ácido nucleico que codifica los polipéptidos PRO también se pueden utilizar en terapia génica. En aplicaciones de terapias génicas, los genes se introducen en células para conseguir síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. La “terapia génica” incluye tanto la terapia génica convencional en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una vez o repetitiva de un ADN o ARN terapéuticamente eficaz. Se pueden utilizar los ADNs y ARNs antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. También se ha observado que los oligonucleótidos antisentido cortos se pueden importar en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su captación limitada por la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos diéster cargados negativamente por grupos no cargados.

Existe una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped deseado. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen la utilización de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico, etc. Entre las técnicas de transferencia génica *in vivo* preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (habitualmente retrovirales) y la transfección mediada por liposoma-proteínas de cubierta viral (Dzau *et al.*, *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácidos nucleicos con un agente que marca las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie de la célula o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie de la célula asociada con endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, proteínas que dirigen la localización intracelular y el aumento de la vida media intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por receptor se describe en, por ejemplo, Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987); y Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica, véase Anderson *et al.*, *Science* 256, 808-813 (1992).

Los polipéptidos PRO descritos en la presente invención también se pueden utilizar como marcadores del peso molecular para en electroforesis de proteínas y las secuencias de ácido nucleico aisladas se pueden utilizar para expresar recombinantemente dichos marcadores.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos PRO o fragmentos de los mismos descritas en la presente invención son útiles para la identificación de cromosomas. En este aspecto, existe una necesidad actual para identificar nuevos marcadores de cromosomas, ya que actualmente hay disponibles relativamente pocos reactivos marcadores de cromosomas, en base a los datos de secuencias disponibles. Cada molécula de ácido nucleico de PRO de la presente invención se puede utilizar como marcador de cromosomas.

Los polipéptidos PRO y las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también se pueden utilizar para la caracterización de tejidos, en la que los polipéptidos de la presente invención se pueden expresar diferencialmente en un tejido en comparación con otro. Las moléculas de ácido nucleico de PRO se utilizarán para generar sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

Los polipéptidos PRO descritos en la presente invención también se pueden utilizar como agentes terapéuticos. Los polipéptidos PRO de la presente invención se pueden formular según los procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, a través de los cuales el producto PRO de los mismos se combina en una mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla del principio activo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los destinatarios a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o PEG.

Las formulaciones a utilizar para la administración *in vitro* debe ser estéril. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles, previamente a o posterior a la liofilización y reconstitución.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención generalmente se colocan en un recipiente que tiene un recipiente de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica.

La ruta de administración está de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo, la inyección o infusión mediante las rutas intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica, o mediante sistemas de liberación controlada.

Las dosis y concentraciones del fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo de la utilización particular prevista. La determinación de la dosis o la ruta de administración apropiadas están dentro del conocimiento de un médico habitual. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de dosis eficaces para la terapia humana. El escalado entre especies de dosis eficaces se puede llevar 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.*, Eds., Pergamon Press, Nueva York, 1989, páginas 42-96.

Cuando se utiliza la administración *in vivo* de un polipéptido PRO o agonista o antagonista del mismo, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de masa corporal de mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente 1 µg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. Las guías de las dosis concretas y los procedimientos de liberación se proporcionan en la literatura; véase, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración que se dirige a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la liberación de una manera diferente a la de otro órgano o tejido.

Cuando se desea la administración por liberación controlada de un polipéptido PRO en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiere la administración del polipéptido PRO, se contempla la microencapsulación del polipéptido PRO. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación controlada se ha realizado satisfactoriamente con la hormona del crecimiento humano (rhGH), interferón- (rhIFN-), interleuquina-2, y MN rgp 120. Jonson *et al.*, *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere Systems", en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell y Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), páginas 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y Patente U.S. No. 5.654.010.

Las formulaciones de liberación controlada de estas proteínas se desarrollaron utilizando polímero de ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplio rango de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico se puede aclarar rápidamente en el interior del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar de meses a años dependiendo de su peso molecular y la composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en: M. Chasin y R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), páginas 1-41.

La presente invención comprende procedimientos de cribado de compuestos para identificar aquéllos que imitan el polipéptido PRO (agonistas) o prevenir el efecto del polipéptido PRO (antagonistas). Los ensayos de cribado para candidatos de fármacos agonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o complejan con los polipéptidos PRO codificados por los genes identificados en la presente invención, o bien interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribar con un alto rendimiento bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar pequeñas moléculas como fármacos candidatos.

Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos para antagonistas son comunes en que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido PRO codificado por un ácido nucleico identificado en la presente bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido PRO codificado por el gen identificado en la presente invención o el fármaco candidato se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo, una placa de microtítulos, mediante enlaces covalentes o no covalentes. La unión covalente se realiza generalmente mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido PRO y el secado. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido PRO a inmovilizar, para anclarlo a la superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, que se puede detectar mediante una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se extraen los componentes no reaccionados, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados a la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta una marca detectable, la detección de la marca inmovilizada en la superficie indica que tuvo lugar la complejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta una marca, se puede detectar la complejación, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interacciona con, pero no se une a un polipéptido PRO particular codificado por un gen identificado en la presente invención, su interacción con ese polipéptido se pueden ensayar mediante procedimiento conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, coimmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorizar mediante la utilización de sistemas genéticos basados en levaduras descritos 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)). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno actuando como el dominio de unión a ADN, el otro actuando como el dominio de transcripción-activación. El sistema de expresión en las levaduras descrito en las publicaciones anteriores (referidas generalmente como “el sistema de dos híbridos”) saca ventaja de esta propiedad e utiliza dos proteínas híbridas, una en la que se fusiona la proteína diana al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al 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 a través de la interacción de proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromatogénico para β -galactosidasa. En Clontech se encuentra disponible comercialmente un equipo completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Este sistema también se puede extender para mapear dominios de proteínas implicados en las interacciones de proteínas específicas así como para precisar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido PRO identificado en la presente y otros componentes intra- o extracelulares se puede ensayar tal y como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular bajo condiciones y durante un tiempo se permite la interacción e unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se desarrolla en la ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para usar como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal y como se describe anteriormente en la presente. La formación del complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

Para ensayar antagonistas, el polipéptido PRO se puede añadir a una célula junto con el compuesto a cribar para una actividad concreta y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido PRO indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO. Alternativamente, los antagonistas se pueden detectar mediante la combinación del polipéptido PRO y un antagonista potencial con los receptores de polipéptido PRO unido a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido PRO se puede marcar, tal como mediante radiactividad, de manera que el número de moléculas de polipéptidos PRO unidas al receptor se puede utilizar para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor se puede identificar mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, “panning” de ligando y clasificación de FACS. Coligan *et al.* *Current Protocols in Immun.*, 1(2): Capítulo 5 (1991). Preferiblemente, la clonación de la expresión se utiliza cuando el ARN poliadenilado se prepara a partir de una célula sensible al polipéptido PRO y se divide en grupos una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO. Las células transfectadas que se desarrollan sobre portamuestras de vidrio se exponen a polipéptido PRO marcado. El polipéptido PRO se puede marcar mediante una variedad de medios que incluyen la yodinación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Tras la fijación e incubación, los portamuestras se

someten a análisis autoradiográfico. Los grupos positivos se identifican y los sub-grupos se preparan y se retransfectan utilizando un proceso de subagrupación y recriado interactivos, obteniendo finalmente un único clon que codifica el receptor putativo.

Como enfoque alternativo para la identificación del receptor, el polipéptido PRO marcado se puede unir por fotoafinidad con la membrana celular o preparaciones de extracto que expresan la molécula receptora. El material reticulado se resuelve mediante PAGE y se expone a la película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor se puede escindir, resolver en fragmentos de péptidos, y someter a la microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamíferos o una preparación de membrana que expresa el receptor se incuban con polipéptido PRO marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto para aumentar o bloquear esta interacción.

Más ejemplos específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con polipéptido PRO, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos y las versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido PRO que reconoce el receptor pero no transmite el efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido PRO.

Otro antagonista de polipéptido PRO potencial es una construcción de ADN o ARN antisentido preparado utilizando tecnología antisentido, cuando, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN antisentido actúa para bloquear directamente la traducción del ARNm mediante la hibridación a ARNm marcado y evitando la traducción de la proteína. La tecnología antisentido se puede utilizar para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o ADN o ARN antisentido, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia del polinucleótido, que codifica los polipéptidos PRO maduros de la presente invención, se utiliza para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice - véase Lee *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science*, 241: 456 (1988); Dervan *et al.*, *Science*, 251: 1360 (1991)), evitando así la transcripción y la producción del polipéptido PRO. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida al ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido PRO (antisentido - Okano, *Neurochem.*, 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también se pueden liberar a las células, de manera que el ARN o ADN antisentido se pueden expresar *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido PRO. Cuando se utiliza ADN antisentido, se prefieren oligodesoxinucleótidos derivados del sitio, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Entre los antagonistas potenciales se incluyen pequeñas moléculas que se unen al sitio activo, el sitio de unión al receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de unión pertinente del polipéptido PRO, bloqueando de esta manera la actividad biológica normal del polipéptido PRO. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, preferiblemente péptidos solubles y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la división específica de ARN. Las ribozimas actúan mediante la hibridación específica de secuencia al ARN diana complementario, seguido de la división endonucleolítica. Los sitios de división específica de la ribozima en un ARN potencial diana se puede identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994) y publicación de PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción debería ser de cadena única y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de las bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que induce la formación de la triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases Hoogsteen, que generalmente requiere tramos considerables de purinas o pirimidinas en una cadena de un dúplex. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación de PCT No. WO 97/33551, *supra*.

Estas pequeñas moléculas se pueden identificar mediante uno o más de los ensayos de cribado descritos anteriormente en la presente invención y/o mediante cualquier otra técnica de cribado conocida para un experto en la materia.

Las utilidades de las moléculas descritas en la presente invención también pueden estar basadas en los éxitos de los ensayos funcionales positivos dados a conocer y descritos a continuación.

F. *Anticuerpos anti-PRO*

La presente invención proporciona además anticuerpos anti-PRO. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos anti-PRO pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido PRO o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida para que sea inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, pero no se limitan a hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes se pueden incluir el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin una gran experimentación.

2. *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos anti-PRO pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido PRO o una proteína de fusión de la misma. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o se utilizan células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, soportan un nivel de expresión elevado estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) páginas, 51-63].

A continuación, el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se pueden ensayar para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el PRO. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Poliard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar [Goding, *supra*]. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefariosa, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente U.S. No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la presente

invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la presente invención sirven como una fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede situar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de ningún modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias homólogas murinas [Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison *et al.*, *supra*] o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina. Dicho polipéptido de no inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la presente invención, o se pueden sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-PRO de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo destinatario) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del destinatario se sustituye por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo destinatario ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se indican frecuentemente como residuos "importados", que se adquieren de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de DCR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)]. De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece estrechamente a los observados en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reajuste de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *BioTechnology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368, 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51, (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995).

4. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferiblemente humano o humanizado, anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por el PRO, el otro es por cualquier otro antígeno, y preferiblemente por una proteína o receptor o subunidad del receptor de la superficie celular.

Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Millstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En WO 93/08829, publicada el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, CH2, y regiones CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Para mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

Según otro enfoque descrito en WO 96/27011, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte de la región de CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño similar o idéntico a la cadena o cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar utilizando uniones químicas. Brennan *et al.*, *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se dividen proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de nitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierten al Fab' -tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar en anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado $F(ab')_2$. Cada fragmento de Fab' se secretó de forma separada de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Dicho anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y las células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra tumores de mama humana dianas.

Se han descrito varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diabody" descrito por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv).

Sec. Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152:5368 (1994). Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tun *et al.*, *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítomos diferentes en un polipéptido PRO determinado de la presente invención. Alternativamente, un brazo de polipéptido anti-PRO se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptor de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el polipéptido PRO particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para confinar agentes citotóxicos a células que expresan un polipéptido PRO particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a PRO y un brazo que se une a un agente citotóxico o un radionúcleo quelante, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido PRO y además se une al factor tisular (TF).

5. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente U.S. No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/300373; EP 03089]. Se considera que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 4.676.980.

6. Diseño de la función efectora

Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención con respecto a la función efectora con el fin de aumentar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el residuo o residuos de cisternas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron *et al.*, *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada también se pueden preparar utilizando reticuladores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf *et al. Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo se puede diseñar para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis complementaria y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson *et al.*, *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989).

7. Inmunoconjugados

La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, radioconjugados).

Los agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados se ha descrito anteriormente. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de saponaria officinalis, gelonina, mitogelina, resrrietocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Hay una conjunto de radionúcleos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos son ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridiliditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoi)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuesto de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta *et al.*, *Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietil triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionúcleos al anticuerpo. Ver WO94/11026.

En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el premarcado de tumores en los que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de conjugado no enlazado de la circulación utilizando un agente clarificador y, a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionúcleo).

8. Inmunoliposomas

Los anticuerpos descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); y las Patentes U.S. Nos. 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con un mayor tiempo de circulación se describen en la Patente U.S. No. 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar a los liposomas tal y como se describen en Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante la reacción de intercambio de enlaces disulfuro. Opcionalmente, el liposoma contiene un agente quimioterapéutico (tal como Doxorubicina). Véase Gabizon *et al.*, *J. Nacional Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

9. Composiciones farmacéuticas de anticuerpos

Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido PRO identificado en la presente invención, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos anteriormente en la presente invención, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos en forma de composiciones farmacéuticas.

Si el polipéptido PRO es intracelular y los anticuerpos completos se utilizan como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, las lipofecciones o liposomas se pueden utilizar también para liberar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, las moléculas de péptidos se pueden diseñar de manera que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993). La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad particular en tratamiento, preferiblemente aquéllas con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citoquina, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo deseado.

Los principios activos también se pueden introducir en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización por interfase, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, *supra*.

Las formulaciones a utilizar en la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre algunos ejemplos de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol), poliláctidos (Patente U.S. No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico no degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permite la liberación de moléculas durante aproximadamente 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias razonables para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización apropiada de aditivos, y el desarrollo de composiciones de matrices de polímero específicas.

G. Utilizaciones de anticuerpos anti-PRO

Los anticuerpos anti-PRO de la presente invención tienen varias utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PRO se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico para PRO, por ejemplo, detectando su expresión en células, tejidos específicos o suero. Se pueden utilizar varias técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la técnica, tales como ensayos

de unión competitiva, ensayos de sándwich directo o indirecto y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas [Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987) páginas 147-158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico se pueden marcar con un grupo detectable. El grupo detectable debería ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como alcalina fosfatasa, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Se puede utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al grupo detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter *et al.*, *Nature*, 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry*, 13: 1014 (1974); Pain *et al.*, *J. Immunol. Meth.*, 40: 219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30: 407 (1982).

Los anticuerpos anti-PRO también son útiles para la purificación por afinidad de PRO de un cultivo de células recombinantes o de origen natural. En este proceso, los anticuerpos contra PRO se inmovilizan sobre un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el PRO a purificar, y posteriormente se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra a excepción del PRO, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el PRO del anticuerpo.

Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con objetivos ilustrativos, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

Todas las referencias de patente y de la literatura citadas en el presente documento se incorporan en la presente invención por referencia en su totalidad.

Ejemplos

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos de que se indique lo contrario. El origen de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo del documento, por los números de acceso de la ATCC pertenece a la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Ejemplo 1

Cribado de la homología del dominio extracelular para la identificación de polipéptidos nuevos y el ADNc codificante correspondiente

Las secuencias del dominio extracelular (ECD) (incluyendo la secuencia señal de secreción, si la hay) de aproximadamente 950 proteínas de secreción conocidas de la base de datos pública Swiss-Prot se utilizaron para buscar bases de datos EST. Las bases de datos EST incluían bases de datos públicas (por ejemplo, Dayhoff, Banco de Genes), y bases de datos privadas (por ejemplo LIFESEQTM, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó mediante la utilización del programa informático BLAST o BLAST-2 (Altschul *et al.*, *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)) como una comparación entre las secuencias ECD de las proteínas y la traducción de seis fragmentos de las secuencias EST. Las comparaciones con un marcador BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o superior que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y ensamblaron en secuencias de ADN de consenso con el programa "phrap" (Phil Green, Universidad de Washington, Seattle, WA).

Utilizando este cribado de homología del dominio extracelular, las secuencias de ADN de consenso se ensamblaron en relación a las otras secuencias identificadas de EST utilizando phrap. Además, las secuencias de ADN de consenso obtenidas se ampliaron frecuentemente (pero no siempre) utilizando ciclos repetidos de BLAST o BLAST-2 y phrap para ampliar la secuencia de consenso tanto como fuera posible utilizando los orígenes de secuencias EST anteriormente explicadas.

En base a las secuencias de consenso obtenidas tal y como se ha explicado anteriormente, a continuación los oligonucleótidos se sintetizaron y utilizaron para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contuviese la secuencia de interés y para utilizarlos como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa de un polipéptido PRO. Los cebadores de PCR directos e inversos generalmente oscilan entre 20 y 30 nucleótidos y frecuentemente están diseñados para producir un producto de PCR de aproximadamente 100-1000 pares de bases de longitud. Las secuencias de la sonda tienen habitualmente una longitud de 40-55 pares de bases. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia de consenso es mayor de 1-1,5 kpb. Con el fin de cribar diversas bibliotecas para un clon de longitud completa, el ADN de las bibliotecas se cribó mediante amplificación de PCR, como por Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, con la pareja del cebador de PCR. A continuación se utilizó una biblioteca positiva para aislar clones que codificaran el gen de interés utilizando el oligonucleótido de la sonda y una de las parejas de cebadores.

Las bibliotecas de ADNc utilizadas para aislar clones de ADNc se construyeron mediante procedimientos convencionales utilizando reactivos disponibles comercialmente tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligo dT que contenía un sitio NoI, se unió por extremo romo a adaptadores con hemiquinasa de SalI, se

dividieron con NotI, se midió 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 de SfiI; véase, Homes *et. al.*, *Science*, 253:1278-1280 (1991)) en los sitios únicos de XhoI y NotI.

5 Ejemplo 2

Aislamiento de clones de ADNc mediante cribado con Amilasa

1. Preparación de la biblioteca de ADNc cebado con oligo dT

10 Se aisló ARNm de un tejido humano de interés utilizando reactivos y protocolos de Invitrogen, San Diego, CA (Fast Track 2). Este ARN se utilizó para generar una biblioteca de ADNc cebado con oligo dT en el vector pRK5D utilizando reactivos y protocolos de Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System). En este procedimiento, la doble cadena de ADNc se ajustó para que fuera mayor de 1000 pares de bases y el ADNc unido a SalI/NotI se clonó
15 en el vector dividido por XhoI/NotI. pRK5D es un vector de clonación que tiene un sitio de iniciación de la transcripción sp6 seguido de un sitio para enzima de restricción SfiI que precede a los sitios de clonación del ADNc de XhoI/NotI.

2. Preparación de la biblioteca de ADNc cebada aleatoria

20 Se generó una biblioteca de ADNc secundaria para representar preferentemente los extremos 5' de los clones de ADNc primario. El ARN de sp6 se generó a partir de la biblioteca primaria (descrita anteriormente), y este ARN se utilizó para generar una biblioteca de ADNc cebada aleatoria en el vector PSST-AMY.O utilizando reactivos y protocolos de Life Technologies (Super Script Plasmid System, mencionado anteriormente). En este procedimiento, el ADNc de cadena doble se ajustó a 500-1000 pares de bases, se unió por los extremos romos a adaptadores de NotI,
25 se dividió con SfiI, y se clonó en el vector dividido de SfiI/NotI. pSST-AMY.O es un vector de clonación que tiene un promotor de alcohol deshidrogenada de levadura que precede a los sitios de clonación del ADNc y la secuencia de la amilasa de ratón (la secuencia madura sin la señal de secreción) seguida por el fragmento finalizador de alcohol deshidrogenasa de levadura, después de los sitios de clonación. De esta manera, los ADNcs clonados en este vector que están fusionados en su marco con la secuencia de amilasa conducirán a la secreción de amilasa desde colonias de
30 levadura apropiadamente transfectadas.

3. Transformación y Detección

El ADN de la biblioteca descrito en el párrafo 2 anterior se enfrió sobre hielo al que se había añadido la bacteria
35 DH10B electrocompetente (Life Technologies, 20 ml). La mezcla de vector y bacteria se electroporó a continuación tal y como recomendaba el fabricante. Posteriormente, se añadió un medio SOC (Life Technologies, 1 ml) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. Los transformantes se colocaron en 20 placas LB estándar de 150 mm que contenían ampicilina y se incubaron durante 16 horas (37°C). Las colonias positivas fueron descartadas en las placas y el ADN se aisló del residuo bacteriano utilizando los protocolos convencionales, por ejemplo gradiente de CsCl. A
40 continuación, el ADN purificado continuó los protocolos de la levadura siguientes.

Los procedimientos de las levaduras se dividen en tres categorías: (1) Transformación de la levadura con el vector combinado plásmido/ADNc; (2) Detección y aislamiento de los clones de levadura que secretan amilasa; y (3) amplificación por PCR de la inserción directamente desde la colonia de levadura y la purificación del ADN para la
45 secuenciación y el análisis posterior.

La cepa de levadura utilizada fue la HD-56-5A (ATCC-90785). Esta cepa tiene el siguiente genotipo: MAT alfa, ura3-52, leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15, MAL⁻, SUC⁺, GAL⁺. Preferiblemente, se pueden utilizar levaduras mutantes que tienen mecanismos post-traduccionales deficientes. Dichos mutantes pueden tener alelos deficientes
50 de traslocación en *sec71*, *sec72*, *sec62*, siendo *sec71* truncado el más preferido. Alternativamente, se pueden utilizar preferiblemente los antagonistas (que incluyen nucleótidos antisentido y/o ligandos) que interfieren en el normal funcionamiento de estos genes, otras proteínas implicadas en este mecanismo posterior a la traducción (por ejemplo, SEC61p, SEC72p, SEC62p, SEC63p, TDJ1p o SSA 1p-4p) o la formación del complejo de estas proteínas en combinación con la levadura que expresa la amilasa.

55 La transformación se realizó basándose en el protocolo descrito por Gietz y otros, *Nucl. Acid. Res.*, 20: 1425 (1992). A continuación, las células transformadas se inocularon del agar en el caldo de cultivo de complejo YEPD (100 ml) y se desarrollaron durante toda la noche a 30°C. El caldo de cultivo YEPD se preparó tal y como se describe en Kaiser *et. al.*, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pág. 207 (1994). A continuación, el cultivo de toda la noche se diluyó hasta aproximadamente 2×10^6 células/ml (aprox. DO₆₀₀=0,1) en
60 caldo de cultivo YEPD nuevo (500 ml) y se redesarrolló hasta 1×10^7 células/ml (aprox. DO₆₀₀=0,4-0,5).

A continuación, las células se recogieron y prepararon para la transformación mediante la transferencia en botellas de rotación GS3 en un rotor Sorval GS3 a 5.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y, a continuación,
65 se resuspendieron en agua estéril, y se centrifugaron de nuevo en tubos falcon de 50 ml a 3.5000 rpm en una centrifuga Beckman GS-6KR. El sobrenadante se descartó y las células se lavaron posteriormente con LiAc/TE (10 ml, 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA pH 7,5, 100 mM de Li₂OOCCH₃), y se resuspendió en LiAc/TE (2,5 ml).

La transformación se realizó mezclando las células preparadas (100 μ l) con ADN de cadena única recientemente desnaturalizado de salmón de prueba (Lofstrand Labs, Gaithersburg, MD) y transformando el ADN (1 μ g, vol. < 10 μ l) en tubos de microfuga. La mezcla se mezcló brevemente por centrifugación, a continuación se le añadió PEG/TE al 40% (600 μ l, polietilenglicol-4000 al 40%, 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 100 mM de Li₂OOCCH₃, pH 7,5). Esta mezcla se mezcló suavemente y se incubó a 30°C mientras se agitaba durante 30 minutos. A continuación, las células fueron sometidas a un golpe de calor de 42°C durante 15 minutos, y el recipiente de reacción se centrifugó en un tubo de microfuga a 12.000 rpm durante 5-10 segundos, se decantó y se resuspendió en TE (500 μ l, 10 mM de TRis-HCl, 1 mM de EDTA pH 7,5) seguido de recentrifugación. A continuación, las células se diluyeron en TE (1 ml) y se extendieron alicuotas (200 μ l) en el medio selectivo previamente preparado en placas de crecimiento de 150 mm (VWR).

Alternativamente, en lugar de múltiples reacciones pequeñas, la transformación se realizó utilizando una reacción única a gran escala, en la que las cantidades de los reactivos se adaptaron a la escala.

El medio selectivo utilizado fue un agar de dextrosa completo sintético con ausencia de uracilo (SCD-Ura) preparado tal y como se describe en Kaiser *et. al.*, *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, pág. 208-210 (1994). Los transformantes se desarrollaron a 30°C durante 2-3 días.

La detección de colonias que secretan amilasa se realizó incluyendo almidón rojo en el medio de crecimiento selectivo. El almidón se acopló a colorante rojo (Reactive Red-120, Sigma) según el procedimiento descrito por Biely *et. al.*, *Anal. Biochem.* 172:176-179 (1988). El almidón acoplado se incorporó en las placas de agar SCD-Ura en una concentración final de 0,15% (p/v), y a continuación se tamponó con fosfato potásico hasta un pH de 7,0 (20-100 mM de concentración final).

Las colonias positivas se recogieron y se dispusieron en rayas en medio selectivo nuevo (en placas de 150 mm) con el fin de obtener colonias únicas bien aisladas e identificables. Las colonias únicas positivas bien aisladas para la secreción de amilasas se detectaron mediante la incorporación directa de almidón rojo en agar SCD-Ura tamponado. Las colonias positivas se determinaron por su habilidad para romper el almidón resultante en una clara aureola alrededor de la colonia positiva directamente visualizada.

4. Aislamiento de ADN mediante amplificación por PCR

Cuando se aisló una colonia positiva, una parte de la misma se recogió con un palillo y se diluyó en agua estéril (30 μ l) en una placa de 96 pocillos. En este punto, las colonias positivas se congelaron y guardaron para un posterior análisis o bien se amplificaron inmediatamente. Una alicuota de las células (5 μ l) se utilizó como plantilla para la reacción de PCR en un volumen de 25 μ l que contenía: 0,5 μ l de Klentaq (Clontech, Palo Alto, CA); 4,0 μ l 10 mM de dNTP's (Perkin Elmer-Cetus); 2,5 μ l de tampón Kentaq (Clontech); 0,25 μ l de oligo directo 1; 0,25 μ l de oligo inverso 2; 12,5 μ l de agua destilada. La secuencia del oligonucleótido directo 1 fue:

5'-TGTAACGACGGCCAGTTAAATAGACCTGCAATTATTAATCT-3' (SEC ID No: 1)

La secuencia de oligonucleótido inverso 2 fue:

5'-CAGGAAACAGCTATGACCACCTGCACACCTGCAAATCCATT-3' (SEC ID No: 2)

A continuación, se realizó la PCR de la siguiente manera:

a.	Desnaturalizar	92°C, 5 minutos
b. 3 ciclos de:	Desnaturalizar	92°C, 30 segundos
	Hibridar	59°C, 30 segundos
	Extender	72°C, 60 segundos
c. 3 ciclos de:	Desnaturalizar	92°C, 30 segundos
	Hibridar	57°C, 30 segundos
	Extender	72°C, 60 segundos

d. 25 ciclos de: Desnaturalizar 92°C, 30 segundos
 Hibridar 55°C, 30 segundos
 Extender 72°C, 60 segundos
 e. Mantener 4°C

Las regiones subrayadas de los oligonucleótidos se hibridaron a la región promotora ADH y la región de ainitasa, respectivamente, y se amplificaron una región de 307 pares de bases del vector pSST-AMY.0 cuando no presentaba inserción. Normalmente, los primeros 18 nucleótidos del extremo 5' de estos oligonucleótidos contenían sitios de hibridación para los cebadores de la secuenciación. De esta manera, el producto total de la reacción PCR desde un vector vacío fue de 343 pares de bases. Sin embargo, el ADNc fusionado a la secuencia señal dio lugar a secuencias de nucleótidos considerablemente más largas.

Seguidamente al PCR, se examinó una alícuota de la reacción (5 µl) mediante electroforesis en gel de agarosa con un 1% de gel de agarosa utilizando un sistema tamponador Tris-Borato-EDTA (TBE) tal y como describen Sambrook *et. al., supra*. Los clones que dieron lugar a un producto de PCR único y firme mayor de 400 pares de bases se analizaron adicionalmente mediante la secuenciación del ADN tras la purificación con una columna de limpieza de PCR Qiaquick 96 (Quiagen, Inc., Chatsworth, CA).

Ejemplo 3

Aislamiento de los clones del ADNc utilizando el análisis algorítmico de señal

Se identificaron diversas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos mediante la aplicación de un algoritmo patentado que halla una secuencia señal desarrollado por Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) sobre ESTs así como fragmentos de EST agrupados y ensamblados de las bases de datos públicas (por ejemplo, Banco de Genes) y/o privadas (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA). El algoritmo de la secuencia señal calcula una puntuación de la señal de secreción basada en el carácter de los nucleótidos del ADN que rodean al primer codón de metionina (ATG), y de manera opcional al segundo, en el extremo 5' de la secuencia o el fragmento de secuencia en consideración. Los nucleótidos que siguen al primer ATG deben codificar por lo menos 35 aminoácidos inequívocos sin ningún codón de parada. Si el primer ATG tiene los aminoácidos requeridos, el segundo no se examina. Si ninguno reúne los requisitos, la secuencia candidata no se contabiliza. Con el fin de determinar si la secuencia EST contiene una secuencia señal auténtica, el ADN y las correspondientes secuencias de aminoácidos que rodean el codón ATG son contabilizadas utilizando un dispositivo de siete sensores (parámetros de evaluación) que se sabe que se asocian con las señales de secreción. El uso de este algoritmo dio lugar a la identificación de numerosas secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos.

Ejemplo 4

Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO4405 humano

Una secuencia de ADN de consenso se ensambló en relación a otras secuencias EST utilizando ciclos repetidos de BLAST y phrap. Esta secuencia de consenso se designa en la presente invención como "DNA80170". En base a la secuencia de consenso DNA80170, se sintetizaron los oligonucleótidos: 1) para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para utilizar como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa para PRO4405.

Se sintetizaron los cebadores del PCR (directos e inversos):

cebador de PCR directo:

5'-CGGGACTTTCGCTACCTGTTGC-3'

(SEC. ID. No :5) y

cebador de PCR inverso:

5'-CATCATATTCCACAAAATGCTTTGGG-3'

(SEC. ID. No :6)

Adicionalmente, se construyó una sonda sintética de hibridación de oligonucleótidos a partir de la secuencia de consenso que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

sonda de hibridación:

5'-CCTTCGGGGATTCTTCCCGGCTCCCGTTCGTTCTCTG-3'

(SEC. ID. No: 7)

Con el fin de cribar diversas bibliotecas para una fuente de un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante una amplificación por PCR con la pareja de cebadores de PCR identificados anteriormente. A

continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar los clones que codificaban el gen de PRO4405 utilizando el oligonucleótido de sonda y uno de los cebadores de PCR. El ARN para la construcción de las bibliotecas de ADNc se aisló de tejido de riñón fetal humano.

- 5 La secuenciación del ADN de los clones aislados tal y como se ha descrito anteriormente produjo la secuencia de ADN de longitud completa para PRO4405 (designada en la presente invención como DNA84920-2614 [Figura 1, SEC. ID. No: 3]; y la secuencia de proteína derivada para PRO4405.

- 10 La secuencia de codificación completa de PRO4405 se muestra en la Figura 1 (SEC. ID. No: 3). El clon DNA84920-2614 contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación de traducción claro en las posiciones de nucleótidos 79-81 y un codón de finalización claro en las posiciones de nucleótidos 1009-1011. El precursor estimado del polipéptido tiene 310 aminoácidos de longitud. El clon DNA84920-2614 se ha depositado con la ATCC y se asignó el depósito de ATCC no. 203966. La proteína de longitud completa PRO4405 mostrada en la Figura 2 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 33.875 Daltons y un pI de aproximadamente 7,08.

- 15 Un análisis de la base de datos de Dayhoff (versión 35.45 SwissProt 35), utilizando un análisis de alineación de secuencias WU-BLAST2 de la secuencia de longitud completa mostrada en la Figura 2 (SEC. ID. No. 4), hizo evidente la homología entre la secuencia de aminoácidos de PRO4405 y las siguientes secuencias Dayhoff (secuencias y texto relacionado incorporados en la presente invención): YA93_SCHPO, S62432, YIG2_YEAST, AC004472_3, 20 AB004539_7, 564782, CELC27A 12_8, AF109219_1, AF086791_10 y P_W75859.

Ejemplo 5

Utilización de PRO como sonda de hibridación

- 25 El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica PRO como sonda de hibridación.

- 30 El ADN que comprende la secuencia codificante PRO de longitud completa o madura tal y como se describe en la presente invención se utiliza como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de PRO) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

- 35 La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de astringencia elevada. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada de PRO a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

- 40 A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad secuencial deseada con el ADN que codifica el PRO de secuencia nativa de longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en la literatura.

Ejemplo 6

*Expresión de PRO en *E. coli**

- 45 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de PRO mediante expresión recombinante en *E. coli*.

- 50 La secuencia de ADN que codifica PRO se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción del vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar *et. al.*, *Gene*, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se defosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector preferiblemente 55 incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor *trp*, un líder polihis (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia polihis, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante de PRO, el finalizador transcripcional lambda, y un gen *argU*.

- 60 A continuación, la mezcla de unión se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los procedimientos descritos en Sambrook *et. al.*, *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y, a continuación, se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plásmido se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

- 65 Los clones seleccionados se pueden desarrollar durante toda la noche en un medio de cultivo líquido tal como el caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de la expresión se activa.

Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína PRO solubilizada se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

El PRO puede expresarse en *E. coli* en forma de etiqueta de poli-His, utilizando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica PRO se amplifica inicialmente utilizando cebadores del PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios para las enzimas de restricción que se corresponden con los sitios para enzimas de restricción del vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan una iniciación de la traducción eficaz y fiable, una purificación rápida en una columna quelante metálica, y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas de poli-His amplificadas por PCR se unen a continuación en un vector de expresión que se utiliza para transformar un *E. coli* huésped basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) Ion galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se cultivan en primer lugar en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta alcanzar una D.O.600 de 3-5. Los cultivos se diluyen a continuación 50-100 veces en un medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de sodio·2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, además de 110 mM de MPOS, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y 7 mM de MgSO₄) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se extraen para verificar la expresión mediante un análisis SDS-PAGE, y el volumen del cultivo se centrifuga hasta que las células son residuos de centrifugación. Los residuos de centrifugación de las células se congelan hasta la purificación y el repliegue.

La masa de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 L (6-10 g de residuos de centrifugación) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) de 7 M de guanidina, 20 mM de Tris, tampón de pH 8. Se añade sulfito sódico sólido y tetrionato de sodio para que las concentraciones finales sean de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante toda la noche a 4°C. Este paso da lugar a una proteína desnaturalizada con residuos de "alc-cisteína" bloqueados por la sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm durante 30 minutos en una ultracentrífuga Beckman. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante metálica (6 M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micras para aclarar. El extracto aclarado se carga en una columna quelante metálica Quiagen Ni-NTA de 5 ml equilibrada con el tampón de columna quelante metálica. La columna se lava con un tampón adicional que contiene 50 mM de imidazol (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con un tampón que contiene 250 mM de imidazol. Las fracciones que contienen la proteína de interés se agrupan y se guardan a 4°C. La concentración de la proteína se estima según su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan mediante la dilución lenta de la muestra en tampón de repliegue preparado nuevo consistente en: 20 mM de Tris, pH 8,6, 0,3 M de NaCl, 2,5 M de urea, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina y 1 mM de EDTA. Los volúmenes de repliegues se escogen de manera que la concentración final de proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de repliegue se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de repliegue se detiene mediante la adición de TFA hasta una concentración final del 0,4% (pH aproximadamente de 3). Antes de otra purificación de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micras y se añade acetonitrilo hasta una concentración final del 2-10%. La proteína replegada se somete a una columna de cromatografía de fase inversa Poros R1/H utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Las alcuotas de fracciones con una absorbancia A280 se analizan en geles de SDS poliacrilamida y las fracciones que contienen proteína replegada homogénea se agrupan. Generalmente, las especies replegadas correctamente de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que esas especies son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de solucionar las formas desplegadas de proteínas de la manera deseada, la etapa de la fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

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

Muchos de los polipéptidos PRO descritos en WO00/56889 se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 7

Expresión de PRO en células de mamíferos

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de PRO mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

El vector pRK5 (véase EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de PRO está ligado en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook *et. al., supra*. El vector resultante se denomina pRK5-PRO.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan para unirse en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 μg de ADN de pRK5-PRO se mezcla con 1 μg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmappaya *et. al.*, *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 μl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de CaCl_2 . A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 μl de 50 mM de HEPES (ph 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO_4 , y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio nuevo y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -cisteína y 200 $\mu\text{Ci/ml}$ ^{35}S - metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de giro y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido PRO. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

En una técnica alternativa, se puede introducir PRO en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12: 7575 (1981). Las células 293 se cultivan hasta la máxima densidad en un frasco giratorio y se añaden 700 μg de ADN de pRK5-PRO. En primer lugar, las células se concentran en el frasco giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado en el residuo de centrifugación 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 frasco giratorio que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina bovina y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los debris. La muestra que contiene el PRO expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, PRO puede expresarse en células CHO. El pRK5-PRO puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO_4 o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio remplazarse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como la ^{35}S -metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido PRO, el medio de cultivo puede remplazarse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio acondicionado. A continuación, el medio que contiene el PRO expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

El PRO etiquetado con epítipo puede expresarse también en células CHO huésped. El PRO debe subclonarse fuera del vector pRK5. La inserción del subclon puede experimentar PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta de epítipo concreta, tal como una etiqueta de poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. La inserción de PRO etiquetado con poli-his puede subclonarse a continuación en un vector conductor SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal y como se describe anteriormente) con el vector conductor SV40. El marcaje puede realizarse, tal y como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelante- Ni^{2+} .

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

La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, CH2 y los dominios de CH2 y/o es una forma etiquetada de poli-his.

Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar descritas en Ausubel *et. al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el traslado adecuado de los de ADNc. El vector utilizado en la expresión en las células CHO es tal y como se describe en Lucas *et. al.*, *Nucl. Acid Res.* 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

Se introducen doce microgramos del ADN plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección Superfect® (Quiagen), Dosper® o Eugene® (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se cultivan tal y como se describe en Lucas *et. al.*, *supra*. Aproximadamente se congelan 3×10^{-7} células en una ampolla para un crecimiento y producción posterior tal y como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el ADN plásmido se descongelan mediante un baño de agua y se mezclan mediante centrifugación. El contenido se pipetea en un tubo de centrífuga que contiene 10 mL de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 μ m con un 5% de suero bovino fetal dialfiltrado a 0,2 μ m). A continuación, las células se fraccionan en un centrifugador de 100 mL que contiene 90 mL del medio selectivo. Después de 2-3 días, las células se transfieren a un centrifugador de 250 mL lleno con 150 mL de medio de cultivo selectivo y se incuban a 37°C. Después de otros 2-3 días, se siembran centrifugadores de 250 mL, 500 mL y 2000 mL se siembran con 3×10^5 células/mL. El medio celular se cambia por medio nuevo mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio de CHO adecuado, en realidad se puede utilizar un medio de producción descrito en la patente estadounidense No. 5.122.469, publicada el 16 de junio de 1992. Un centrifugador de 3L de producción se siembra hasta $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determina el pH del número de células. En el día 1, se toman muestras en el centrifugador y se inicia el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se toman muestras en el centrifugador, la temperatura se cambia a 33°C, y se toman 30 mL de glucosa a 500g/L y 0,6 mL de antiespuma al 10% (por ejemplo 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajusta según la necesidad manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cayera por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μ m. El filtrado se guarda a 4°C o se carga inmediatamente en columnas para la purificación.

Para las construcciones etiquetadas de poli-his, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni-NTA (Qia-gen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4°C. Tras cargarse, la columna se lava con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con el tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guarda a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contiene Fc) se purifican a partir del medio acondicionado tal y como se indica a continuación. El medio acondicionado se bombea a una columna Proteína A (Pharmacia) de 5 ml que ha sido equilibrada en un tampón de 20 mM de fosfato sódico, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μ L de tampón de Tris 1M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento, tal como el descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-his. La homogeneidad se calcula mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales mediante degradación Edman.

Muchos de los polipéptidos PRO descritos en WO 00/56889 se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

40 Ejemplo 8

Expresión de PRO en levadura

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO en levadura.

En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de PRO a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO. Para la secreción, el ADN que codifica PRO puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de PRO nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, un factor alfa de levadura o la secuencia señal/líder secretora de la invertasa, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de PRO.

Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

El PRO recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación mediante la centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene PRO puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna concretas.

Muchos de los polipéptidos PRO descritos en WO 00/56889 se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 9

Expresión de PRO en células de insecto infectadas de Baculovirus

- 5 El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO en células de insecto infectadas de Baculovirus.

La secuencia que codifica PRO se fusiona en dirección 5' a un epítipo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichas epítipo etiquetas incluyen etiquetas de poli-his y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica PRO o la parte deseada de la secuencia que codifica PRO, tales como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína extracelular se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con todas esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharmlingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como describe en O'Reilly *et al.*, *Baculovirus expresion vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

A continuación, el PRO etiquetado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert *et al.*, *Nature*, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 a 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonica dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se aclaran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 mL por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A₂₈₀ con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato: 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye las proteínas unidas no específicamente. Después de alcanzar la línea base a A₂₈₀ de nuevo, la columna se elabora con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un mL y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o Western blot con Ni²⁺-NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen PRO etiquetado con His₁₀ eluido se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

Alternativamente, la purificación del PRO etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

- 45 Muchos de los polipéptidos PRO descritos en WO 00/56889 se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 10

50 *Preparación de anticuerpos que se unen a PRO*

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a PRO.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen PRO purificado, proteínas de fusión que contienen PRO, y células que expresan PRO recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse según el técnico en la materia sin una gran experimentación.

Los ratones, tal como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de PRO emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados a continuación se estimulan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante diversas semanas, los ratones también se pueden estimular con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-PRO.

Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales “positivos” para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de PRO. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y las células del bazo se recogen. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA para la reactividad contra PRO. La determinación de células de hibridomas “positivas” que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO está dentro de la técnica.

Las células de hibridomas positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones singéneos Balb/c para producir ascitis que contienen anticuerpos monoclonales anti-PRO. Alternativamente, las células de hibridomas pueden desarrollarse en matraces de cultivos de tejidos o en botellas en rodillo. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los ascitos se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

Ejemplo 11

Purificación de polipéptidos PRO usando Anticuerpos Específicos

Los polipéptidos PRO nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en las técnicas de purificación de proteína. Por ejemplo, se purifica el polipéptido pro-PRO, el polipéptido PRO maduro, o el polipéptido pre-PRO mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO de interés. En general, una columna de inmunoafinidad está construida por emparejamientos covalentes de anticuerpos de polipéptidos anti-PRO a una resina de cromatografía activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en la Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Asimismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de los fluidos de ascitis de ratón mediante la precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica, tal como la SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dicha columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido PRO mediante la preparación de una fracción a partir de células que contienen polipéptido PRO en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de toda la célula o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por adición de detergente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido PRO soluble que contiene una secuencia señal podría secretarse en una cantidad útil en el medio en el que las células crecen.

Una preparación que contiene polipéptido PRO soluble se pasa por la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorción preferencial del polipéptido PRO (por ejemplo, tampones de fuerza iónica elevada en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión anticuerpo/polipéptido PRO (por ejemplo, un tampón de pH bajo, tal como aproximadamente un pH de 2-3, o una alta concentración de caótropro, tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido PRO.

Ejemplo 12

Cribado de fármacos

La presente invención es particularmente útil para cribar compuestos mediante la utilización de polipéptidos PRO o fragmentos de unión de los mismos en cualquier variedad de técnica de cribado de fármacos. El polipéptido PRO o el fragmento utilizado en dicha prueba puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, adsorbido en una superficie celular o situado intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármaco utiliza células huésped eucariotas o procariotas, las cuales se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO o un fragmento. Los fármacos se criban contra dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, tanto en forma viable como fija, se pueden utilizar para ensayos de unión estándar. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido PRO o un fragmento y el agente que se está probando. Alternativamente, se puede examinar la disminución en la formación del complejo entre el polipéptido PRO y su célula diana o receptores diana causado por el agente que se está probando.

De este modo, la presente invención proporciona procedimientos de cribado para fármacos o cualquier otro agente que puede afectar una enfermedad o un trastorno asociados al polipéptido PRO. Estos procedimientos comprenden el contacto de dicho agente con un polipéptido PRO o fragmento del mismo y el ensayo (I) para la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO o un fragmento, o (II) para la presencia de un complejo entre el

polipéptido PRO o un fragmento y la célula, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En dichos ensayos de unión competitiva, el polipéptido PRO o un fragmento está normalmente marcado. Después de una incubación adecuada, el polipéptido PRO o un fragmento libres se separan de la forma unida, y la cantidad de marca libre o no complejada es una medida de la capacidad del agente concreto para unirse al polipéptido PRO o para interferir en el complejo polipéptido PRO/célula.

Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona un alto rendimiento cribando compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a un polipéptido y se describe en detalle en WO 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Brevemente, una gran cantidad de compuestos de diferentes péptidos pequeños de prueba se sintetizan en un sustrato sólido, tal como agujas de plástico o alguna otra superficie. Tal y como se aplica a un polipéptido PRO, los compuestos de péptidos de prueba se hacen reaccionar con polipéptido PRO y se lavan. Se detecta el polipéptido PRO unido mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. El polipéptido PRO purificado también puede recubrirse directamente en placas para utilizar en las técnicas de cribado de fármacos mencionadas anteriormente. Además, se pueden utilizar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

La presente invención también contempla la utilización de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los cuales los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a polipéptidos PRO específicamente compiten con un compuesto de prueba para unirse a polipéptido PRO o fragmentos del mismo. De esta manera, pueden utilizarse los anticuerpos para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO.

Ejemplo 13

Diseño racional de fármacos

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés (es decir, un polipéptido PRO) o de pequeñas moléculas con las cuales interactúan, por ejemplo, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se puede utilizar para fármacos de moda que son formas más activas o estables del polipéptido PRO o que potencian o interfieren con la función del polipéptido PRO *in vivo* (c.f. Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

En un enfoque, la estructura tridimensional del polipéptido PRO, o de un complejo polipéptido PRO-inhibidor, se determina mediante cristalografía de rayos X, mediante modelación por ordenador o, más habitualmente, mediante una combinación de los dos enfoques. Deben comprobarse la forma y las cargas del polipéptido PRO para elucidar la estructura y para determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Con menor frecuencia, podría obtenerse la información útil con respecto a la estructura del polipéptido PRO mediante la modelación basada en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural pertinente se utiliza para diseñar moléculas análogas de tipo polipéptido PRO o para identificar inhibidores eficaces. Entre los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos se pueden incluir moléculas que han mejorado la actividad o la estabilidad, tal como se muestra por Braxton y Wells, *Biochemistry*, 31: 7796-7801 (1992) o que actúan como agonistas inhibidores, o antagonistas de péptidos nativos tal y como se muestra por Athauda *et. al.*, *J. Biochem.*, 113: 742-746 (1993).

También es posible aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado mediante un ensayo funcional, tal y como se ha descrito anteriormente y, a continuación solucionar su estructura cristalina. Este enfoque, en principio, produce un fármaco inicial en el que puede basarse el diseño de fármacos posterior. Es posible evitar una cristalografía de toda la proteína mediante la generación de un anticuerpo anti-idiotípico (anti-ids) a un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, el sitio de unión del anti-ids se espera que sea un análogo del receptor original. A continuación, el anti-ids podría utilizarse para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actuarían entonces como el fármaco inicial.

En virtud de la presente invención, se pueden fabricar cantidades suficientes del polipéptido PRO para realizar estudios analíticos, tales como en cristalografía de rayos-X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO proporcionada en la presente invención proporcionará una guía para los usuarios de técnicas de modelación por ordenador en lugar de o adicionalmente a la cristalografía de rayos-X.

Ejemplo 14

Ensayo de la rediferenciación de condrocitos (ensayo 110)

Este ensayo muestra que ciertos polipéptidos de la presente invención actúan para inducir la rediferenciación de condrocitos, por lo tanto, se espera que sean útiles para el tratamiento de varios trastornos óseos y/o de cartílagos tales como, por ejemplo, lesiones deportivas y artritis. El ensayo se realiza tal y como se indica a continuación. Se aíslan condrocitos porcinos mediante digestión con colagenasa durante toda la noche de cartílago articular de las articulaciones metacarpofalángicas de cerdos de 4-6 meses de edad. A continuación, las células aisladas se siembran a 25.000 células/cm² en Ham F-12 que contiene FBS al 10% y 4 µg/ml de gentamicina. El medio de cultivo se cambia cada tres días y, a continuación, las células se siembran en placas de prueba, estauosporina 5 nM (control positivo) o medio solo (control negativo) para obtener un volumen final de 200 µl/pocillo. Tras 5 días de incubación a 37°C,

se toma una fotografía de cada pocillo y se determina el estado de diferenciación de los condrocitos. Tiene lugar un resultado positivo en el ensayo cuando se determina que la rediferenciación de los condrocitos es más parecido al control positivo que al negativo.

5 El siguiente polipéptido dio positivo en este ensayo: PRO4405.

Depósito de material

10 Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MS, USA (ATCC):

TABLA 7

15	Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
	DNA84920-2614	203966	27 de abril de 1999

20 Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de ldepósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, 25 y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alquien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según 30 las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente 35 remplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

La memoria escrita anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización 40 depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención y otras construcciones que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la presente invención tal y como se define en las reivindicaciones. El depósito del material de la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las 45 ilustraciones específicas que representa. De hecho, las diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Ácido nucleico aislado que:

(i) codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID No: 4), con o sin la secuencia señal y/o la metionina de iniciación, opcionalmente con el dominio transmembrana eliminado o inactivado;

(ii) codifica un dominio extracelular del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID No: 4), con o sin la secuencia señal;

(iii) codifica un polipéptido que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido de (i) o con el dominio extracelular de (ii), donde el polipéptido es capaz de inducir la rediferenciación de condrocitos;

(iv) tiene la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la figura 1 (SEC ID No: 3);

(v) tiene la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia codificante de longitud completa mostrada en la figura 1 (SEC ID No: 3);

(vi) tiene la secuencia codificante de longitud completa de la inserción (DNA84920-2614) contenida en ATCC 203966;

(vii) tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con el ácido nucleico de (iv), (v) o (vi) y codifica un polipéptido capaz de inducir la rediferenciación de condrocitos; o

(viii) se hibrida bajo condiciones de hibridación y lavado astringentes al complemento del ácido nucleico entre los nucleótidos 181 y 1008, ambos inclusive, de la figura 1 (SEC ID No: 3) y codifica un polipéptido capaz de inducir la rediferenciación de condrocitos,

en el que dicha identidad de secuencia se determina utilizando el programa informático ALIGN-2.

2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que dicha secuencia señal va desde los aminoácidos 1 a 34.

3. Ácido nucleico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho dominio transmembrana va desde los aminoácidos 58 a 76.

4. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho dominio extracelular va desde los aminoácidos 77 ± 5 a 310.

5. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de identidad es del 85%.

6. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de identidad es del 90%.

7. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de identidad es del 95%.

8. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el nivel de identidad es del 99%.

9. Vector que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Vector según la reivindicación 9, unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.

11. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 9 o la reivindicación 10.

12. Célula huésped según la reivindicación 11, que es una célula de CHO.

13. Célula huésped según la reivindicación 11, que es una *E. coli*.

14. Célula huésped según la reivindicación 11, que es una célula de levadura.

15. Proceso para producir un polipéptido que comprende el cultivo de la célula huésped según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido y la recuperación de dicho polipéptido del cultivo celular.

16. Polipéptido aislado que tiene:

(i) la secuencia de aminoácidos tal y como se muestra en la figura 2 (SEC ID No: 4), con o sin la secuencia señal y/o la metionina de iniciación, opcionalmente con el dominio transmembrana eliminado o inactivado;

(ii) la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular del polipéptido mostrada en la figura 2 (SEC ID No: 4), con o sin la secuencia señal;

(iii) la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia codificante de longitud completa de la inserción (DNA84920-2614) contenida en ATCC 203966; o

(iv) por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de (i), (ii) o (iii), donde el polipéptido es capaz de inducir la rediferenciación de condrocitos,

en el que dicha identidad de secuencia se determina utilizando el programa informático ALIGN-2.

17. Polipéptido según la reivindicación 16, en el que dicha secuencia señal va desde los aminoácidos 1 a 34.

18. Polipéptido según la reivindicación 16 o la reivindicación 17, en el que dicho dominio transmembrana va desde los aminoácidos 58 a 76.

19. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en el que dicho dominio extracelular va desde los aminoácidos 77 ± 5 a 310.

20. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el nivel de identidad es del 85%.

21. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el nivel de identidad es del 90%.

22. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el nivel de identidad es del 95%.

23. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en el que el nivel de identidad es del 99%.

24. Molécula quimérica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.

25. Molécula quimérica según la reivindicación 24, en la que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga es una secuencia de epítipo etiqueta.

26. Molécula quimérica según la reivindicación 24, en la que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga es una región Fc de una inmunoglobulina.

27. Anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23.

28. Anticuerpo según la reivindicación 27, que se une específicamente a un polipéptido según la reivindicación 16, parte (i) (ii) o (iii) o cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19 dependientes de la misma.

29. Anticuerpo según la reivindicación 27 o la reivindicación 28, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena única.

30. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, para utilizar en un método de tratamiento.

31. Polipéptido según la reivindicación 30, para utilizar en el tratamiento de trastornos óseos y/o de cartílago.

32. Polipéptido según la reivindicación 30, para utilizar en el tratamiento de lesiones deportivas o artritis.

33. Utilización de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de trastornos óseos y/o de cartílago.

34. Utilización de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 23, en la preparación de un medicamento destinado al tratamiento de lesiones deportivas o artritis.

FIGURA 1

CCTGGAGCCGGAAGCGCGGCTGCAGCAGGGCGAGGCTCCAGGTGGGGTTCGGTTCCGCATCCA
 GCCTAGCGTGTCCACGATGCGGGCTGGGCTCCGGGACTTTCGCTACCTGTTGCGTAGCGATCG
 AGGTGCTAGGGATCGCGGTCTTCCTTCGGGGATTCTTCCCGGCTCCCGTTCGTTCCCTCTGCC
 AGAGCGGAACACGGAGCGGAGCCCCAGCGCCGAACCTCGGCTGGAGCCAGTTCTAACTG
 GACCACGCTGCCACCACCTCTCTTCAGTAAAGTTGTTATTGTTCTGATAGATGCCTTGAGAG
 ATGATTTTGTGTTTGGGTCAAAGGGTGTGAAATTTATGCCCTACACAACCTTACCTTGTGGAA
 AAAGGAGCATCTCACAGTTTGTGGCTGAAGCAAAGCCACCTACAGTTACTATGCCTCGAAT
 CPAGGCATTGATGACGGGGAGCCTTCCCTGGCTTTGTGACGTCATCAGGAACCTCAATTCTC
 CTGCACTGCTGGAAGACAGTGTGATAAGACAAGCAAAAGCAGCTGGAAAAAGAATAGTCTTT
 TATGGAGATGAAACCTGGGTAAATTATCCCAAAGCATTTCGTTGGAATATGATGGAACAAC
 CTCATTTTTTCGTGTCAGATTACACAGAGGTGGATAATAATGTCACGAGGCATTTGGATAAAG
 TATTA AAAAGAGGAGATTGGGACATATTAATCCTCCACTACCTGGGGCTGGACCACATTGGC
 CACATTTTCAGGGCCCAACAGCCCCCTGATTGGGCAGAAGCTGAGCGAGATGGACAGCGTGCT
 GATGAAGATCCACACCTCACTGCAGTCGAAGGAGAGAGAGACGCCTTTACCCAATTTGCTGG
 TTCTTTGTGGTGACCATGGCATGTCTGAAACAGGAAGTCACGGGGCCTCCTCCACCGAGGAG
 GTGAATACACCTCTGATTTTAATCAGTTCTGCGTTTGAAAGGAAACCCGGTGATATCCGACA
 TCCAAAGCACGTCCAAATAGACGGATGTGGCTGCGACACTGGCGATAGCACTTGGCTTACCGA
 TTCCAAAAGACAGTGTAGGGAGCCTCCTATTCCCAGTTGTGGAAGGAAGACCAATGAGAGAG
 CAGTTGAGATTTTACATTTGAATACAGTGCAGCTTAGTAACTGTTGCAAGAGAATGTGCC
 GTCATATGAAAAAGATCCTGGGTTTGAGCAGTTTAAATGTGAGAAAGATTGCATGGGAACCT
 GGATCAGACTGTACTTGGAGGAAAAGCATTGAGAAGTCTATTCAACCTGGGCTCCAAGGTT
 CTCAGGCAGTACCTGGATGCTCTGAAGACGCTGAGCTTGTCCTGAGTGCACAAGTGGCCCA
 GTTCTCACCTGCTCCTGCTCAGCGTCCACAGGCACTGCACAGAAAGGCTGAGCTGGAAGT
 CCCACTGTCTCTCTGGGTTTTCTCTGCTCTTTTATTTGGTGATCCTGGTTCTTTTCGGCCG
 TTCACGTCATTGTGTGCACCTCAGCTGAAAGTTTCGTGCTACTTCTGTGGCCTCTCGTGGCTG
 GCGGCAGGCTGCCTTTCGTTTACCAGACTCTGGTTGAACACCTGGTGTGTGCCAAGTGCTGG
 CAGTGCCCTGGACAGGGGGCCTCAGGGAAGGACGTGGAGCAGCCTTATCCAGGCCTCTGGG
 TGTCCCGACACAGGTGTTACATCTGTGCTGTGAGTGCAGTGCCTCAGTTCTTGGAAGCT
 AGGTTTCTGCGACTGTTACCAAGGTGATTGTAAAGAGCTGGCGGTACACAGAGGAACAAGCCC
 CCCAGCTGAGGGGGTGTGTGAATCGGACAGCCTCCCAGCAGAGGTGTGGGAGCTGCAGCTGA
 GGAAGAAGAGACAATCGGCCTGGACACTCAGGAGGGTCAAAGGAGACTTGGTTCGACCAC
 TCATCCTGCCACCCCCAGAATGCATCCTGCCTCATCAGGTCCAGATTTCTTTCCAAGGCGGA
 CGTTTTCTGTTGGAATTCCTTAGTCCTTGGCCTCGGACACCTTCATTTCGTTAGCTGGGGAGTG
 GTGGTGAGGCAGTGAAGAAGAGGCGGATGGTCACACTCAGATCCACAGAGCCAGGATCAAG
 GGACCCACTGCAGTGGCAGCAGGACTGTTGGGGCCCCACCCCAACCCTGCACAGCCCTCATC
 CCCTCTTGGCTTGAGCCGTGAGAGGCCCTGTGCTGAGTGTCTGACCGAGACACTCACAGCTT
 TGTCATCAGGGCACAGGCTTCCTCGGAGCCAGGATGATCTGTGCCACGCTTGCACCTCGGGC
 CCATCTGGGCTCATGCTCTCTCTCTGCTATTGAATTAGTACCTAGCTGCACACAGTATGTA
 GTTACCAAAAGAATAAACGGCAATAATTGAGAAAAAAA

ES 2 288 279 T3

FIGURA 2

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA84920
>< subunidad 1 de 1, 310 aa, 1 parada
>< PM: 33875, pI: 7,08, NX(S/T): 2

MRLGSGTFATCCVAIEVLGIAVFLRGFFPAPVRSSARAEHGAEPPEPSAGASSNWTTLPP
PLEFSKVIVLIDALRDDDFVFGSKGVKFMPYTTYLVEKGASHSFV-LEAKPPTVTMPRIKALMT
GSLPGFVDVIRNLNSPALLEDVIRQAKAAGKRIVFYGDETWVKLFPKHFVEYDGTTSEFFVS
DYTEVDNNVTRHLDKVLKRGDWDILILHYLGLDHLHIGHISGPNSPLIGQKLSEMDSVLMKIHT
SLQSKERETPLPNLLVLCGDHGMSETGSHGASSTEEVNTPLILISSAFERKPGDIRHPKHVQ
```

Características importantes de la proteína:

Péptido señal

Aminoácidos 1-34

Dominio transmembrana:

Aminoácidos 58-76

Sitios de N-glicosilación:

Aminoácidos 56-60, 194-198

Sitios de N-miristoilación:

Aminoácidos 6-12, 52-58, 100-106, 125-131, 233-239, 270-276, 275-281, 278-284

Sitio de amidación:

Aminoácidos 154-158

Secuencia de unión celular:

Aminoácidos 205-208

ES 2 288 279 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Genentech, Inc.

- 5 <120> POLIPÉPTIDOS SECRETADOS Y TRANSMEMBRANA Y LOS ÁCIDOS NUCLEICOS QUE LOS CODIFICAN
- 10 <140> EP 05011884.3
<141> 01-03-2000
- 15 <150> US 60/125.774
<151> 23-03-1999
- 20 <150> US 60/125.778
<151> 23-03-1999
- 25 <150> US 60/125.826
<151> 24-03-1999
- 30 <150> US 60/127.035
<151> 31-03-1999
- 35 <150> US 60/127.706
<151> 05-04-1999
- 40 <150> US 60/130.359
<151> 21-04-1999
- 45 <150> US 60/131.270
<151> 27-04-1999
- 50 <150> US 60/131.272
<151> 27-04-1999
- 55 <150> US 60/131.291
<151> 27-04-1999
- 60 <150> US 60/132.371
<151> 04-05-1999
- 65 <150> US 60/132.379
<151> 04-05-1999
- <150> US 60/132.383
<151> 04-05-1999
- <150> US 60/135.750
<151> 25-05-1999
- <150> US 60/138.166
<151> 08-06-1999
- <150> US 60/144.791
<151> 20-07-1999

ES 2 288 279 T3

<150> US 60/146.970
 <151> 03-08-1999

5 <150> US 60/170.262
 <151> 09-12-1999

<160> 7

10 <210> 1
 <211> 43
 <212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda de oligonucleótido sintético

20 <400> 1

25 tgtaaaacga cggccagta aatagacctg caattattaa tct 43

<210> 2
 <211> 41
 <212> ADN

30 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda de oligonucleótido sintético

35 <400> 2

40 caggaaacag ctatgaccac ctgcacacct gcaaatccat t 41

<210> 3
 <211> 2395
 <212> ADN

45 <213> *Homo Sapien*

<400> 3

50 cctggagcgcg gaagcgcggc tgcagcaggg cgaggctcca ggtggggctcg 50
 gttccgcctc cagcctagcg tgtccacgat gcggclgggc tccgggactt 100
 tccgtacctg ttgcgtagcg atcgaggctgc tagggatcgc ggtcttccct 150
 cgggggattct tcccggctcc cgttcgttcc tctgccagag cggaaacacgg 200
 55 agcggagccc ccagcgcctc aaccctcggc tggagccagt tctaaactgga 250
 ccacgctgcc accacctctc ttcagtaaag ttggtattgt tctgatagat 300
 gccttgagag atgatttltg gtltggytca aagggtgtga aatttatgcc 350
 60 ctacacaact taccttgtgg aaaaaggagc atctcacagt tttgtgqctg 400
 aagcaaaagc acctacagtt actatgcctc gaatcaaggc attgatgacg 450
 65 gggagccttc ctggcttctg cgacgtcatc aggaacctca attctcttgc 500
 actgctggaa gacagtgtga taagacaagc aaaagcagct ggaaaaagaa 550

ES 2 288 279 T3

tagtctttta tggagatgaa acctgggtta aattattccc aaagcatttt 600
 gtggaatatg atggaacaac ctcatTTTTt gtgtcagatt acacagaggt 650
 5 ggataataat gtacgagggc atttggataa agtatttaaa agaggagatt 700
 gggacataatt aatcctccac tacctggggc tggaccacat tggccacatt 750
 10 tcagggccca acagccccct gattgggcag aagctgagcg agatggacag 800
 cgtgctgatg aagatccaca cctcactgca gtggaaggag agagagacgc 850
 ctttaccan tttgtgggtt ctttgtggtg accatggcat gtctgaanca 900
 15 ggaagtcacg gggcctcctc caccgaggag gtgaatacac ctctgatttt 950
 aatcagttct gcgtttgaaa ggaancccg tgaatccga catccaaagc 1000
 acgtccaata gacggatgtg gctgcgacac tggcgatagc acttggctta 1050
 20 ccgattccaa aagacaggtg agggagcctc ctattcccag ttgtggaag 1100
 aagaccaatg agagagcagt tgagattttt acatttgaat acagtgcagc 1150
 25 ttagttaact gtgcaagag atgtgcccgt catatgaaa agatcctggg 1200
 tttgagcagt ttaaaatgtc agaaagattg catgggaact ggatcagact 1250
 gtacttggag gaaaagcatt cagaagtcct attcaacctg ggctccaagg 1300
 30 ttctcaggca gtacctgat gctctgaaga cgctgagctt gtccctgagt 1350
 gcacaagtgg cccagttctc accctgctcc tgctcagcgt cccacaggca 1400
 ctgcacagaa aggtgagct ggaagtccca ctgtcatctc ctgggttttt 1450
 35 tctgctcttt tatttgggtg tcttgggttct ttgggcggtt cagctcattg 1500
 tgtgcacctc agctgaaagt tcgtgctact tctgtggcct ctctggtgtg 1550
 40 ggggcagggt gcccttcgtt taccagactc tgggtgaaca cctggtgtgt 1600
 gccaaagtgtt ggcagtgcct tggacagggg gcctcagggg aggacgtgga 1650
 gcagccttat cccaggcctc tgggtgtccc gacacaggtg ttcacatctg 1700
 45 tgctgtcagg tcagatgcct cagttcttgg aaagctaggt tctgctgact 1750
 gttaccaagg tgattgtaaa gagctggcgg tcacagagga acaagcccc 1800
 50 cagctgaggg ggtgtgtgaa tcggacagcc tcccagcaga ggtgtgggag 1850
 ctgcagctga gggaaquayg yacaatcggc ctggacactc aggaggggtca 1900
 aaaggagact tggtcgcacc atcactcctg ccacccccag atgcattctt 1950
 55 gccctatcag gtccagattt ctttccuug cygaagtttt ctgttggaa 2000
 tcttagtctt tggcctcggg caccctcatt cgttagctgg ggagtgggtg 2050
 tgaaggcagt gagaagaggc ggaatgttca atcagatctt acagagctca 2100
 60 ggatcaaggg acccactgca gtggcagcag gactgttggg ccccccccc 2150
 aacctgcac agccctcact cctctcttgg ctgagcgtc agagyccttg 2200

ES 2 288 279 T3

tgctgagtgt ctgaccgaga cactcacagc tttgtcatca gggcacaggc 2250
 ttcctcggag ccaggatgat ctgtgccacg cttgcacctc gggcccatct 2300
 gggctcatgc tctctctcct gctattgaat tagtacctag ctgcacacag 2350
 tatgtagtta ccaaaagaat aaacggcaat aattgagaaa aaaaa 2395

<210> 4

<211> 310

<212> PRT

<213> *Homo Sapien*

<400> 4

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

ES 2 288 279 T3

		260		265		270	
	Met Ser Glu Thr	Gly Ser His Gly Ala Ser Ser Thr Glu Glu Val					
5		275		280		285	
	Asn Thr Pro Leu Ile Leu Ile Ser Ser Ala Phe Glu Arg Lys Pro						
		290		295		300	
10	Gly Asp Ile Arg His Pro Lys His Val Gln						
		305		310			
	<210> 5						
15	<211> 22						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia Artificial						
20	<220>						
	<223> Sonda de oligonucleótido sintético						
	<400> 5						
25	cgggacttgc gctacctgtt gc						22
	<210> 6						
30	<211> 26						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia Artificial						
35	<220>						
	<223> Sonda de oligonucleótido sintético						
	<400> 6						
40	catcatattc cacaaaatgc ttgggg						26
	<210> 7						
45	<211> 38						
	<212> ADN						
	<213> Secuencia Artificial						
50	<220>						
	<223> Sonda de oligonucleótido sintético						
	<400> 7						
55	ccttcggggga ttcttcccggtg ctcccgttcg ttctctcg						38
60							
65							