



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 076**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C07K 14/47 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)	C12N 15/62 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)	G01N 33/53 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)	A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00916675 .2**

96 Fecha de presentación : **30.03.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1210418**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.06.2002**

54 Título: **Polipéptidos secretados y transmembrana y ácidos nucleídos que lo codifican.**

30

Prioridad: 02.06.1999 PCT/US99/12252 23.06.1999 US 141037 P
07.07.1999 US 143048 P 20.07.1999 US 144758 P
26.07.1999 US 145698 P 28.07.1999 US 146222 P
17.08.1999 US 149396 P 15.09.1999 PCT/US99/21090
15.09.1999 PCT/US99/21547 08.10.1999 US 158663 P
30.11.1999 PCT/US99/28313 01.12.1999 PCT/US99/28301
16.12.1999 PCT/US99/30095 05.01.2000 PCT/US00/00219
06.01.2000 PCT/US00/00376 11.02.2000 PCT/US00/03565
18.02.2000 PCT/US00/04341 22.02.2000 PCT/US00/04414
24.02.2000 PCT/US00/04914 02.03.2000 PCT/US00/05841
15.03.2000 PCT/US00/06884 20.03.2000 PCT/US00/07377

73

Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 Dna Way
South San Francisco, California 94080-4, US

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.12.2010

72

Inventor/es: **Goddard, Audrey; Baker, Kevin P.; Fong, Sherman; Gurney, Austin, L.; Zhang, Zemin; Paoni, Nicholas F.; Roy, Margaret, Ann; Ferrara, Napoleone; Ashkenazi, Avi, J.; Gerritsen, Mary, E.; Grimaldi, Christopher, J.; Desnoyers, Luc; Gerber, Hanspeter; Pan, James; Stewart, Timothy, A.; Tumas, Daniel; Eaton, Dan, L.; Kljavin, Ivar, J.; Williams, P., Mickey; Wood, William, I.; Botstein, David; Godowski, Paul J.; Napier, Mary, A. y Watanabe, Colin, K.**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.12.2010

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).

ES 2 349 076 T3

DESCRIPCIÓN**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente invención se refiere en general a la identificación y aislamiento de ADN nuevo y a la producción recombinante de nuevos polipéptidos.

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Las proteínas extracelulares tienen funciones importantes, entre otras cosas, en la formación, diferenciación y mantenimiento de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, p. ej., la proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células, normalmente está dirigido por
10 información recibida de otras células y/o el entorno cercano. Esta información, a menudo es transmitida por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitógenos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que son, a su vez, recibidos e interpretados por diferentes receptores celulares o proteínas unidas a membrana. Estos polipéptidos o moléculas de
15 señalización secretados normalmente pasan por la ruta secretora celular para alcanzar su sitio de acción en el entorno extracelular.

[0003] Las proteínas secretadas tienen diferentes aplicaciones industriales, incluyendo productos farmacéuticos, de diagnóstico, biosensores y biorreactores. La mayoría de los fármacos proteínicos disponibles actualmente, tales como los agentes
20 trombolíticos, interferones, interleucinas, eritropoyetinas, factores estimulantes de colonias y otras citocinas diferentes son proteínas secretoras. Sus receptores, que son proteínas de membrana, también tienen potencial como agentes terapéuticos o de diagnóstico. Tanto la industria como el mundo académico han hecho esfuerzos para identificar proteínas secretadas nativas nuevas. Muchos esfuerzos se centran en el
25 cribado de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero para identificar las secuencias codificantes de nuevas proteínas secretadas. Se describen en la bibliografía ejemplos de procedimientos y técnicas de cribado [véase, por ejemplo, Klein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:7108-7113 (1996); patente de EE.UU. nº 5.536.637].

[0004] Las proteínas unidas a membrana y los receptores pueden tener funciones
30 importantes, entre otras cosas, en la formación, diferenciación y mantenimiento de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, p. ej., la proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células, normalmente está dirigido por información recibida de otras células y/o el entorno cercano. Esta información, a menudo es transmitida por polipéptidos secretados (por ejemplo,
35 factores mitógenos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de

diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que son, a su vez, recibidas e interpretadas por diferentes receptores celulares o proteínas unidas a membrana. Dichas proteínas unidas a membrana y receptores celulares incluyen, pero sin limitar, receptores de citocinas, quinasas receptoras, fosfatasa receptoras, receptores implicados en interacciones célula-célula y moléculas de adhesina celular como selectinas e integrinas. Por ejemplo, la transducción de señales que regula el crecimiento y la diferenciación celulares, es regulada en parte por la fosforilación de diferentes proteínas celulares. Las proteína tirosina quinasas, enzimas que catalizan este proceso, también pueden actuar como receptores de factores de crecimiento. Los ejemplos incluyen el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y receptor del factor de crecimiento nervioso.

[0005] Las proteínas unidas a membrana y las moléculas receptoras tienen diferentes aplicaciones industriales, incluyendo como agentes farmacéuticos y de diagnóstico. Las inmunoadhesinas receptoras, por ejemplo, se pueden usar como agentes terapéuticos para bloquear interacciones receptor-ligando. Las proteínas unidas a membrana también se pueden usar para cribar potenciales inhibidores moléculas pequeñas o péptidos de la interacción receptor/ligando relevante.

[0006] Tanto en la industria como en el mundo académico se están haciendo esfuerzos por identificar nuevos receptores nativos o proteínas unidas a membrana. Muchos esfuerzos se centran en el cribado de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero para identificar las secuencias codificantes de nuevos receptores o proteínas unidas a membrana.

PRO1186

[0007] La proteína A del veneno de *Dendroaspis polylepsis polylepsis* (mamba negra) comprende 81 aminoácidos, que incluyen 10 restos semi-cisteína. Los venenos tienen interés, por una parte como armas en la guerra, y por otra parte, para usar en ensayos para determinar agentes que invierten o inhiben los efectos del veneno u otro tóxico similar. El veneno de la mamba negra se describe además en *Int. J. Biochem.*, 17(6):695-699 (1985) y Joubert y Strydom. *Hoppe Seylers Z Physiol. Chem.*, 361(12):1787-1794 (1980).

[0008] Los autores de la invención describen en el presente documento la identificación y caracterización de nuevos polipéptidos que tienen homología con la proteína A del veneno de serpiente, denominados en el presente documento polipéptidos PRO1186.

35 **RESUMEN DE LA INVENCION**

PRO1186

[0009] Se ha identificado un clon de ADNc (ADN60621-1516) que codifica un nuevo polipéptido que tiene identidad de secuencia con la proteína A del veneno y denominado en la presente solicitud "PRO1186".

5 [0010] La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada como se define en las reivindicaciones que codifican un polipéptido PRO1186, para usar en un procedimiento de tratamiento, y el uso de dicho ácido nucleico como se define en las reivindicaciones.

[0011] La invención también proporciona el polipéptido PRO1186 aislado como
10 se define en las reivindicaciones, para usar en un procedimiento de tratamiento, y el uso de dicho polipéptido como se define en las reivindicaciones.

[0012] En otra realización más, la invención se refiere a antagonistas de un polipéptido PRO1186 nativo como se define en las reivindicaciones, para usar en un procedimiento de tratamiento, y al uso de dichos antagonistas como se define en las
15 reivindicaciones. En una realización particular, el antagonista es un anticuerpo anti-PRO1186.

[0013] En una realización adicional como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a un procedimiento para identificar antagonistas de un polipéptido PRO1186 nativo, poniendo en contacto el polipéptido PRO1186 nativo con una
20 molécula candidata y seguir una actividad biológica mediada por dicho polipéptido.

[0014] En una realización adicional más como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a una composición que comprende un polipéptido PRO1186, o un antagonista como se define en lo que antecede, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 **Realizaciones adicionales**

[0015] En otras realizaciones de la presente invención como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento para usar en un procedimiento de tratamiento, y el uso de dichos vectores como se define en las
30 reivindicaciones.

[0016] En otras realizaciones como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionados con un polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos para usar en un procedimiento de tratamiento, y el uso de
35 dichas moléculas quiméricas como se define en las reivindicaciones. Los ejemplos de

dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento fusionados con una secuencia de epítipo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

[0017] En otra realización, la invención proporciona un anticuerpo antagonista que se une específicamente a PRO1186. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo monocatenario.

[0018] En realizaciones, como se definen en las reivindicaciones, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO1186.

[0019] En otros aspectos como se definen en las reivindicaciones, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 81%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 82%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 83%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 84%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 85%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 86%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 87%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 88%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 89%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 90%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 91%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 92%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 93%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 94%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 95%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 96%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 97%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 98% y todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 99% respecto a (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificante del ADNc del polipéptido RO1186 de longitud completa como se describe en el presente documento, o la secuencia codificante del polipéptido PRO1186 que carece del péptido señal como se describe en el presente documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de

(a).

[0020] En un aspecto adicional como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende el ADNc de la proteína humana depositado en el ATCC como se describe en el presente documento, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0021] En otra realización como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona el polipéptido PRO aislado codificado por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico aisladas, identificadas en lo que antecede.

[0022] En un determinado aspecto como se define en la reivindicaciones, la invención se refiere a un polipéptido PRO1186 aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 81%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 82%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 83%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 84%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 85%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 86%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 87%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 88%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 89%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 91%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 92%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 93%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 94%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 95%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 96%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 97%, todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 98% y todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 99% respecto al polipéptido PRO1186 que tiene la secuencia de aminoácidos de longitud completa como se describe en el presente documento o la secuencia de aminoácidos que carece del

péptido señal como se describe en el presente documento.

[0023] En un aspecto adicional como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a un polipéptido PRO aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc de la proteína humana depositado con el ATCC como se describe en el presente documento.

[0024] En un aspecto específico, la invención usa un polipéptido PRO1186 aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o la metionina iniciadora y es codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos como se describe en lo que antecede. También se describen en el presente documento procedimientos para producirlos, en los que dichos procedimientos comprenden cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante adecuada, en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido PRO y recuperar el polipéptido PRO del cultivo celular.

[0025] En otras realizaciones adicionales como se definen en las reivindicaciones, la invención se refiere a antagonistas de un polipéptido PRO nativo como se define en el presente documento. En una realización particular, el agonista o antagonista es un anticuerpo anti-PRO.

[0026] En otra realización más como se define en las reivindicaciones, la invención se refiere a un procedimiento para identificar antagonistas de un polipéptido PRO, que comprende poner en contacto el polipéptido PRO con una molécula candidata y seguir la actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO. Preferiblemente, el polipéptido PRO es un polipéptido PRO nativo.

[0027] En una realización adicional más, la invención se refiere a una composición farmacéutica de importancia que comprende un polipéptido PRO, o un antagonista de un polipéptido PRO como se describe en el presente documento, o un anticuerpo anti-PRO, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0028] Otra realización de la presente invención se dirige al uso de un polipéptido PRO o un antagonista del mismo como se ha descrito en lo que antecede, o un anticuerpo anti-PRO, para preparar un medicamento, como se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0029]

Figura 1. Muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 3) de una secuencia nativa de ADNc de PRO1186 (UNQ600), en la que la SEC ID N° 3 es un clon denominado en el presente documento "DNA60621-1516".

Figura 2. Muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 4) derivada de la secuencia codificante del SEC ID N° 3 mostrada en la figura 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

5 **[0030]** Las expresiones “polipéptido PRO” y “PRO” como se usan en el presente documento y cuando van seguidas inmediatamente por una designación numérica, se refieren a diferentes polipéptidos, en los que la denominación completa (es decir, PRO/número) se refiere a secuencias de polipéptido específicas como se describen en el presente documento. Las expresiones “polipéptido PRO/número” y “PRO/número”
10 en las que el término “número” se proporciona como una denominación numérica real como se usa en el presente documento, abarca la secuencia nativa de polipéptidos y variantes de polipéptidos (que se definen más adelante en el presente documento). Los polipéptidos PRO descritos en el presente documento se pueden aislar de una variedad de fuentes, tales como tipos de tejido humano o de otra fuente, o se pueden preparar
15 por procedimientos recombinantes o sintéticos.

[0031] Un “polipéptido PRO de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que la correspondiente al polipéptido PRO derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos PRO de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o se pueden preparar por medios recombinantes o sintéticos. La
20 expresión “polipéptido PRO de secuencia nativa” abarca específicamente las formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido PRO específico (p. ej., una secuencia de dominio extracelular), formas de variantes naturales (p. ej., formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En diferentes realizaciones de la invención, los polipéptidos PRO de secuencia nativa descritos en el
25 presente documento son polipéptidos de secuencia madura o nativa de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras que acompañan. Los codones de inicio y de parada se muestran en negrita y subrayados en las figuras. Sin embargo, aunque el polipéptido PRO descrito en las figuras que acompañan se muestra que empieza con restos
30 metionina designados en el presente documento como posición 1 de aminoácido en las figuras, se puede concebir y es posible usar restos distintos de metionina situados corriente arriba o corriente debajo de la posición 1 de aminoácido en las figuras, como resto de aminoácidos de inicio para los polipéptidos PRO.

[0032] El “dominio extracelular” o “ECD” del polipéptido PRO se refiere a una
35 forma del polipéptido PRO que carece esencialmente de los dominios transmembrana

y citoplasmático. Normalmente, un ECD del polipéptido PRO tendrá menos de 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y preferiblemente, tendrá menos de 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos PRO de la presente invención, se identifica conforme a los criterios usados habitualmente en la técnica para identificar este tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probable es que en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del dominio como se ha identificado inicialmente en el presente documento. Por lo tanto, opcionalmente, un dominio extracelular de un polipéptido PRO puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquiera de los lados del límite del dominio transmembrana/dominio extracelular como se identifica en los ejemplos o en la memoria descriptiva, y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica, están contemplados en la presente invención.

[0033] La localización aproximada de los “péptidos señal” de diferentes polipéptidos PRO descritos en el presente documento se muestran en la presente memoria descriptiva y/o las figuras que acompañan. Sin embargo, hay que observar que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero, lo más probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite C-terminal del péptido señal como se ha identificado inicialmente en el presente documento, en el que el límite C-terminal del péptido señal se puede identificar conforme a los criterios usados habitualmente en la técnica para identificar este tipo de elemento de la secuencia de aminoácidos (p. ej., Nielsen y col., *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997) y von Heinje y col., *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es enteramente uniforme, dando como resultado más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, en los que el péptido señal se escinde en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los lados del límite C-terminal del péptido señal como se identifica en el presente documento y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados en la presente invención.

[0034] “Variante del polipéptido PRO” significa un polipéptido PRO activo como se ha definido antes o se define a continuación, que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80% con una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa como se describe en el presente documento, una secuencia de polipéptido PRO que carece de péptido señal como se

describe en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, como se describe en el presente documento o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa como se describe en el presente documento. Dichas variantes de polipéptido PRO incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO en los que se añaden o suprimen uno o más restos de aminoácidos en el extremo N o C de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud entera. Normalmente, una variante de polipéptido PRO tendrá una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 80%, preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 81%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 82%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 83%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 84%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 86%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 87%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 88%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 89%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 91%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 92%,

[0035] más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 93% aminoácido, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 94%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 96%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 97%, más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 98% y lo más preferiblemente una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos aproximadamente 99% con una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa como se describe en el presente documento, una secuencia de polipéptido PRO que carece de péptido señal como se describe en el presente

documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, como se describe en el presente documento o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa como se describe en el presente documento. Normalmente, los polipéptidos variantes de PRO

5 tienen al menos 10 aminoácidos de longitud, con frecuencia al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos

10 aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos

15 aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

[0036] El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del polipéptido PRO identificadas en el presente documento, se define

20 como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata, que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia de polipéptido PRO específica, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y no considerando ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. El alineamiento para el

25 propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, se puede lograr de varias formas que conoce el experto en la materia, por ejemplo, usando software para ordenador públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier

30 algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para el propósito del presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la

35 siguiente Tabla 1. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2

fue escrito por Genentech, Inc., y el código fuente mostrado en la tabla 1 se ha presentado con la documentación para el usuario en la oficina de Copyright de EE.UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con registro de Copyright de EE.UU. n° TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público en
5 Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la tabla 1. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para usar en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

- 10 **[0037]** En las situaciones en las que se usa el programa ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de
15 identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

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

en donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento
20 del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se observará 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 de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. Como ejemplos de cálculos de % de identidad de
25 secuencia de aminoácidos, las tablas 2-3 muestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "Proteína de comparación" con respecto a la secuencia de aminoácidos denominada "PRO", en la que "PRO" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido PRO hipotético de interés, la "proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un
30 polipéptido frente al que se compara el polipéptido "PRO" de interés, y "X", "Y" y "Z" representa cada uno diferentes restos de aminoácidos hipotéticos.

[0038] Salvo que se manifieste específicamente otra cosa, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente precedente, usando el programa de
35 ordenador ALIGN-2. Sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de

aminoácidos también se pueden obtener como se describe a continuación usando el programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul y col., *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se establecen como valores por defecto. Los no fijados a los valores por defecto, es decir, 5 los parámetros que se pueden ajustar, se fijan con los siguientes valores: extensión de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se usa WU-BLAST-2, un valor de % de identidad de secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de coincidencias de restos de aminoácidos idénticos entre la secuencia de aminoácidos del 10 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 frente a la cual se está comparando el polipéptido PRO de interés, que puede ser una variante de polipéptido PRO) determinado por WU-BLAST-2, entre (b) el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la 15 expresión “un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos B”, la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés.

20 **[0039]** El % de identidad de secuencia de aminoácidos también se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., *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>. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en 25 el que todos estos parámetros de búsqueda se establecen como valores por defecto incluyendo, por ejemplo, no enmascaramiento = si, cadena = todas, incidencias esperadas = 10, longitud de complejidad baja mínima = 15/5, valor e multi-paso = 0,01, constante para multi-paso = 25, abandono para alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

30 **[0040]** En situaciones en las que se usa NCBI-BLAST2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de 35 secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos

B dada) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

en donde X es el número de restos de aminoácidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en el
5 alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se observará 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 de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

- 10 **[0041]** Un “polinucleótido variante de PRO” o “secuencia de ácido nucleico variante de PRO” significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido PRO activo como se define a continuación y que tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 80% con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia del polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud
15 completa como se describe en el presente documento, una secuencia del polipéptido PRO de la secuencia nativa de longitud completa que carece de péptido señal como se describe en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin péptido señal como se describe en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido PRO de longitud completa como se
20 describe en el presente documento. Normalmente, un polinucleótido variante de PRO tendrá una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 80%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 81%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 82%, más preferiblemente una identidad de
25 secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 83%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 84%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 85%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 86%, más preferiblemente una identidad de
30 secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 87%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 88%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 89%, más preferiblemente una identidad de de ácido nucleico de al menos aproximadamente 90%, más preferiblemente una identidad de secuencia de
35 ácido nucleico de al menos aproximadamente 91%, más preferiblemente una identidad

de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 92%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 93%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 94%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 95%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 96%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 97%, más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 98%, y todavía más preferiblemente una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos aproximadamente 99% con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia del polipéptido PRO de la secuencia nativa de longitud completa como se describe en el presente documento, una secuencia del polipéptido PRO de la secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se describe en el presente documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin la secuencia señal, como se describe en el presente documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido PRO de longitud completa como se describe en el presente documento. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

[0042] Normalmente, los polinucleótidos variantes de PRO tienen al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, con frecuencia al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, con más frecuencia al menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

[0043] Un “porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico” con respecto a las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido PRO identificadas en el presente documento, se define como el porcentaje de nucleótidos en

una secuencia candidata, que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico del PRO de interés, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo. El alineamiento para el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico, se puede lograr de varias formas que conoce el experto en la materia, por ejemplo, usando software para ordenador públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Sin embargo, para el propósito del presente documento, los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico se generan usando el programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la siguiente tabla 1. El programa de ordenador de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc., y el código fuente mostrado en la tabla 1 se ha presentado con la documentación para el usuario en la oficina de Copyright de EE.UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado con registro de Copyright de EE.UU. n° TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público en Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la siguiente tabla 1. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para usar en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX digital V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0044] En situaciones en las que se usa ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico C dada con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula como sigue:

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

en donde W es el número de nucleótidos puntuados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en este alineamiento del programa de C y D, y donde Z es el número total nucleótidos en D. Se observará que cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D con respecto a C. Como ejemplos de cálculos de % de identidad de secuencia de ácido

nucleico, las tablas 4 y 5 muestran como calcular el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico denominada “ADN de comparación” con respecto a la secuencia de ácido nucleico denominada “PRO-ADN”, en la que “PRO-ADN” representa una secuencia de ácido nucleico que codifica un PRO hipotético de interés, “ADN de comparación” representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico frente a la que se compara la molécula de ácido nucleico “PRO-ADN” de interés, y “N”, “L” y “V” representa cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos.

[0045] Salvo que se manifieste específicamente otra cosa, todos los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico usados en el presente documento, se obtienen como se acaba de describir en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa de ordenador ALIGN-2. Sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico también se pueden obtener como se describe a continuación, usando el programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul y col., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se establecen como valores por defecto. Los que no se establecen como valores por defecto, es decir, los parámetros que se pueden ajustar, se establecen con los siguientes valores: extensión de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se usa WU-BLAST-2, un valor de % de identidad de secuencia de ácido nucleico se determina dividiendo (a) el número de coincidencias de nucleótidos idénticos entre la secuencia de ácido nucleico 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 frente a la cual se está comparando la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés, que puede ser un polipéptido variante de PRO) determinado 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 expresión “una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico A que tiene una identidad de secuencia de ácido nucleico de al menos 80% con respecto a la secuencia de ácido nucleico B”, la secuencia de ácido nucleico A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácido nucleico B es la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés.

[0046] El % de identidad de secuencia de ácido nucleico también se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., *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>. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en el que todos estos parámetros de búsqueda se establecen como valores por defecto incluyendo, por ejemplo, no enmascaramiento = si, cadena = todas, incidencias esperadas =10, longitud de complejidad baja mínima = 15/5, valor e multi-paso = 0,01, constante para multi-paso = 25, abandono para alineamiento con huecos final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

[0047] En situaciones en las que se usa NCBI-BLAST2 para las comparaciones de secuencias, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico C dada con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácido nucleico C dada que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico con respecto a, con o frente a una secuencia de ácido nucleico D dada) se calcula como sigue:

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

[0048] En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de PRO son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido PRO activo y que son capaces de hibridar, preferiblemente en condiciones de hibridación y lavado restrictivas, con secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO de longitud completa como se describe en el presente documento. Los polipéptidos variantes de PRO pueden ser aquellos que son codificados por un polinucleótido variante de PRO.

[0049] El término “positivos”, en el contexto de la comparación de secuencias realizada como se ha descrito antes, incluye restos en las secuencias comparadas que no son idénticos pero tienen propiedades similares (p. ej., como resultado de sustituciones conservativas, véase la tabla 6 a continuación). Para los propósitos del presente documento, el valor de % de positivos se determina dividiendo (a) el número de restos de aminoácidos que puntúan un valor positivo entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada de la secuencia del polipéptido PRO nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia de aminoácidos frente a la que se compara la secuencia de polipéptido PRO) determinado en la matriz de BLOSUM62 de WU-BLAST-2, entre (b) el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO de

interés.

[0050] Salvo que se manifieste específicamente otra cosa, el valor de % de positivos se calcula como se describe en el párrafo inmediatamente precedente. Sin embargo, en el contexto de la identidad de secuencia de aminoácidos, las comparaciones llevadas a cabo como se ha descrito antes para ALIGN-2 y NCBI-BLAST-2, incluyen restos de aminoácidos en las secuencias comparadas que no solo son idénticos sino también los que tienen propiedades similares. Los restos de aminoácidos que puntúan un valor positivo respecto a un resto de aminoácidos de interés son aquellos que son idénticos al resto de aminoácido de interés o son una sustitución preferida (como se define en la siguiente tabla 6) del resto de aminoácido de interés.

[0051] Para comparaciones de secuencias de aminoácidos usando ALIGN-2 o NCBI-BLAST2, el valor de % positivos de una secuencia de aminoácidos A dada con respecto, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un determinado % de positivos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula como sigue:

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

en donde X es el número de restos de aminoácidos que puntúan un valor positivo como se ha definido antes por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 o NCBI-BLAST2 en este alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se observará 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 con respecto a B no será igual al % de positivos de B con respecto a A.

[0052] “Aislado” cuando se usa para describir los diferentes polipéptidos descritos en el presente documento, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna, usando un secuenciador de vaso giratorio, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie, o preferiblemente tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido in situ en células recombinantes, puesto que

al menos un componente del entorno natural del polipéptido PRO no estará presente. Sin embargo, normalmente el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0053] Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica el polipéptido PRO u otro ácido nucleico que codifica el polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante, con la cual está normalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido es distinta en la forma o marco en el que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido se distinguen de la molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido específico como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido, donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una posición cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0054] La expresión “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente unida en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas usan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0055] El ácido nucleico está “operativamente unido” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está operativamente unida al ADN para un polipéptido, si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificante si está colocado de forma que facilite la traducción. En general, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante el ligado en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan adaptadores o conectores oligonucleótidos sintéticos, de acuerdo con la práctica convencional.

[0056] El término “anticuerpo” se usa en su sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales dirigidos contra PRO sencillos (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpo dirigidas contra PRO con especificidad poliepitópica, anticuerpos dirigidos contra PRO monocatenarios y fragmentos de anticuerpo dirigido contra PRO (véase a continuación). La expresión “anticuerpo monoclonal” como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades minoritarias.

[0057] La “restricción” de las reacciones de hibridación puede determinarlas fácilmente el experto en la técnica, y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas mayores para la reasociación adecuada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas menores. En general, la hibridación depende de la capacidad del ADN desnaturalizado para reasociarse cuando hay presentes cadenas complementarias en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuando mayor es el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede usar. Como resultado, se sigue que las temperaturas relativas más altas tenderán a hacer las condiciones de reacción más restrictivas, mientras que las temperaturas menores harán que sean menos restrictivas. Para detalles adicionales y explicación de la restricción de las reacciones de hibridación, véase, Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley Interscience Publishers, 1995).

[0058] Las “condiciones restrictivas” o “condiciones muy restrictivas” como se definen en el presente documento, se pueden identificar como aquellas que: (1) usan concentración iónica baja y temperatura alta para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecilsulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) usan durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5

[0059] con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) usan 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 disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón tratado con ultrasonidos (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 alta restricción que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0060] Las "condiciones de restricción moderadas" se pueden identificar como describen Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de disolución de lavado y condiciones de hibridación (p. ej., temperatura, concentración iónica y % de SDS) menos restrictivas que las descritas antes. Un ejemplo de condiciones de restricción moderadas es incubación durante una noche a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fraccionado y desnaturalizado 20 mg/ml, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia reconocerá como ajustar la temperatura, concentración iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

[0061] La expresión "epítipo etiquetado" cuando se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido PRO fusionado con un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que se puede hacer un anticuerpo, y es suficientemente corto de modo que no interfiera con la actividad del polipéptido al que está fusionado. El polipéptido etiqueta preferiblemente también es bastante único de modo que el anticuerpo no tienen sustancialmente reacciones cruzadas con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados, en general tienen al menos 6 restos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 20 restos de aminoácidos).

[0062] Tal como se usa en el presente documento, el término "inmuno adhesina" designa una molécula de tipo anticuerpo que combina la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento del antígeno y sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga") y una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un

receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0063] “Activo” o “actividad” para los propósitos del presente documento, se refieren a una forma o formas de un polipéptido PRO que retienen una actividad biológica y/o inmunológica del PRO natural o nativo, en donde actividad “biológica” se refiere a una función biológica (sea inhibidora o estimuladora) causada por un PRO nativo o natural distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un PRO nativo o natural, y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que posee un PRO nativo o natural.

[0064] El término “antagonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o totalmente una actividad biológica del polipéptido PRO nativo descrito en el presente documento. De una forma similar, el término “agonista” se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que mimetiza una actividad biológica de un polipéptido PRO nativo descrito en el presente documento. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos PRO nativos, péptidos, oligonucleótidos de sentido contrario, moléculas orgánicas pequeñas, etc. agonistas o antagonistas. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO pueden comprender poner en contacto un polipéptido PRO con una molécula candidata de agonista o antagonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido PRO.

[0065] “Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (reducir) la afección o trastorno patológico al que va dirigido. Los que necesitan el tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los que son propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se puede prevenir el trastorno.

[0066] La administración “crónica” se refiere a la administración del o de los agentes de un modo continuo en contraposición a un modo agudo, para así mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado. La administración “intermitente” es el tratamiento que no se hace de forma consecutiva sin interrupción, sino que tiene naturaleza cíclica.

[0067] “Mamífero” para el propósito de tratamiento se refiere a cualquier animal

clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, deportes o mascotas, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

5 **[0068]** La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y la consecutiva en cualquier orden.

[0069] “Vehículos” tal como se usa en el presente documento, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos para la
10 célula o mamífero que se va a exponer al mismo en las dosificaciones y concentraciones usadas. A menudo el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; los antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular
15 (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de tipo azúcares tales como
20 manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

[0070] Los “fragmentos de anticuerpos” comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab',
25 F(ab')₂, y Fv; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos lineales (Zapata y col., *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de una cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0071] La digestión por la papaína de los anticuerpos produce 2 fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab”, cada uno con un solo sitio de
30 unión al antígeno, y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento F(ab')₂ que tiene 2 sitios de combinación con antígeno, y todavía es capaz de hibridación con el antígeno.

[0072] “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo
35 de reconocimiento y unión al antígeno. Esta región consiste en un dímero de un

dominio variable de una cadena pesada y una ligera en asociación estrecha y no covalente. Es en esta configuración en la que las 3 CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H - V_L . Colectivamente, las 6 CDR confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo 3 CDR específicas para un antígeno) tiene capacidad para reconocer y unirse al antígeno, pero con una afinidad menor que el sitio de unión entero.

[0073] 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 unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el o los restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se producían originalmente como parejas de los fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0074] Las “cadenas ligeras” de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a una de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0075] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay 5 clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM; y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos)), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

[0076] Los fragmentos de anticuerpo “Fv de una cadena” o “sFv” comprenden los dominios V_H y V_L de anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una sola cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv además comprende un conector de polipéptido entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, Rosenberg and Moore, eds., Springer-Verlag: New York, pág. 269-315 (1994).

[0077] El término “anticuerpos biespecíficos” se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con 2 sitios de unión al 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). Mediante el uso de un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios están forzados a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear 2 sitios de unión al antígeno. Se describen 5 dianticuerpos con más detalle, por ejemplo en los documentos EP 404097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0078] Un anticuerpo “aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían con los usos de 10 diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de 95% en peso del anticuerpo, determinado por el procedimiento de Lowry y más preferiblemente más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna usando 15 un secuenciador de vaso giratorio, o (3) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie, o preferiblemente tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ en células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, normalmente el anticuerpo aislado se preparará 20 mediante al menos una etapa de purificación.

[0079] La palabra “marcador” cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto detectable u otra composición que está conjugada directa o indirectamente con el anticuerpo de modo que genera un anticuerpo “marcado”. El marcador puede ser detectable por sí mismo (p. ej., marcadores radioisótopos o 25 marcadores fluorescentes), o en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto sustrato o composición que es detectable.

[0080] Por “fase sólida” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir un anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas abarcadas en el presente documento, incluyen las formadas parcial o enteramente de 30 vidrio (p. ej., vidrio de porosidad controlados), polisacáridos (p. ej., agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En algunas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (p. ej., una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua 35 de partículas discretas, tal como se describe en la patente de EE.UU. n° 4.275.149.

[0081] Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de diferentes tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos, que es útil para el suministro de un fármaco (tal como un polipéptido PRO o anticuerpo contra el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma normalmente se disponen en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

[0082] Una “molécula pequeña” se define en el presente documento como que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 dalton.

Tabla 1

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * 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] = {
/*  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},
/* 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, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0, -5, 0, 0, -5, -2, 0, -2, 0, 5, -3, 0, 1, _M, -1, 1, 3, 0, 0, 0, -2, -3, 0, -4, 0},
/* 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, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M, _M},
/* P */ { 1, -1, -3, -1, -1, -5, -1, 0, -2, 0, -1, -3, -2, -1, _M, 6, 0, 0, 1, 0, 0, -1, -6, 0, -5, 0},
/* Q */ { 0, 1, -5, 2, 2, -5, -1, 3, -2, 0, 1, -2, -1, 1, _M, 0, 4, 1, -1, -1, 0, -2, -5, 0, -4, 3},
/* R */ {-2, 0, -4, -1, -1, -4, -3, 2, -2, 0, 3, -3, 0, 0, _M, 0, 1, 6, 0, -1, 0, -2, 2, 0, -4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0, -3, 1, -1, -1, 0, 0, -3, -2, 1, _M, 1, -1, 0, 2, 1, 0, -1, -2, 0, -3, 0},
/* T */ { 1, 0, -2, 0, 0, -3, 0, -1, 0, 0, 0, -1, -1, 0, _M, 0, -1, -1, 1, 3, 0, 0, -5, 0, -3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0, -2, -2, -2, -2, -1, -1, -2, 4, 0, -2, 2, 2, -2, _M, -1, -2, -2, -1, 0, 0, 4, -6, 0, -2, -2},
/* W */ {-6, -5, -8, -7, -7, 0, -7, -3, -5, 0, -3, -2, -4, -4, _M, -6, -5, 2, -2, -5, 0, -6, 17, 0, 0, -6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, _M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3, -3, 0, -4, -4, 7, -5, 0, -1, 0, -4, -1, -2, -2, _M, -5, -4, -4, -3, -3, 0, -2, 0, 0, 10, -4},
/* 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}
};

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
*/
#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();

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  if (dna)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  else
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

...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
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        coll[yy] -= ins0 + ins1*(len1-yy);
    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;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 *
 * 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()
 * nums() -- 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()
{
    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();
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

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

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

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

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

```

...getmat

pr_align

Tabla 1 (cont.)

```

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

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

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

```

...pr_align

dumpblock

Tabla 1 (cont.)

...dumpblock

```

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

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                nums
{
    int    ix;        /* index in out[] holding seq line */

    char    nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

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

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

```

Tabla 1 (cont.)

...putline

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

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

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

```

stars

Tabla 1 (cont.)

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

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;
    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}
```

stripname

Tabla 1 (cont.)

...getseq

```

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

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

```

```

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

```

g_alloc

```

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */

```

```

readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

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

```

readjmps

Tabla 1 (cont.)

...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[dmax].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 jmps
*/
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;
}
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

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

PRO XXXXXXXXXXXXXXXXXX (Longitud = 15 aminoácidos)

Comparación XXXXXXYYYYYYYYY (Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de restos de aminoácidos que coinciden exactamente entre las 2 secuencias de polipéptido determinado por ALIGN-2) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO) =

5 dividido entre 15 = 33,3%

Tabla 3

PRO XXXXXXXXXXXXXXXXXX (Longitud = 10 aminoácidos)

Proteína de XXXXXXYYYYYYYYZZYZ (Longitud = 15 aminoácidos)

comparación

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de restos de aminoácidos que coinciden exactamente entre las 2 secuencias de polipéptido determinado por ALIGN-2) dividido entre (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido PRO) =

5 dividido entre 10 = 50%

5

Tabla 4

PRO-ADN NNNNNNNNNNNNNNNN (Longitud = 14 nucleótidos)

ADN de NNNNNNLLLLLLLLLLLL (Longitud = 16 nucleótidos)

comparación

% de identidad de secuencia de ácido nucleico =

(el número de nucleótidos que coinciden exactamente entre las 2 secuencias de ácido nucleico determinado por ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico PRO-ADN) =

6 dividido entre 14 = 42,9%

Tabla 5

PRO-ADN NNNNNNNNNNNN (Longitud = 12 nucleótidos)

ADN de NNNLLLLVV (Longitud = 9 nucleótidos)

comparación

% de identidad de secuencia de ácido nucleico =

(el número de nucleótidos que coinciden exactamente entre las 2 secuencias de ácido nucleico determinado por ALIGN-2) dividido entre (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico PRO-ADN) =

4 dividido entre 12 = 33,3%

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Polipéptidos PRO de longitud completa

[0083] La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recién
5 identificadas y aisladas que codifican polipéptidos denominados en la presente
solicitud polipéptidos PRO. En particular, se han identificado y aislado ADNc que
codifican diferentes polipéptidos PRO, como se describe con más detalle en los
siguientes ejemplos. Hay que observar que las proteínas producidas en ciclos de
expresión separados pueden dar números de PRO diferentes pero el número UNQ es
10 único para cualquier ADN dado y la proteína codificada, y no cambiará. Sin embargo,
para mayor simplicidad, en la presente memoria descriptiva, la proteína codificada por
las moléculas de ácidos nucleico nativas de longitud completa descritas en el presente
documento, así como otros homólogos nativos y variantes incluidas en la definición
anterior de PRO, se denominarán como “PRO/número”, independientemente del
15 origen o el modo de preparación.

[0084] Como se describe en los siguientes ejemplos, se han depositado diferentes
clones de ADNc en el ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de estos clones las
puede determinar fácilmente el experto en la materia mediante secuenciación del clon
depositado usando procedimientos rutinarios en la técnica. La secuencia de
20 aminoácidos predicha se puede determinar a partir de la secuencia de nucleótidos
usando la experiencia rutinaria. Para los polipéptidos PRO y los ácidos nucleicos
codificantes descritos en el presente documento, los autores de la invención han
identificado lo que creen que es el marco de lectura mejor identificable con la

información de secuencia disponible en el momento.

Polipéptidos PRO1186 de longitud completa

[0085] La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recién identificadas y aisladas que codifican polipéptidos denominados en la presente solicitud PRO1186. En particular, se ha identificado y aislado el ADNc que codifica un polipéptido PRO1186, como se describe con más detalle en los siguientes ejemplos.

[0086] Usando los programas informáticos de alineamiento de secuencias WU-BLAST2, se ha encontrado que un PRO1186 de secuencia nativa de longitud completa (mostrada en la figura 2 y el SEC ID n°: 4) tiene una identidad de secuencia de aminoácidos con la proteína A de veneno del veneno de *Dendroaspis polylepsis polylepsis*. Por consiguiente, actualmente se cree que PRO1186 descrito en la presente solicitud es un miembro recién identificado de la proteína A de veneno y puede compartir un mecanismo relacionado.

B. Variantes del polipéptido PRO

[0087] Además de los polipéptidos PRO de secuencia nativa de longitud completa descritos en el presente documento, se contempla que se pueden preparar variantes de PRO. Las variantes de PRO se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos adecuados en el ADN de PRO, y/o por síntesis del polipéptido PRO deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos postraduccionales del PRO, tal como cambiar el número o posición de sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje a la membrana.

[0088] Las variaciones en el PRO de secuencia nativa de longitud completa o en diferentes dominios del polipéptido PRO descrito en el presente documento, se pueden hacer, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y guías de mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido PRO, que dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos de PRO comparado con el PRO de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de al menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios de PRO. La guía para determinar qué resto de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa a la actividad deseada, se puede encontrar comparando la secuencia del PRO con la de moléculas de proteína homólogas conocidas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en regiones con homología alta. Las sustituciones de aminoácidos pueden dar como resultado la sustitución de un

aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativas. Las inserciones o deleciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar haciendo sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y ensayando la actividad de las variantes que resultan respecto a la presentada por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

[0089] En el presente documento se proporcionan fragmentos de polipéptido PRO. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o extremo C, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud completa. Algunos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO.

[0090] Los fragmentos de PRO se pueden preparar por cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un procedimiento alternativo implica generar fragmentos de PRO por digestión enzimática, p. ej., por tratamiento de la proteína con una enzima que se sabe que escinde proteínas en sitios definidos por restos de aminoácidos particulares, o por digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se usan en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de polipéptido PRO comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO nativo descrito en el presente documento.

[0091] En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la tabla 6 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones de ejemplo en la tabla 6, o como se describen con más detalle a continuación con referencia a las clases de aminoácidos, y se seleccionan los productos.

Tabla 6

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

[0092] Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del polipéptido PRO se llevan a cabo seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto en mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en la zona de la sustitución, por ejemplo, en una conformación en lámina o hélice, (b) la carga o la hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos basándose en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;

(3) ácidos: asp, glu;

(4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;

(5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

5 **[0093]** Las sustituciones no conservativas implicarán cambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también se pueden introducir en los sitios de sustituciones conservativas, o más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

[0094] Las variaciones se pueden hacer usando procedimientos conocidos en la
10 técnica tales como mutagénesis (dirigida) mediada por oligonucleótido, barrido de alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida [Carter y col., *Nucl. Acids Res.*, 13: 4331 (1986); Zoller y col., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)], mutagénesis de casete [Wells y col., *Gene*, 34:315 (1985)], mutagénesis de selección por restricción [Wells y col., *Philos. Trans. R. Soc. London Sera.* 317:415 (1986)] u otras técnicas
15 conocidas, se pueden realizar en el ADN clonado para producir el ADN variante de PRO.

[0095] El análisis por barrido de aminoácido también se puede usar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos están los aminoácidos neutros, relativamente
20 pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. Normalmente, la alanina es un aminoácido de barrido preferido en este grupo, porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que se altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989)]. También se prefiere normalmente la alanina porque es el
25 aminoácido más común. Además, se encuentra con frecuencia tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman y Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no da cantidades adecuadas de variante, se puede usar un aminoácido isostérico.

C. Modificaciones de PRO

30 **[0096]** Las modificaciones covalentes de PRO están incluidas dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos diana de un polipéptido PRO con un agente orgánico derivatizante que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N o C
35 terminales del PRO. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para el entrecruzamiento del polipéptido PRO a una matriz o superficie de soporte

insoluble en agua para usar en el procedimiento de purificación de anticuerpos anti-PRO, y viceversa. Los agentes de entrecruzamiento usados habitualmente incluyen, p. ej., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, 5 incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como 3-[(p-azidofenil)-ditio]propioimidato de metilo.

[0097] Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente, 10 hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de restos 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 y Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y amidación del cualquier grupo carboxilo C-terminal.

15 **[0098]** Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO incluida en el alcance de esta invención, comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del polipéptido. “Alterar el patrón de glicosilación nativo” para los propósitos del presente documento significa eliminar uno o más restos carbohidrato encontrados en el PRO de 20 secuencia nativa (eliminando el sitio de glicosilación subyacente o eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no estaban presentes en el PRO de secuencia nativa. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas que implican un cambio en la naturaleza y proporciones de los diferentes restos de carbohidratos presentes.

25 **[0099]** La adición de sitios de glicosilación en el polipéptido PRO se puede llevar a cabo alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede hacer, por ejemplo, mediante la adición o sustitución por uno o más restos serina o treonina del polipéptido PRO de secuencia nativa (para los sitios de glicosilación unidos a O). La 30 secuencia de aminoácidos de PRO se puede alterar opcionalmente mediante cambios a nivel del ADN, en particular mediante mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO en bases preseleccionadas, de modo que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0100] Otro medio de aumentar el número de restos de carbohidratos en el polipéptido PRO es por acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al 35 polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la materia, p. ej., en el

documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981).

[0101] La eliminación de restos de carbohidrato presentes en el polipéptido PRO se puede llevar a cabo química o enzimáticamente o mediante sustitución por mutación
5 de codones que codifican los restos de aminoácido que sirven de dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación química son conocidas en la materia y las describen, por ejemplo, Hakimuddin, y col., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y Edge y col., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La escisión enzimática de restos de carbohidrato en los polipéptidos se puede lograr usando una variedad de endo y
10 exoglicosidasas como describen Thotakura y col., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

[0102] Otro tipo de modificación covalente del PRO comprende la unión del polipéptido PRO a una variedad de polímeros no proteicos, p. ej., polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma expuesta en las patentes de EE.UU. nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

15 **[0103]** El PRO de la presente invención también se puede modificar de una manera que forme una molécula quimérica que comprende el PRO fusionado a otra secuencia de aminoácidos o polipéptido heteróloga.

[0104] En una realización, dicha molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se
20 puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo etiqueta en general se pone en el extremo amino o carboxilo del PRO. La presencia de dichas formas de epítipo etiquetado del PRO se pueden detectar usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, el proporcionar el epítipo etiqueta permite que el PRO sea purificado fácilmente por purificación por afinidad usando un anticuerpo anti-
25 etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epítipo etiqueta. Se conocen bien en la técnica diferentes polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-His-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7,
30 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan y col., *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; y la etiqueta glicoproteína D (gD) del virus Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky y col., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hopp y col., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin y col., *Science*, 255:192-194 (1992)]; un
35 péptido epítipo de α -tubulina [Skinner y col., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166

(1991)]; y la etiqueta péptido proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

[0105] En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO con una inmunoglobulina o una región particular de una
 5 inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada una “inmunoadhesina”) dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig preferiblemente incluyen la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido PRO en el lugar de al menos una región variable en una molécula de Ig. En una
 10 realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas véase también la patente de EE.UU. nº 5.428.130 presentada el 27 de junio, 1995.

D. Preparación del PRO

15 **[0106]** La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de PRO mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico de PRO. Se contempla, por supuesto, que se pueden usar procedimientos alternativos que son conocidos en la técnica, para preparar el PRO. Por ejemplo, la secuencia de PRO, o partes de la misma, se pueden producir por síntesis de
 20 péptido directa usando técnicas de fase sólida [véase p. ej., Stewart y col., *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 puede llevar a cabo usando técnicas manuales o mediante síntesis automática. La síntesis automática se puede llevar a cabo, por ejemplo con un sintetizador Applied Biosystems Peptide
 25 Synthesizer (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado diferentes partes de PRO y combinarlas usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el PRO de longitud completa.

1. Aislamiento del ADN que codifica PRO

[0107] El ADN que codifica PRO se puede obtener a partir de una biblioteca de
 30 ADNc preparada a partir de tejido que se cree que tiene el ARNm de PRO y que lo expresa en un nivel detectable. Por consiguiente, los ADN del PRO humano se pueden obtener de forma conveniente a partir de bibliotecas de ADNc preparadas a partir de tejidos humanos, como se describe en los ejemplos. El gen que codifica el PRO también se puede obtener a partir de una genoteca o por procedimientos sintéticos
 35 conocidos (p. ej., síntesis de ácido nucleico automática).

[0108] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos contra PRO u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado de bibliotecas de ADNc o genómicas con la sonda seleccionada se puede llevar a cabo usando procedimientos estándar, como describen Sambrook y col., véase antes. Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el PRO es usar la metodología de la PCR. [Sambrook y col, véase antes; Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995).

[0109] Los siguientes ejemplos describen técnicas para el cribado de bibliotecas de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben tener una longitud suficiente y deben ser suficientemente no ambiguas para que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido preferiblemente se marca de modo que se pueda detectar tras la hibridación con el ADN en la biblioteca que se está cribando. Los procedimientos de marcaje son conocidos en la materia, e incluyen el uso de radiomarcadores tales como ATP marcado con ^{32}P , biotilación o marcado enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la restricción moderada y la restricción alta, se proporcionan en Sambrook y col., véase antes.

[0110] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácidos o nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa, se puede determinar usando procedimientos conocidos en la técnica como se describen en el presente documento.

[0111] El ácido nucleico que tiene secuencia codificante de proteína se puede obtener mediante cribado de bibliotecas de ADNc o genómicas seleccionadas, usando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en el presente documento para la primera vez, y, si es necesario, usando procedimientos de extensión de cebador convencionales como describen Sambrook y col., véase antes, para detectar precursores y procesar intermedios de ARNm que pueden no dar la transcripción inversa a ADNc.

2. Selección y transformación de células hospedadoras

[0112] Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en el presente documento para producir el polipéptido PRO, y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según convenga

para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, temperatura, pH y similares, las puede seleccionar el experto en la materia sin excesiva experimentación. En general, se pueden encontrar principios, protocolos y técnicas
5 prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., véase antes.

[0113] Los procedimientos de transfección de células eucariotas y de transformación de células procariotas son conocidos para los expertos en la materia,
10 por ejemplo, el tratamiento con CaCl_2 , CaPO_4 , mediado por liposoma y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas estándar adecuadas para dichas células. El tratamiento con calcio usando cloruro de calcio como describen Sambrook y col., véase antes, o la electroporación se usan en general para procariotas. Se usa la infección con
15 *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de determinadas células vegetales, como describen Shaw y col., *Gene*, 23: 315 (1983) y en el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede usar el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y Van der Eb, *Virology* 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos
20 generales de las transformaciones con sistemas hospedadores de células de mamífero en la patente de EE.UU. nº 4.399.216. Las transformaciones en levaduras normalmente se llevan a cabo por el procedimiento de Van Solingen y col., *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden usar otros procedimientos para introducir el ADN en células, tales como la
25 microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, p. ej., polibreno o poliornitina. Para diferentes técnicas de transformación de células de mamífero, véase Keown y col., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., *Nature*, 336: 348-352 (1988).

[0114] Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los
30 vectores del presente documento, incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas incluyen, pero no se limitan a eubacterias, tales como organismos Gram positivos o Gram negativos, por ejemplo enterobacteriáceas tales como *E. coli*. Están disponibles al público diferentes cepas de *E. coli*, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa
35 de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325); y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células

hospedadoras procariontas adecuadas incluyen enterobacteriáceas tales como *Escherichia*, p. ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p. ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p. ej., *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p. ej., *B. licheniformis* 41P descrito en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. La cepa W3110 es un hospedador particularmente preferido o el hospedador original, porque es una cepa hospedadora común para las fermentaciones de productos de ADN recombinantes. Preferiblemente, la célula hospedadora 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 del hospedador, incluyendo los ejemplos de dichas hospedadoras la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo de *tonA*; cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo de *tonA ptr3*; cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo de *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*; cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo de *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; cepa de *E. coli* W3110 4084, que es la cepa 37D6 con una mutación por delección de *degP* de no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la patente de EE.UU. n° 4.946.783 presentada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación in vitro, p. ej., PCR u otras reacciones de polimerasa de ácidos nucleicos.

[0115] Además de procariontas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son hospedadoras de expresión o clonación adecuados para vectores que codifican el polipéptido PRO. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota usado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadoras *Kluyveromyces* (patente de EE.UU. n° 4.943.529; Fleer y col., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) tales como, p. ej., *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., *Bio/Technology*, 8:135(1990)), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); *Candida*;

Trichoderma reesia (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, p. ej., *Neurospora*, *Penicillium*,
 5 *Tolyptocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y hospedadoras *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]; Tilburn y col., *Gene*, 26: 205-221 [1983]; Yelton y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en el
 10 presente documento e incluyen, pero no se limitan a levaduras capaces de crecer en metanol, seleccionadas de los géneros que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Se puede encontrar una lista de especies específicas que son ejemplo de esta clase de levaduras en C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

15 **[0116]** Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO glicosilado, se obtienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células de plantas. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles, incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Los ejemplos más
 20 específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen. Virol.*, 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75);
 25 células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). Se considera que la selección de la célula huésped adecuada depende del experto en la técnica.

3. Selección y uso de un vector replicable

30 **[0117]** El ácido nucleico (p. ej., ADNc o ADN genómico) que codifica el PRO se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Están disponibles al público diferentes vectores. El vector puede ser, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácido nucleico adecuada se puede insertar en el vector mediante una variedad de
 35 procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasas de

restricción adecuados, usando técnicas conocidas en la materia. Los componentes del vector en general incluyen, pero sin limitar, una o más de una secuencia 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 5 vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes usa técnicas de ligado estándar que son conocidas para el experto en la materia.

[0118] El PRO se puede producir de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en 10 el extremo N de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser 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, penicilinas, lpp, o secuencias líder de enterotoxina II estable al calor. Para la secreción de levaduras, la 15 secuencia señal puede ser, p. ej., la secuencia líder de invertasa de levadura, secuencia líder de factor alfa (incluyendo secuencia líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la patente de EE.UU. n° 5.010.182), o secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la secuencia señal descrita 20 en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, se pueden usar secuencias señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como secuencias líder secretoras víricas.

[0119] Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una 25 secuencia de ácido nucleico que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y diferentes orígenes víricos (SV40, poliovirus, adenovirus, 30 VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

[0120] Los vectores de expresión y clonación normalmente contendrán un gen de selección, denominado también un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, p. ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias 35 auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en el medio complejo,

p. ej., el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0121] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para absorber el ácido nucleico que codifica el PRO tal como DHFR o timidina quinasa.

5 Una célula hospedadora adecuada cuando se usa DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como describen Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para usar en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb y col., *Nature*, 282: 39 (1979); Kingsman y col., *Gene*, 7: 141

10 (1979); Tschemper y col., *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)].

[0122] Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor operativamente unido a la secuencia de ácido nucleico que codifica PRO para dirigir la

15 síntesis del ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de potenciales células hospedadoras son conocidos. Los promotores adecuados para usar en hospedadorshospedadoras procariontas incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang y col., *Nature*, 275: 615 (1978); Goeddel y col., *Nature*, 281: 544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel,

20 *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 (1980); documento EP 36.776], y promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25 (1983)]. Los promotores para usar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente unida al ADN que codifica el polipéptido PRO.

25 **[0123]** Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para usar en hospedadoras de tipo levaduras incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman y col., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess y col., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7: 149 (1968); Holland, *Biochemistry*, 17: 4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato

30 descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[0124] Otros promotores de levaduras que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa

35 ácida, enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del nitrógeno,

metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables del uso de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para usar en la expresión en levaduras se describen con más detalle en el documento EP 73.657.

[0125] La transcripción de PRO a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de genomas de virus tales como poliomavirus, virus de la viruela de aves de corral (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), papilomavirus bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B, y Virus de simio 40 (SV40); mediante promotores de mamífero heterólogos, p. ej., el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina; y mediante promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

[0126] La transcripción de un ADN que codifica el PRO por eucariotas superiores se puede aumentar insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de actuación en cis del ADN, normalmente de aproximadamente 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar la transcripción. Se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado final del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado final del origen de replicación, y potenciadores adenovíricos. El potenciador se puede empalmar en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica PRO, pero preferiblemente se sitúa en un sitio 5' del promotor.

[0127] Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanas, 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 de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica PRO.

[0128] Se describen otros procedimientos más, vectores y células hospedadoras adecuados para adaptar a la síntesis de PRO en cultivos de células de vertebrados recombinantes, en Gething y col., *Nature*, 293: 620-625 (1981); Mantei y col., *Nature*,

281: 40-46(1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058.

4. Detección de amplificación/expresión de genes

[0129] La amplificación y/o expresión de genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia Southern convencional, transferencia
5 Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 (1980)], transferencia en mancha (análisis de ADN) o hibridación in situ, usando una sonda marcada de forma adecuada, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN,
10 dúplex de ARN y 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 forma que tras la formación del dúplex en la superficie, se puede detectar la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

[0130] Alternativamente, la expresión de genes se puede medir por
15 procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejidos, y hacer el ensayo del cultivo celular o de fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de muestra de fluidos, pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. De forma
20 conveniente, 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 el presente documento o contra la secuencia exógena fusionada al ADN de PRO y que codifica un epítipo específico de anticuerpo.

5. Purificación del polipéptido

25 **[0131]** Las formas de PRO se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisatos de las células hospedadoras. Si están unidas a membrana, se pueden liberar de la membrana usando una disolución de detergente adecuada (p. ej., TRITON-X 100) o por escisión enzimática. Las células usadas en la expresión de PRO se pueden alterar por diferentes medios físicos o químicos, tales como en ciclos de congelación-
30 descongelación, ultrasonidos, alteración mecánica, o agentes de lisis celular.

[0132] Puede ser conveniente purificar el PRO de las proteínas celulares o polipéptidos recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en
35 sílice o en una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; enfoque

cromatográfico; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de Proteína A-Sepharosa para separar los contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir las formas de epítipo etiquetado del PRO. Se pueden usar diferentes procedimientos de purificación de proteínas y dichos procedimientos 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: New York. 1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del PRO particular producido.

10 E. Usos de PRO

[0133] Las secuencias de nucleótidos (o sus complementarias) que codifican PRO tienen diferentes aplicaciones en la técnica de la biología molecular, incluyendo los usos como sondas de hibridación, en la cartografía de cromosomas y genes y en la generación de ARN y ADN de sentido contrario. El ácido nucleico de PRO también será útil para preparar polipéptidos PRO por técnicas recombinantes descritas en el presente documento.

[0134] El gen de PRO de secuencia nativa de longitud completa, o partes del mismo, se pueden usar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de PRO de longitud completa o para aislar también otros ADNc (por ejemplo, los que codifican las variantes naturales de PRO o PRO de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada respecto a la secuencia de PRO nativa descrita en el presente documento. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivar de regiones al menos parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa en la que esas regiones se pueden determinar sin excesiva experimentación o de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de la secuencia nativa de PRO. A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá aislar la región codificante del gen de PRO usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación se pueden marcar mediante una variedad de marcadores, incluyendo radionucleótidos como ^{32}P o ^{35}S , o marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda mediante sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen de PRO de la presente invención, se pueden usar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm, para determinar con

que miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen con más detalle en los siguientes ejemplos.

[0135] Se puede usar igualmente cualquier secuencia de EST descrita en la presente solicitud como sonda, usando los procedimientos descritos en el presente
5 documento.

[0136] Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de PRO incluyen oligonucleótidos de sentido contrario o de sentido directo que comprende una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (sea ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm de PRO (de sentido directo) o ADN de PRO (de sentido
10 contrario) diana. Los oligonucleótidos de sentido contrario u de sentido directo, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de PRO. Dicho fragmento en general comprende al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido de sentido contrario o uno de sentido directo,
15 basado en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada, se describe, por ejemplo, en Stein y Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, 1988) y van der Krol y col. (*BioTechniques* 6:958, 1988).

[0137] La unión de oligonucleótidos de sentido contrario u de sentido directo a secuencias de ácido nucleico diana da como resultado la formación de dúplex que
20 bloquean la transcripción o traducción de la secuencia diana por uno de varios medios, incluyendo la degradación potenciada de los dúplex, terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. Por lo tanto, los oligonucleótidos de sentido contrario se pueden usar para bloquear la expresión de proteínas PRO. Los oligonucleótidos de sentido contrario u de sentido directo comprenden además
25 oligonucleótidos que tienen cadenas principales de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otras uniones de azúcares, tales como las descritas en el documento WO 91/06629) y en las que dichas uniones de azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones de azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero retienen la especificidad de
30 secuencia para ser capaces de unirse a secuencias de nucleótidos diana.

[0138] Otros ejemplos de oligonucleótidos de sentido directo o de sentido contrario incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a restos orgánicos, tales como los descritos en el documento WO 90/10048, y otros restos que aumentan la afinidad del oligonucleótido para una secuencia de ácido nucleico diana,
35 tal como la poli-(L-lisina). Además también se pueden unir agentes intercalantes, tales

como elipticina y agentes alquilantes o complejos metálicos a oligonucleótidos de sentido directo o de sentido contrario para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido de sentido directo o de sentido contrario para la secuencia de nucleótidos diana.

5 **[0139]** Los oligonucleótidos de sentido directo o de sentido contrario se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por cualquier procedimiento de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, la transfección de ADN mediada por CaPO_4 , electroporación o usando vectores de transferencia de genes tales como el virus de Epstein-Barr. En un procedimiento
10 preferido, se inserta un oligonucleótido de sentido directo o de sentido contrario en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, pero sin limitar, los derivados de los retrovirus murinos M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores
15 de copia doble denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

[0140] Los oligonucleótidos de sentido directo o de sentido contrario también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana por formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, como se describe en
20 el documento WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligandos adecuadas incluyen, pero sin limitar, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citocinas u otros ligandos que se unen a receptores de superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando para unirse a su
25 correspondiente molécula o receptor, o para bloquear la entrada en la célula del oligonucleótido de sentido directo o de sentido contrario o su versión conjugada.

[0141] Alternativamente un oligonucleótido de sentido directo o uno de sentido contrario se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por formación de un complejo de oligonucleótido-lípido, como se describe en el
30 documento WO 90/10448. Este complejo de oligonucleótido de sentido directo o de sentido contrario-lípido preferiblemente es disociado dentro de la célula por una lipasa endógena.

[0142] Las moléculas de ARN o ADN de sentido directo o de sentido contrario en general tienen al menos aproximadamente 5 bases de longitud, aproximadamente 10
35 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.

10 **[0143]** Las sondas también se pueden usar en técnicas de PCR para generar una mezcla de secuencias para identificar secuencias codificantes de PRO estrechamente relacionadas.

[0144] Las secuencias de nucleótidos que codifican un PRO también se pueden usar para construir sondas de hibridación para cartografiar genes que codifican este PRO y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en el presente documento se pueden cartografiar en un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma usando técnicas conocidas, tales como la hibridación in situ, el análisis de unión frente a marcadores cromosómicos conocidos, y el cribado por hibridación con bibliotecas.

20 **[0145]** Cuando las secuencias codificantes para PRO codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el PRO es un receptor), el PRO se puede usar en ensayos para identificar otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos procedimientos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción de unión de receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión también se pueden usar para cribar péptidos o inhibidores moléculas pequeñas o agonistas de la interacción de unión. Además, el PRO receptor se puede usar para aislar ligando(s) correlativo(s). Los ensayos de cribado se pueden diseñar para encontrar compuestos candidatos que imiten la actividad biológica de un PRO nativo o un receptor para PRO. Dichos ensayos de cribado incluyen ensayos que se pueden llevar a cribados de alto rendimientos de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos moléculas pequeñas. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos inorgánicos u orgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunosayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la

35

técnica.

[0146] Los ácidos nucleicos que codifican el PRO o sus formas modificadas también se pueden usar para generar animales transgénicos o animales “con genes inactivados” que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos 5 terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (p. ej., un ratón o rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, cuyo transgén fue introducido en el animal o un progenitor del animal en una etapa prenatal, p. ej. una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica el PRO se 10 puede usar para clonar ADN genómico que codifica PRO de acuerdo con técnicas establecidas y usar las secuencias genómicas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan el ADN que codifica el PRO. Los procedimientos para generar animales transgénicos, en particular animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las 15 patentes de EE.UU. nº 4.736.866 y 4.870.009. Normalmente, se dirigirán células particulares para la incorporación del transgén de PRO con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica PRO introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria, se pueden usar para examinar el efecto de la expresión aumentada del ADN que codifica 20 PRO. Dichos animales se pueden usar como animales de ensayo para reactivos que se piensa que confieren protección frente a, por ejemplo, afecciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. De acuerdo con esta faceta de la invención, se trata un animal con el reactivo y una incidencia menor de la afección patológica, comparado con los animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una potencial intervención 25 terapéutica para la afección patológica.

[0147] Alternativamente, se pueden usar homólogos no humanos de PRO para construir un animal “que no expresa” PRO que tiene un gen defectuoso o alterado de codificación de PRO, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica PRO y el ADN genómico alterado que codifica PRO 30 introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica PRO se puede usar para clonar ADN genómico que codifica PRO de acuerdo con técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica PRO se puede suprimir o sustituir por otros genes, tales como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede usar para el seguimiento de la integración. Normalmente, 35 se incluyen varios kilobases de ADN flanqueador inalterado (tanto en el extremo 5’

como en el 3') en el vector [véase, p. ej., Thomas y Capecchi, *Cell*, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (p. ej., por electroporación) y se seleccionan las células en las que se ha introducido el ADN recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno [véase, p. ej., Li y al., *Cell*, 69:915 (1992)]. Después, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (p. ej., un ratón o rata) para formar quimeras de agregación [véase, p. ej., Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Después, un embrión quimérico se puede implantar en un animal adoptivo hembra pseudopreñado adecuado y llevar el embrión a término para crear un animal "con genes inactivados". La progenie que contiene el ADN recombinado homológamente en sus células germinales se puede identificar por técnicas estándar y usar como animales de reproducción en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente. Los animales con genes inactivados se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad para defenderse frente a determinadas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debidas a la ausencia del polipéptido PRO.

[0148] El ácido nucleico que codifica los polipéptidos PRO también se puede usar en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, se introducen genes en células con el fin de lograr la 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 logra un efecto duradero mediante un solo tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Los ARN o ADN de sentido contrario se pueden usar como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de determinados genes *in vivo*. Ya se ha mostrado que oligonucleótidos de sentido contrario cortos pueden importarse a células donde actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su restringida absorción por la membrana celular (Zamecnik et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden modificarse para potenciar su absorción, p. ej., sustituyendo sus grupos fosfodiéster con carga negativa por grupos no cargados.

[0149] Hay una variedad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* a las células en el huésped destinatario. Las

técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero in vitro incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico, etc. Las técnicas de transferencia de genes *in vivo* preferidas actualmente incluyen la

5 transfección con vectores víricos (normalmente retrovíricos) y la transfección mediada por liposoma-proteína de recubrimiento vírico (Dzau y col., *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que dirija las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de superficie celular o la célula objetivo, un

10 ligando para un receptor en la célula objetivo, etc. Cuando se usan liposomas, se pueden usar proteínas que se unen a una proteína de membrana de superficie celular asociada con la endocitosis para dirigir y/o facilitar la absorción, p. ej., proteínas de cápsida o fragmentos de las mismas tróficas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en la ciclación, proteínas

15 que dirigen la localización intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, en Wu y col., *J. Biol. Chem.* 262, 4429-4432 (1987); y Wagner y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990). Para una revisión de marcación de genes y protocolos de terapia génica, véase, Anderson y col., *Science* 256, 808-813 (1992).

20 **[0150]** Los polipéptidos PRO descritos en el presente documento también se pueden usar como marcadores de peso molecular para propósitos de electroforesis de proteínas y las secuencias de ácido nucleico aisladas se pueden usar para expresar de forma recombinante esos marcadores.

[0151] Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos PRO o

25 fragmentos de los mismos descritos en el presente documento, son útiles para la identificación de cromosomas. En relación con esto, existe una necesidad creciente de identificar nuevos marcadores de cromosomas, puesto que actualmente están disponibles relativamente pocos reactivos marcadores de cromosomas basados en los datos de secuencia reales. Cada molécula de ácido nucleico de PRO de la presente

30 invención se puede usar como un marcador de cromosoma.

[0152] Los polipéptidos PRO y las moléculas de ácido nucleico de la presente invención también se pueden usar para la caracterización de tejidos, en los que los polipéptidos PRO de la presente invención se pueden expresar de forma diferencial en un tejido comparado con otro. Las moléculas de ácido nucleico de PRO serán útiles

35 para generar sondas para la PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis

Western.

[0153] Los polipéptidos PRO descritos en el presente documento también se pueden usar como agentes terapéuticos. Los polipéptidos PRO de la presente invención se pueden formular de acuerdo con procedimientos conocidos para preparar
5 composiciones farmacéuticamente útiles, de modo que el producto de PRO se combina mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para almacenamiento, por mezcla del principio activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a
10 edición, Osol, A. ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para el receptor en las dosis y concentraciones usadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas,
15 tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos 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 tipo azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como
20 sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

[0154] Las formulaciones para usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o después de liofilización y reconstitución.

[0155] Las composiciones terapéuticas del presente documento en general se
25 ponen en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de disolución intravenosa que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica.

[0156] La vía de administración está de acuerdo con los procedimientos conocidos, p. ej., inyección o infusión por vías intravenosa, intraperitoneal,
30 intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica o por sistemas de liberación sostenida.

[0157] Las dosificaciones y las concentraciones de fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosificación o vía de administración
35 adecuadas depende de la experiencia del médico habitual. Los experimentos con

animales proporcionan una guía fiable para la determinación de dosis eficaces para terapia humana. El cambio de escala entre especies de las dosis eficaces se puede realizar siguiendo los principios determinados por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" *En Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi y col., Eds. , Pergamon Press, New York 1989, pág. 42-96.

[0158] Cuando se usa la administración *in vivo* de un polipéptido PRO o agonista o antagonista del mismo, las cantidades de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente de 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. La guía para las dosificaciones particulares y los procedimientos de suministro se encuentra en la bibliografía; véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se prevé que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, y que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar el suministro de una forma diferente de la de otro órgano o tejido.

[0159] Cuando se desea la administración de liberación sostenida de un polipéptido PRO en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiera la administración del polipéptido PRO, se contempla la microencapsulación del polipéptido PRO. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación sostenida se ha llevado a cabo con éxito con la hormona de crecimiento humana (rhGH), interferón-(rhIFN-), interleuquina-2, y MN rgp120. Johnson y col., *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora y col., *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems," en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: New York, 1995), pág. 439-462; documentos WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y patente de EE.UU. n° 5.654.010.

[0160] Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando el polímero poli(ácido láctico-glicólico) (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplia variedad de propiedades biodegradables. Los productos de degradación del PGLA, los ácidos láctico y glicólico, se pueden eliminar rápidamente en el cuerpo humano. Además, la capacidad de degradarse de este polímero se puede ajustar desde meses a años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin

and R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker: New York, 1990), pág. 1-41.

[0161] Esta invención abarca procedimientos de cribado de compuestos para identificar los que imitan el polipéptido PRO (agonistas) o previenen el efecto del polipéptido PRO (antagonistas). Los ensayos de cribado para los candidatos a fármacos antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o forman complejo con los polipéptidos PRO codificados por los genes identificados en el presente documento, o que interfieren de otra forma con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos que se pueden trasladar al cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciendo que sean particularmente adecuados para identificar candidatos a fármacos de tipo moléculas pequeñas.

[0162] Los ensayos se pueden llevar a cabo 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 materia.

[0163] Todos los ensayos de antagonistas son comunes en cuanto que implican el contacto del candidato a fármaco con un polipéptido PRO codificado por un ácido nucleico identificado en el presente documento, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

[0164] En los 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 el presente documento o candidato a fármaco, se inmoviliza en una fase sólida, p. ej., una placa de microvaloración, mediante enlaces covalentes o no covalentes. El enlace no covalente generalmente se lleva a cabo mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una disolución del polipéptido PRO y secado. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo inmovilizado, p. ej., un anticuerpo inmovilizado, p. ej., un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido PRO que se va a inmovilizar, para anclarlo a su superficie sólida. El ensayo se lleva a cabo añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, p. ej., la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se ha completado, se separan los componentes que no han reaccionado, p. ej., mediante lavado, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente no inmovilizado originalmente lleva un

marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que la formación de complejo ha tenido lugar. Cuando el componente no inmovilizado originalmente no lleva el marcador, la formación de complejo se puede detectar, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0165] Si el compuesto candidato interacciona pero no se une a un polipéptido PRO particular codificado por un gen identificado en el presente documento, su interacción con este polipéptido se puede ensayar por procedimientos conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen procedimientos tradicionales, tales como, p. ej., entrecruzamiento, coimmunoprecipitación, y copurificación por gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden seguir usando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London), 340: 245-246 (1989); Chien y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)) como describen Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como la levadura GAL4, consisten en 2 dominios modulares físicamente discretos, en el que uno actúa como el dominio de unión al ADN y el otro funciona como el dominio de transcripción-activación. El sistema de expresión de levaduras descrito en las publicaciones anteriores (en general denominado como “sistema de dos híbridos”) aprovecha esta propiedad y usa 2 proteínas híbridas, una en la que la proteína diana está fusionada con el dominio de unión al ADN de GAL4, y la otra, en la que las proteínas activantes candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador *GAL1-lacZ* bajo el control de un promotor activado de GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 por la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Está disponible en el comercio en Clontech un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas que usa la técnica de los dos híbridos. Este sistema también se puede extender a la cartografía de dominios de proteína implicados en las interacciones de proteínas específicas así como a determinar la posición de restos de aminoácido que son cruciales para estas interacciones.

[0166] Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido PRO identificado en el presente documento, y otros componentes intra o extracelulares, se pueden ensayar como sigue: normalmente se prepara una mezcla

de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo

[0167] que permitan la interacción y unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se lleva a cabo en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción para que sirva como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se sigue como se ha descrito en lo que antecede. La formación de un complejo en la o las reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo, indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su pareja de reacción.

[0168] Para ensayar los antagonistas, el polipéptido PRO se puede añadir a una célula junto con el compuesto que se va a cribar en relación con una actividad particular 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 combinando el polipéptido PRO y un potencial antagonista con receptores del polipéptido PRO unidos a membrana o receptores recombinantes en condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitivo. El polipéptido PRO se puede marcar, tal como por radiactividad, de modo que el número de moléculas de polipéptido PRO unidas al receptor se puede usar para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor se puede identificar por numerosos procedimientos conocidos para el experto en la materia, por ejemplo, por la técnica de tapizado de una superficie con un ligando (del inglés, "ligand panning") y por separación de células por FACS Coligan, y col., *Current Protocols in Immun.*, 1(2), Capítulo 5, (1991). Preferiblemente, se usa la clonación de expresión en la que se prepara un ARN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido PRO, y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO. Las células transfectadas que se cultivan sobre portaobjetos de vidrio se exponen al polipéptido PRO marcado. El polipéptido PRO se puede marcar por una variedad de medios que incluyen la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Después de la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autorradiográfico. Se identifican los grupos positivos, y se preparan subgrupos y se vuelven a transfectar usando un procedimiento interactivo de separación en subgrupos y recibado,

obteniéndose finalmente un clon único que codifica el receptor putativo.

[0169] Como procedimiento alternativo para la identificación de receptores, el polipéptido PRO marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membranas o extractos celulares que expresan la molécula receptora. El material
5 reticulado se resuelve mediante un análisis de PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede escindirse, resolverse en fragmentos peptídicos, y someterse a una microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida en la microsecuenciación se usará para diseñar un conjunto de sondas oligonucleótidas degeneradas para cribar una biblioteca de ADNc
10 para identificar los genes que codifican el receptor putativo.

[0170] En otro ensayo para antagonistas, se incubarían células de mamífero o una preparación de membrana que expresa el receptor, con el polipéptido PRO marcado en presencia del compuesto candidato. Después se podría medir la capacidad del compuesto para potenciar o bloquear esta interacción.

15 **[0171]** Ejemplos más específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con el polipéptido PRO, y en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos anti-idiopáticos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o
20 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 imparte efecto, inhibiendo así de forma competitiva la acción del polipéptido PRO.

25 **[0172]** Otro potencial antagonista del polipéptido PRO es una construcción de ARN o ADN de sentido contrario preparada usando tecnología de sentido contrario, en la que, p. ej., una molécula de ARN o ADN de sentido contrario actúa para bloquear directamente la traducción del ARNm hibridando con el ARNm dirigido y previniendo la traducción de proteína. La tecnología de sentido contrario se puede usar para
30 controlar la expresión de genes por la formación de una triple hélice o ADN o ARN de sentido contrario, basándose ambos procedimientos 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 del presente documento, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN de sentido contrario de aproximadamente 10 a 40
35 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea

complementario de una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice, véase Lee y col., *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney y col., *Science*, 241: 456 (1988); Dervan y col., *Science*, 251:1360 (1991)), previniendo así la transcripción y la producción del polipéptido PRO. El oligonucleótido de ARN de sentido contrario
5 hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido PRO (de sentido contrario - Okano, *Neurochem.*, 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos antes también se pueden suministrar a células de modo que pueda expresarse *in vivo* el ARN o ADN de sentido contrario
10 para inhibir la producción del polipéptido PRO. Cuando se usa ADN de sentido contrario, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, p. ej., entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0173] Los potenciales antagonistas incluyen moléculas pequeñas que se unen al
15 sitio activo, al sitio de unión del receptor, o al sitio de unión del factor de crecimiento u otro sitio de unión importante del polipéptido PRO, bloqueando así la actividad biológica normal del polipéptido PRO. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitar, péptidos o moléculas de tipo péptido pequeños, preferiblemente péptidos solubles y compuestos inorgánicos u orgánicos no peptídicos sintéticos.

20 **[0174]** Los ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Los ribozimas actúan por hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión específicos del ribozima en una potencial diana de ARN se pueden identificar por técnicas conocidas. Para más detalles, véase, p. ej., Rossi,
25 *Current Biology*, 4: 469-471 (1994), y publicación PCT WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre, 1997).

[0175] Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deben ser monocatenarias y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de
30 modo que promueva la formación de la triple hélice por las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que en general requiere tramos de tamaño considerable de purinas o pirimidinas en una cadena de un dúplex. Para más detalles véase, p. ej., la publicación PCT n° WO 97/33551, véase antes.

[0176] Estas moléculas pequeñas se pueden identificar por uno cualquiera o más
35 de los ensayos de cribado discutidos en lo que antecede y/o por cualquier otra técnica

de cribado conocida para los expertos en la materia.

[0177] Los usos de las moléculas descritas en el presente documento también se pueden basar en los éxitos de los ensayos funcionales positivos revelados y descritos a continuación.

5 F. Anticuerpos dirigidos contraPRO

[0178] La presente invención proporciona además anticuerpos dirigidos contraPRO. Los anticuerpos de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

10 **[0179]** Los anticuerpos dirigidos contra PRO pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos para preparar anticuerpos policlonales son conocidos para los expertos en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden producir en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se
15 inyectarán en el mamífero por múltiples inyecciones 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 con una proteína que se sepa que es inmunogénica en el mamífero que se va a inmunizar. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a hemocianina de lapa
20 californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden usar incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil-lípido A o dicorinomicolato de trealosa sintético). El protocolo de inmunización lo puede seleccionar el experto en la técnica sin excesiva experimentación.

25 2. Anticuerpos monoclonales

[0180] Los anticuerpos anti-PRO pueden ser, alternativamente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein., *Nature*, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, normalmente se inmuniza un
30 ratón, hámster u otro animal hospedador adecuado, con un agente de inmunización para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente de inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro.

[0181] El agente de inmunización normalmente incluirá el polipéptido PRO o una
35 proteína de fusión del mismo. En general, se usan linfocitos de sangre periférica

(“PBL”) si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de nódulo linfático si se desean fuentes de mamíferos no humanas. Después, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula hibridoma [Goding, *Monoclonal*
5 *Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pág. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente, se usan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células hibridomas se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más
10 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 fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (“medio HAT”), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

15 **[0182]** Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficazmente, soportan un nivel de expresión alto estable del anticuerpo de las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como el medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution
20 Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York,
25 (1987) pág. 51-63].

[0183] Después, se puede ensayar en el medio de cultivo en el que se cultivan las células hibridomas la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PRO. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células hibridomas se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de
30 unión in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidos en la materia. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0184] Después de identificar las células hibridomas deseadas, los clones se
35 pueden subclonar por procedimientos de dilución límite y hacer crecer por

procedimientos estándar [Goding, véase antes]. Los medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden hacer crecer *in vivo* como ascitis en un mamífero.

- 5 **[0185]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico por procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de proteína A-Sepharosa, de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.
- 10 **[0186]** Los anticuerpos monoclonales también se pueden hacer por procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente de EE.UU. n° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse
- 15 específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células hibridomas de la invención sirven como fuente preferida para dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede poner en vectores de expresión, que después se transfectan a células hospedadoras, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de lo
- 20 contrario no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo por la secuencia codificante de los dominios constantes de la cadena pesada y ligera humanas, en lugar de las secuencias murinas homólogas [Patente de EE.UU. n° 4.816.567; Morrison y col.,
- 25 véase antes], o por unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es de inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es de inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la
- 30 invención, para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

- [0187]** Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera de la inmunoglobulina y la cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca
- 35 generalmente en cualquier punto en la región Fc de modo que se prevenga el

entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los restos de cisteína relevantes se sustituyen por otros restos de aminoácidos o se eliminan de modo que se prevenga el entrecruzamiento.

[0188] Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir sus fragmentos, en particular fragmentos Fab, se puede llevar a cabo usando técnicas rutinarias conocidas en la materia.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0189] Los anticuerpos dirigidos contra PRO de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por los restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la Fv de la región armazón de la inmunoglobulina humana son sustituidos por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o secuencias de la región armazón. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de una inmunoglobulina no humana, y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá, de forma óptima, al menos una parte de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Reichmann y col., *Nature*, 332:323-329 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)].

[0190] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanizados son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en el mismo, de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos a menudo se denominan restos “importados”, que normalmente se toman de un dominio variable “importado”. La humanización se

puede llevar a cabo esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano por las secuencias de la CDR o las CDR de roedores. Por consiguiente, dichos anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR se sustituyen por restos de sitios análogos de anticuerpos de roedores.

[0191] Los anticuerpos humanos también se pueden producir usando diferentes técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación de fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. También están disponibles las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. para preparar anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner y col., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)]. Igualmente, se pueden hacer anticuerpos humanos introduciendo locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, p. ej., ratones en los que se han inactivado parcial o completamente los genes de las inmunoglobulinas endógenas. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parecen mucho a los observados en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la reorganización de genes, montaje y repertorio de anticuerpos. Este procedimiento se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 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 y col., *Bio/Technology* 10,779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature* 368 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994); Fishwild y col., *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

[0192] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el polipéptido PRO, y la otra es para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de

receptor.

[0193] Los procedimientos para hacer anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de 5 inmunoglobulinas, donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades [Milstein y Cuello, *Nature*, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una potencial mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula 10 correcta normalmente se logra por etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker y col., *EMBO J.*, 10: 3655-3659 (1991).

[0194] Los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar con las 15 secuencias de dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las 20 fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se transfectan simultáneamente a un organismo hospedador adecuado. Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

25 **[0195]** De acuerdo con otro procedimiento descrito en el documento WO 96/27011, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas 30 laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (p. ej. tirosina o triptófano). Se crean “cavidades” compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por unas más pequeñas (p. ej., alanina o 35 treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del

heterodímero frente a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

[0196] Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (p. ej., anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$). Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando la unión química. Brennan y col., *Science* 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos son escindidos por proteólisis para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos son reducidos en presencia del agente de formación de complejo con ditiol arsenito sódico para estabilizar los ditioles vecinales y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados después se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB después se vuelve a convertir en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0197] Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' fue secretado por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico directo in vitro para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado era capaz de unirse a células que expresaban en exceso el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

[0198] También se han descrito diferentes técnicas para hacer y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes por fusión de genes. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se volvieron a oxidar para formar heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede usar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología del "anticuerpo bivalente" descrita por Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) ha

proporcionado un mecanismo alternativo para hacer 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) por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma
5 cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento son forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpo biespecíficos usando dímeros de Fv de una cadena (sFv). Véase, Gruber y col., *J. Immunol.* 152:5368 (1994). Se contemplan los anticuerpos con
10 más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos Tutt y col., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

[0199] Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítomos diferentes en un polipéptido PRO dado. Alternativamente, un brazo de polipéptido anti-PRO se puede combinar con un brazo que se une a una molécula activadora en un
15 leucocito tal como una molécula receptora de células T (p. ej., CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores de Fc para IgG (Fc γ R), tales como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16) para así centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el polipéptido PRO particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un polipéptido
20 PRO particular. Estos anticuerpos tienen un brazo de unión a PRO y un brazo que se une a un agente citotóxico o un quelante de radionúclidos, tales como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido PRO y después se une al factor tisular (TF).

5. Anticuerpos heteroconjugados

25 **[0200]** Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de 2 anticuerpos covalentemente unidos. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas [patente de EE.UU. n° 4.676.980], y para el tratamiento de la infección por el VIH [Documentos WO
30 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Está contemplado que los anticuerpos se pueden preparar in vitro usando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir usando una reacción de intercambio de disulfuro o por formación de un enlace tioéter. Los ejemplos de reactivos adecuados para este
35 propósito incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los descritos, por

ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.676.980.

6. Diseño de la función efectora

[0201] Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, para así potenciar, p. ej., la eficacia del anticuerpo en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, se pueden introducir resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodímero así generado puede tener mejor capacidad de internalización y/o muerte de células mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) incrementadas. Véase, Caron y col., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodímeros con actividad antitumoral potenciada también se pueden preparar usando conectores de cruzamiento heterobifuncionales como describen Wolff y col., *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo que tenga doble región Fc y por lo tanto puede tener potenciada la lisis de complemento y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson y col., *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989).

7. Inmunoconjugados

[0202] La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, toxina (p. ej., una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

[0203] Los agentes quimioterapéuticos útiles para generar dichos inmunoconjugados se han descrito antes. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos que no son de unión de la toxina de la difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, *Aleurites fordii*proteins, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Están disponibles una variedad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se hacen usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)

(SPDP), iminotiolani (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobencil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de bis-flúor activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar como describen Vitetta y col., *Science*, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MIX-DTPA) marcado con carbono-14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación del radionucleótido al anticuerpo. Véase, el documento WO94/11026.

[0204] En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un “receptor” (tal como estreptavidina) para usar en el reconocimiento previo del tumor, en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra al paciente después de eliminar el conjugado no unido de la circulación, usando un agente de depuración y después administración de un “ligando” (p. ej., avidina) que está conjugado con un agente citotóxico. (p. ej., radionucleótido).

8. Inmunoliposomas

[0205] Los anticuerpos descritos en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan por procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos por Epstein y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980); y patentes de EE.UU. nº 4.485.045 y 4.544.545. Los liposomas con tiempo en la circulación potenciado se describen en la patente de EE.UU. nº 5.013.556.

[0206] Los liposomas particularmente útiles se pueden generar por el procedimiento de evaporación en fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruden a través de filtros de tamaño de poros definido para dar liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab’ del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como describen Martin y col., *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) mediante una reacción de intercambio de disulfuro. Opcionalmente, se introduce un agente quimioterapéutico (tal como la doxorubicina) en el liposoma. Véase, Gabizon y col., *J. National Cancer Inst.*, 81(19): 1484 (1989).

9. Composiciones farmacéuticas de anticuerpos

[0207] Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido PRO identificados en el presente documento, así como otras moléculas identificadas por ensayos de cribado descritos en lo que antecede, se pueden administrar para el
5 tratamiento de diferentes trastornos en forma de composiciones farmacéuticas.

[0208] Si el polipéptido PRO es intracelular y se usan anticuerpos enteros como inhibidores, se prefiere la internalización de los anticuerpos. Sin embargo, las lipofecciones o liposomas solo se pueden usar para suministrar el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, a las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se
10 prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptidos que retienen la capacidad para unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir por tecnología de ADN recombinante. Véase, p.
15 ej., Marasco y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893(1993). La formulación del presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se va a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente que potencia
20 su función, tal como por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación y en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

[0209] Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas
25 preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en
30 *Pharmaceutical Sciences* de Remington, véase antes.

[0210] Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0211] Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos
35 adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables

de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, p. ej., películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), poliláctidas (patente de EE.UU. n° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L- γ -glutamato de etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico). Mientras que polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo de tiempo largo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado a la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden planificar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlace S-S intermolecular a través del intercambio de tiodisulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando las disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

G. Usos de anticuerpos anti-PRO

[0212] Los anticuerpos anti-PRO de la invención tienen varias utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PRO se pueden usar en ensayos de diagnóstico para PRO, p. ej., detectando su expresión en células específicas, tejidos o suero. Se pueden usar diferentes técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la materia, tales como ensayos de unión competitivos, ensayos de tipo sándwich directos e indirectos, y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogénea u homogénea [Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* (CRC Press, Inc., 1987), pág. 147-158]. Los anticuerpos usados en los ensayos de diagnóstico se pueden marcar con un resto detectable. El resto detectable debe ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto 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 fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano

picante. Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al resto detectable, incluyendo los procedimientos descritos por Hunter y col., *Nature*, 144:945 (1962); David y col., *Biochemistry*, 13:1014 (1974); Pain y col., *J. Immunol. Meth.*, 40:219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407
5 (1982).

[0213] Los anticuerpos anti-PRO también son útiles para la purificación por afinidad de PRO de cultivo de células recombinantes o fuentes naturales. En este procedimiento, los anticuerpos contra PRO se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o papel de filtro, usando procedimientos conocidos en la
10 materia. El anticuerpo inmovilizado después se pone en contacto con una muestra que contiene el PRO que se va a purificar, y después el soporte se lava con un disolvente adecuado que separará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el PRO, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el PRO del anticuerpo.

15 **[0214]** Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con propósitos ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención de ninguna forma.

EJEMPLOS

[0215] Los reactivos disponibles en el comercio a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron siguiendo las instrucciones del fabricante salvo que se indique lo
20 contrario. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos y a lo largo de la memoria descriptiva, por los números de acceso en ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EJEMPLO 1: Cribado de homología de dominio extracelular para identificar nuevos polipéptidos y los ADNc que los codifican

25 **[0216]** Se usaron las secuencias del dominio extracelular (ECD) (incluyendo la secuencia señal de secreción, si la hay) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos pública Swiss-Port para buscar en las bases de datos EST. Las bases de datos EST incluyen bases de datos públicas (p. ej., Dayhoff, GenBank), y bases de datos patentadas (p.ej. LIFESEQ™, Incyte Pharmaceuticals,
30 Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó usando el programa de ordenador BLAST o BLAST-2 (Altschul y col., *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996)) como comparación de las secuencias de proteínas de ECD con 6 traducciones de marco de las secuencias de EST. Las comparaciones con una puntuación en BLAST de 70 (o en algunos casos 90) o mayores que no codifican proteínas conocidas se agruparon y
35 montaron en secuencias de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green,

University of Washington, Seattle, WA).

[0217] Usando esta selección de homología del dominio extracelular, se montaron secuencias de ADN consenso con respecto a otras secuencias de EST identificadas usando phrap. Además, las secuencias de ADN consenso obtenidas a menudo (pero no
5 siempre) se extendieron usando ciclos repetidos de BLAST o BLAST-2 y phrap para extender la secuencia consenso tanto como fuera posible usando las fuentes de secuencias de EST usadas antes.

[0218] Basándose en las secuencias consenso obtenidas como se ha descrito antes, después se sintetizaron los oligonucleótidos y se usaron para identificar por PCR una
10 biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés y para usar como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa para un polipéptido PRO. Los cebadores directos e inversos de la PCR en general están en el intervalo de 20 a 30 nucleótidos y a menudo se diseñan para dar un producto de la PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de sondas normalmente
15 tienen 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia consenso es mayor de aproximadamente 1-1,5 kpb. Con el fin de cribar en varias bibliotecas un clon de longitud completa, el ADN de las bibliotecas se cribó por amplificación por PCR, como el procedimiento de Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, con la pareja de cebadores de la PCR.
20 Después se usó una biblioteca positiva para aislar clones que codificaban el gen de interés usando el oligonucleótido sonda y uno de las parejas de cebadores.

[0219] Las bibliotecas de ADNc usadas para aislar los clones de ADNc se construyeron por procedimientos estándar usando reactivos disponibles en el comercio tales como los de Invitrogen, San diego, CA. El ADNc se cebó con oligo dT que
25 contenía un sitio NotI, unido con extremo romo a los adaptadores Sall de hemiquinasa, se escindió con NotI, se separó por tamaños de forma adecuada por electroforesis en gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SfiI; véase, Holmes y col., *Science*, 253:1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y NotI.

30 EJEMPLO 2: Aislamiento de sondas de ADNc por cribado con amilasa

1. Preparación de biblioteca de ADNc cebado con oligo dT

[0220] Se aisló ARNm de un tejido humano de interés usando reactivos y protocolos de Invitrogen, San Diego, CA (Fast Track 2). Este ARN se usó para generar una biblioteca de ADNc cebado con oligo dT en el vector pRK5D usando reactivos y
35 protocolos de Life Technologies, Gaithersburg, MD (Super Script Plasmid System).

En este procedimiento, el ADNc de doble cadena se ajustó a tamaños de más de 1000 pb y el ADNc conectado por Sall/NotI se clonó en el vector escindido con XhoI/NotI. pRK5D es un vector de clonación que tiene un sitio de inicio de la transcripción sp6 seguido de un sitio de la enzima de restricción SfiI que precede a los sitios de clonación del ADNc XhoI/NotI.

2. Preparación de biblioteca de ADNc de cebado aleatorio

[0221] Se generó una biblioteca de ADNc secundaria con el fin de representar de forma preferente los extremos 5' de los clones de ADNc primarios. Se generó el ARN de sp6 a partir de la biblioteca primaria (descrita antes), y este ARN se usó para generar una biblioteca de ADNc de cebado aleatorio en el vector pSST-AMY.0 usando reactivos y protocolos de Life Technologies (Super Script Plasmid System, referencia anterior). En este procedimiento el ADNc de doble cadena se ajustó a tamaños de 500-1000 pb, se conectó con extremos romos a adaptadores NotI, se escindió con SfiI, y se clonó en el vector escindido con SfiI/NotI. pSST-AMY.0 es un vector de clonación que tiene un promotor de alcohol deshidrogenasa de levadura que precede a los sitios de clonación del ADNc y la secuencia de amilasa de ratón (la secuencia madura sin la señal de secreción) seguida del terminador de la alcohol deshidrogenasa de levadura, después de los sitios de clonación. Por lo tanto, los ADNc clonados en este vector que se fusionan en el marco con la secuencia de amilasa conducirán a la secreción de amilasa de colonias de levadura transfectadas de forma adecuada.

3. Transformación y detección

[0222] El ADN de la biblioteca descrita en el apartado 2 anterior se enfrió con hielo al que se añadió bacterias DH10B electrocompetentes (Life Technologies, 20 ml). Después, la mezcla de bacterias y vector se electroporó como recomendaba el fabricante. Posteriormente, se añadió medio SOC (Life Technologies, 1 ml) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos. Los transformantes después se cultivaron en 20 placas LB de 150 mm estándar que contenían ampicilina y se incubaron durante 16 horas (37°C). Las colonias positivas se desecharon de las placas y se aisló el ADN del sedimento bacteriano usando protocolos estándar, p. ej., gradiente de CsCl. Después se continuó con el ADN purificado con los siguientes protocolos de levaduras.

[0223] Los procedimientos de levaduras se dividieron en 3 categorías: (1) Transformación de la levadura con el vector combinado plásmido/ADNc; (2) Detección y aislamiento de clones de levadura que secretan amilasa; y (3) Amplificación por PCR del inserto directamente de la colonia de levaduras y

purificación del ADN para la secuenciación y posterior análisis.

[0224] La cepa de levadura usada era HD56-5A (ATCC-90785). Esta cepa tenía el siguiente genotipo: MAT alfa, ura3-52, leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15, MAL+, SUC+, GAL+. Preferiblemente, se pueden usar mutantes de levadura que tienen rutas
5 postraduccionales deficientes. Dichos mutantes pueden tener alelos deficientes de translocación en *sec71*, *sec72*, *sec62*, siendo más preferido *sec71* truncado. Alternativamente, también se pueden usar preferiblemente antagonistas (incluyendo nucleótidos de sentido contrario y/o ligandos) que interfieren con la operación normal de estos genes, otras proteínas implicadas en esta ruta postraducciona (p.ej., SEC61p,
10 SEC72p, SEC62p, SEC63p, TDJ1p o SSA1p-4p) o la formación de complejo de esas proteínas, en combinación con la levadura que expresa amilasa.

[0225] La transformación se llevó a cabo basándose en el protocolo expuesto por Gietz y col., *Nucl. Acid. Res.*, 20:1425 (1992). Las células transformadas después se
15 inocularon del agar a caldo de medio complejo YEPD (100 ml) y crecieron durante la noche a 30°C. El caldo YEPD se preparó como describen Kaiser y col., *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1994). Después, el cultivo de la noche se diluyó hasta aproximadamente 2×10^6 células/ml (aproximadamente $DO_{600}=0,1$) en caldo YEPD de nueva aportación (500 ml) y volvió a crecer hasta 1×10^7 células/ml (aproximadamente $DO_{600}=0,4-0,5$).

[0226] Después, se recogieron las células y se prepararon para la transformación mediante transferencia a botellas de rotor GS3 en un rotor Sorval GS3 a 5.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el líquido sobrenadante y después se volvieron a suspender en agua estéril y se volvieron a centrifugar en tubos Falcon de 50 ml a 3.500 rpm en una centrífuga GS-6KR Beckman. El líquido sobrenadante se descartó y
25 posteriormente las células se lavaron con LiAc/TE (10 ml, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5, Li_2OOCCH_3 100 mM), y se volvieron a suspender en LiAc/TE (2,5 ml).

[0227] La transformación tuvo lugar mezclando las células preparadas (100 μ l) con ADN de testículos de salmón monocatenario recién desnaturalizado (Lofstrand Labs, Gaithersburg, MD) y transformando el ADN (1 μ g, vol. < 10 μ l) en tubos de
30 microfuga. La mezcla se mezcló brevemente por mezclado en vórtice, y después se añadió PEG/TE al 40% (600 μ l, polietilenglicol-4000 al 40%, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, Li_2OOCCH_3 100 mM, pH 7,5). Esta mezcla se mezcló suavemente y se incubó a 30°C mientras se agitaba durante 30 minutos. Las células después se sometieron a choque térmico a 42°C durante 15 minutos, y el recipiente de reacción se centrifugó en
35 una microfuga a 12.000 rpm durante 5-10 segundos, se decantó y se volvió a suspender

en TE (500 μ l, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 7,5) seguido de centrifugación otra vez. Después, las células se diluyeron en TE (1 ml) y se dispersaron partes alícuotas (200 μ l) en los medios selectivos preparados previamente en placas de crecimiento de 150 mm (VWR).

5 **[0228]** Alternativamente, en lugar de múltiples reacciones pequeñas, la transformación se realizó usando una sola reacción a gran escala, en la que las cantidades de reactivos se aumentaron en consecuencia.

[0229] El medio selectivo usado era un agar dextrosa completo sintético que carecía de uracilo (SCD-Ura) preparado como describen Kaiser y col., *Methods in*
10 *Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994). Los transformantes se hicieron crecer a 30°C durante 2-3 días.

[0230] La detección de colonias que secretaban amilasa se llevó a cabo incluyendo almidón rojo en el medio de crecimiento selectivo. El almidón se acopló con el tinte rojo (Reactivo rojo-120, Sigma) como en el procedimiento descrito por Biely y col.,
15 *Anal. Biochem.*, 172:176-179 (1988). El almidón acoplado se incorporó en las placas de agar SCD-Ura con una concentración final de 0,15% (p/v), y se tamponó con fosfato de potasio hasta un pH de 7,0 (concentración final 50-100 mM).

[0231] Se escogieron las colonias positivas y se pasaron rápidamente a medio selectivo reciente (en placas de 150 mm) con el fin de obtener colonias individuales
20 aisladas e identificables. Las colonias individuales aisladas positivas para la secreción de la amilasa se detectaron por incorporación directa de almidón rojo en agar SCD-Ura tamponado. Las colonias positivas se determinaron por su capacidad para romper el almidón dando como resultado en un halo transparente alrededor de la colonia positiva, visualizado directamente.

25 4. Aislamiento de ADN por amplificación por PCR

[0232] Cuando se aisló una colonia positiva, una parte de la misma se escogió mediante un palillo y se diluyó en agua estéril (30 μ l) en una placa de 96 pocillos. En este momento, las colonias positivas se congelaron y almacenaron para el análisis posterior o se amplificaron inmediatamente. Una parte alícuota de células (5 μ l) se usó
30 como un molde para la reacción de la PCR en un volumen de 25 μ l que contenía: 0,5 μ l de KlenTaq (Clontech, Palo Alto, CA); 4,0 μ l de dNTP 10 mM (Perkin Elmer-Cetus); 2,5 μ l de tampón Kentaq (Clontech); 0,25 μ l de oligo 1 directo; 0,25 μ l de oligo 2 inverso; 12,5 μ l de agua destilada. La secuencia del oligonucleótido 1 directo era:

35 5'-TGTAACGACGGCCAGTTAAATAGACCTGCAATTATTAATCT-3' (SEC

ID N°: 1)

La secuencia del oligonucleótido 2 inverso era:

5'-CAGGAAACAGCTATGACCACCTGCACACCTGCAAATCCATT-3' (SEC ID N°: 2)

5 **[0233]** La PCR se llevó a cabo como sigue:

a. Desnaturalización 92°C, 5 minutos

b. 3 ciclos de: Desnaturalización 92°C, 30 segundos

Reasociación 59°C, 30 segundos

Extensión 72°C, 60 segundos

10 c. 3 ciclos de: Desnaturalización 92°C, 30 segundos

Reasociación 57°C, 30 segundos

Extensión 72°C, 60 segundos

d. 25 ciclos de: Desnaturalización 92°C, 30 segundos

Reasociación 55°C, 30 segundos

15 Extensión 72°C, 60 segundos

e. Mantenimiento 4°C

[0234] Las regiones subrayadas de los oligonucleótidos se reasociaron con la región promotora de ADH y la región de amilasa, respectivamente, y se amplificó una región de 307 pb del vector pSST-AMY.0 cuando no había inserto presente.

20 Normalmente, los primeros 18 nucleótidos del extremo 5' de estos oligonucleótidos contenían sitios de reasociación para los cebadores de secuenciación. Por lo tanto, el producto total de la reacción de PCR de un vector vacío era 343 pb. Sin embargo, el ADNc fusionado con la secuencia señal dio como resultado secuencias de nucleótidos considerablemente más largas.

25 **[0235]** Después de la PCR, se examinó una parte alícuota de la reacción (5 µl) por electroforesis en gel de agarosa en un gel de agarosa al 1% usando un sistema de tamponamiento de Tris-Borato-EDTA (TBE) como describen Sambrook y col., véase antes. Los clones que dieron como resultado un producto de PCR fuerte único mayor de 400 pb se analizaron después mediante secuenciación del ADN después de
30 purificación con una columna de limpieza 96 PCR Qiaquick (Qiagen Inc., Chatsworth, CA).

EJEMPLO 3: Aislamiento de clones de ADNc usando algoritmo de análisis de señales

[0236] Se identificaron varias secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptido aplicando un algoritmo para encontrar secuencias señal, patentado
35 desarrollado por Genentech, Inc. (South San Francisco, CA), de EST así como

fragmentos de EST agrupados y montados de bases de datos públicas (p. ej., GenBank) y/o privadas (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA). El algoritmo de secuencias señal calcula una puntuación de señales de secreción basada en el carácter de los nucleótidos de ADN que rodean el primer y opcionalmente el segundo
5 codón de metionina (ATG) en el extremo 5' de la secuencia o fragmento de secuencia que se está considerando. Los nucleótidos después del primer ATG deben codificar al menos 35 aminoácidos sin ambigüedad sin ningún codón de parada. Si el primer ATG tiene los aminoácidos requeridos, no se examina el segundo. Si ninguno cumple los requisitos, la secuencia candidato no se puntúa. Con el fin de determinar si la
10 secuencia de EST contiene una secuencia señal auténtica, el ADN y las correspondientes secuencias de aminoácidos que rodean el codón de ATG se puntúan usando un conjunto de 7 sensores (parámetros de evaluación) que se sabe que están asociados con señales de secreción. El uso de este algoritmo da como resultado la identificación de numerosas secuencias de ácidos nucleico que codifican polipéptido.

15 EJEMPLO 4: Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO1186 humano

[0237] El uso del algoritmo de secuencias señal descrito antes en el ejemplo 3 permitió la identificación de una sola secuencia de agrupación de EST de la base de datos Incyte. La secuencia de agrupación de EST después se comparó con una variedad de bases de datos de etiquetas de secuencia expresada (EST) que incluía bases
20 de datos de EST públicas (p. ej., GenBank), y una base de datos de ADN de EST patentada (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) para identificar las homologías existentes. La búsqueda de homología se hizo usando el programa de ordenador BLAST o BLAST2 (Altschul y col., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Aquellas comparaciones que dieron como resultado una puntuación en
25 BLAST de 70 (o en algunos casos 90) o mayores no codifican proteínas conocidas y se agruparon y montaron en una secuencia de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, WA). La secuencia consenso obtenida de esto se denomina en el presente documento DAN56748.

[0238] Como resultado de una homología de secuencia observada entre la
30 secuencia consenso DAN56748 y una secuencia de EST abarcada dentro del clon de EST de Incyte nº 3476792, se adquirió el clon de EST de Incyte 3476792 y se obtuvo y secuenció el inserto de ADNc. Se encontró que este inserto codificaba una proteína de longitud completa. La secuencia de este inserto de ADNc se muestra en la figura 1 y se denomina en el presente documento DNA60621-1516.

35 **[0239]** El clon de longitud completa mostrado en la figura 1 contenía un único

marco de lectura abierto con un sitio de inicio de la traducción en las posiciones de nucleótidos 91-93 y que terminaba en el codón de parada encontrado en las posiciones de nucleótidos 406-408 (Figura 1; SEC ID N°: 3). El precursor del polipéptido predicho (Figure 2, SEC ID N°: 4) tiene 105 aminoácidos de longitud. El péptido señal está en los aminoácidos 1-19 del SEC ID N°: 4. PRO1186 tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 11,715 Dalton y un pI calculado de aproximadamente 9,05. El clon DNA60621-1516 se depositó en la ATCC el 4 de agosto de 1998 y se asignó el número de depósito en ATCC 203091.

[0240] Un análisis de la base de datos de Dayhoff (versión 35.45 SwissProt 35), usando un análisis de alineamiento de secuencias de WU-BLAST2 de la secuencia de longitud completa mostrada en la Figura 2 (SEC ID N°: 4), puso de manifiesto alguna identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos de PRO1186 y las siguientes secuencias de Dayhoff: VPRA_DENPO, LFE4_CHICK, AF034208_1, AF030433_1, A55035, COL_RABIT, CELB0507_9, S67826_1, S34665 y CRU73817_1.

15 EJEMPLO 5: Uso de PRO como una sonda de hibridación

[0241] El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica PRO como sonda de hibridación.

[0242] El ADN que comprende la secuencia que codifica el PRO de longitud completa o maduro como se describe en el presente documento, se usa como sonda para cribar ADN homólogos (tales como los que codifican variantes de PRO naturales) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o genotecas de tejido humano.

[0243] La hibridación y lavado de los filtros que contienen cualquiera de los ADN de la biblioteca se lleva a cabo en condiciones de restricción alta. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada de PRO con los filtros se lleva a cabo en una disolución de formamida al 50%, 5 x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato sódico al 0,1%, fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, 2x disolución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se lleva a cabo en una disolución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

[0244] Los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifica la secuencia nativa de longitud completa de PRO se pueden identificar después usando técnicas estándar conocidas en la materia.

EJEMPLO 6: Expresión de PRO en *E. coli*

[0245] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de PRO por expresión recombinante en *E. coli*.

35 **[0246]** La secuencia de ADN que codifica PRO se amplifica inicialmente usando

cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que se correspondan con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se pueden usar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase, Bolivar y col., 5 *Gene*, 2:95 (1977)) que contiene los genes de resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. Este vector se hace digerir con enzimas de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas por la PCR después se ligan al vector. El vector preferiblemente incluye secuencias que codifican un gen de resistencia a antibiótico, un promotor *trp*, una secuencia líder poli-His (incluyendo los primeros 6 codones STII, 10 secuencia de poli-His, y sitio de escisión de enteroquinasa), la región que codifica PRO, terminador de la transcripción lambda y un gen *argU*.

[0247] Después, la mezcla de ligación se usa para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada usando los procedimientos descritos en *Sambrook y col.*, véase antes. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas LB y después se 15 seleccionan las colonias resistentes a antibiótico. El ADN plasmídico se puede aislar y confirmar por análisis de restricción y secuenciación de ADN.

[0248] Los clones seleccionados se pueden hacer crecer durante la noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB complementado con antibióticos. Posteriormente el cultivo de la noche se puede usar para inocular un cultivo a escala mayor. Después, 20 las células se hacen crecer hasta una densidad óptica deseada, durante cuyo tiempo el promotor de la expresión se activa.

[0249] Después de cultivar las células durante varias horas más, las células se pueden recoger por centrifugación. El sedimento celular obtenido por centrifugación se puede solubilizar usando diferentes agentes conocidos en la materia, y la proteína PRO 25 solubilizada después se puede purificar usando una columna de quelación de metal en condiciones que permitan la unión fuerte de la proteína.

[0250] PRO se puede expresar en *E. coli* en una forma etiquetada de poli-His, usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica PRO se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios 30 de enzimas de restricción que se corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de la traducción eficaz y fiable, purificación rápida en una columna de quelación de metales y la separación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias amplificadas por PCR, etiquetadas con poli-His después se ligan a un vector de expresión, que se 35 usa para transformar un hospedador *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 *fuhA(tonA)*)

lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). Los transformantes se hacen crecer primero en LB que contiene carbenicilina 50 mg/ml a 30°C con agitación hasta que se alcanza una DO₆₀₀ de 3-5. Después, los cultivos se diluyen 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico·2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se dejan crecer durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se sacan para verificar la expresión por análisis de SDS-PAGE, y el cultivo bruto se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta purificación y replegado.

[0251] Se vuelve a suspender la pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 litro (6-10 g de sedimentos) en 10 volúmenes (p/v) de guanidina 7 M, tampón Tris 20 mM, pH 8. Se añaden sulfito sódico sólido y tetrionato sódico para llegar a concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la disolución se agita durante la noche a 4°C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los restos cisteína bloqueados por sulfitolización. La disolución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El líquido sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelato metálico (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para clarificar. El extracto clarificado se carga en una columna de quelato de metales Qiagen Ni-NTA de 5 ml equilibrada con el tampón de columna de quelato de metales. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, Utrol grade), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se mezclan y se almacenan a 4°C. La concentración de proteína se calcula por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado basado en su secuencia de aminoácidos.

[0252] Se lleva a cabo el replegado de las proteínas diluyendo la muestra lentamente en tampón de replegado recién preparado que consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegado se eligen de modo que la concentración final de proteína sea entre 50 y 100 microgramos/ml. La disolución de replegado se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de replegado se inactiva por adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de purificar más la proteína, la disolución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo hasta una concentración final de 2-10%. La proteína replegada se

cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H usando un tampón de fase móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo de 10 a 80%. Se analizan partes alícuotas de las fracciones con absorbancia de A_{280} en geles de poliacrilamida-SDS y las fracciones que contienen la proteína replegada homogénea se
5 mezclan. En general, las especies replegadas adecuadamente de la mayoría de las proteínas eluyen con las concentraciones más bajas de acetonitrilo, puesto que estas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Normalmente eluyen especies agregadas con las concentraciones de acetonitrilo más altas. Además de resolver las formas de las
10 proteínas mal plegadas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

[0253] Las fracciones que contienen el polipéptido PRO plegado deseado se mezclan y se separa el acetonitrilo usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la disolución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico
15 0,14 M y manitol al 4% por diálisis o por filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación, y se esterilizan por filtración.

[0254] Muchos de los polipéptidos descritos en el documento WO 00/73454 se expresaron satisfactoriamente como se ha descrito antes.

20 EJEMPLO 6: Expresión de PRO en células de mamífero

[0255] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de PRO por expresión recombinante en células de mamífero.

[0256] Se usa el vector pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo, 1989), como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de PRO se liga en
25 pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO usando procedimientos de ligado como se describen en Sambrook *y col.*, véase antes. El vector resultante se llama pRK5-PRO.

[0257] En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se hacen crecer hasta
30 confluencia en placas de cultivo tisular en medio tal como DMEM complementado con suero de ternero fetal, y opcionalmente componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 μ g de ADN pRK5-PRO con aproximadamente 1 μ g de ADN que codifica el gen de VA RNA [Thimmappaya *y col.*, *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelven en 500 μ l de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl_2 0,227 M. A esta mezcla
35 se añaden, gota a gota, 500 μ l de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO_4 1,5

mM, y se deja que se forme un precipitado, durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja que sedimenten durante aproximadamente 4 horas a 37°C. El medio de cultivo se separa por aspiración y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. Después, las células 293
5 se lavan con medio exento de suero, se añade medio reciente y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

[0258] Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, se separa el medio de cultivo y se sustituye por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene ³⁵S-cisteína 200 µCi/ml y ³⁵S-metionina 200 µCi/ml. Después de una
10 incubación de 12 horas, se recoge el medio condicionado, se concentra en un filtro giratorio y se carga en un gel de SDS al 15%. El gel procesado se puede secar y exponer a película durante un periodo de tiempo seleccionado para revelar la presencia del polipéptido PRO. Los cultivos que contienen las células transfectadas se pueden someter a incubación adicional (en medio exento de suero) y el medio se ensaya en
15 bioensayos seleccionados.

[0259] En una técnica alternativa, el PRO se puede introducir en células 293 transitoriamente usando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Somparryrac y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Se hacen crecer 293 células hasta densidad máxima en un matraz giratorio y se añaden 700 µg de ADN pRK5-
20 PRO. Las células primero se concentran en el matraz giratorio por centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el sedimento celular durante 4 horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo tisular, y se vuelven a introducir en el matraz giratorio que contiene medio de cultivo tisular, insulina bovina 5 µg/ml y transferrina bovina 0,1
25 µg/ml. Después de aproximadamente 4 días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para separar las células y los residuos. La muestra que contiene el PRO expresado después se puede concentrar y purificar por cualquier procedimiento seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

[0260] En otra realización, el PRO se puede expresar en células CHO. El pRK5-
30 PRO se puede transfectar en células CHO usando reactivos conocidos tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Como se ha descrito antes, los cultivos celulares se pueden incubar y sustituir el medio por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia de un polipéptido PRO, el medio de cultivo se puede sustituir por medio exento de suero.
35 Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y después se

recoge el medio condicionado. El medio que contiene el polipéptido PRO expresado, después se puede concentrar y purificar por cualquier procedimiento seleccionado.

[0261] El PRO de epítipo etiquetado también se puede expresar en células hospedadoras CHO. El PRO se puede subclonar fuera del vector pRK5. El inserto del subclon se puede someter a PCR para fusionar en el marco con un epítipo etiqueta seleccionado, tal como una etiqueta poli-his, en un vector de expresión de baculovirus. El inserto de PRO etiquetado con poli-his después se puede subclonar en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para seleccionar los clones estables. Finalmente, las células CHO se pueden transfectar (como se ha descrito antes) con el vector dirigido por SV40. Se puede llevar el marcaje a cabo como se ha descrito antes, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO etiquetado con poli-His después se puede concentrar y purificar por cualquier procedimiento seleccionado, tal como cromatografía de afinidad de quelato de Ni²⁺.

[0262] PRO también puede expresarse en células CHO y/o COS por un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO por otro procedimiento de expresión estable.

[0263] La expresión estable en las células CHO se lleva a cabo usando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (p. ej., dominios extracelulares) de las respectivas proteínas están fusionadas con una secuencia de la región constante de la IgG1 que contiene la región bisagra, CH2 y dominios CH2 y/o como una forma etiquetada con poli-His.

[0264] Después de la amplificación por PCR, los respectivos ADN se subclonan en un vector de expresión CHO usando técnicas estándar como describen Ausubel y col., *Current Protocols of Molecular Biology*, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión CHO se construyen para que tengan sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés para permitir el lanzamiento conveniente de los ADNc. El vector de expresión usado en células CHO es como describen Lucas y col., *Nucl. Acids Res.*, 24:9 (1774-1779) (1996), y usa el promotor temprano de SV40/potenciador para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de la DHFR permite la selección del mantenimiento estable del plásmido después de transfección.

[0265] Se introducen 12 microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección

disponibles en el comercio Superfect® (Qiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim). Las células se hacen crecer como describen Lucas *y col.*, véase *antes*. Se congelan aproximadamente 3×10^7 en una ampolla para el crecimiento y producción adicionales como se describe a continuación.

5 [0266] Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan poniéndolas en un baño de agua y se mezclan con mezclado en vórtice. Los contenidos se introducen con pipeta en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. Los líquidos sobrenadantes se aspiran y las células se vuelven a suspender en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado por $0,2 \mu\text{m}$
10 con suero bovino fetal diafiltrado por $0,2 \mu\text{m}$). Después se introducen partes alícuotas de las células en un centrifugador de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren a un centrifugador de 250 ml cargado con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C . Después de otros 2-3 días, los centrifugadores de 230 ml, 500 ml y 2000 ml se siembran con 3×10^5
15 células/ml. El medio celular se intercambia con medio reciente por centrifugación y se vuelve a suspender en medio de producción. Aunque se puede usar cualquier medio adecuado para CHO, se puede usar un medio de producción descrito en la patente de EE.UU. n° 5.122.469, presentada el 16 de junio, 1992. Se siembra un centrifugador de producción de 3 litros con $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determinan el número de
20 células y el pH. El día 1, se toma muestra del centrifugador y se inicia el chorro de aire filtrado. El día 2, se toma muestra del centrifugador, la temperatura se cambia a 33°C y se añaden 30 ml de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante al 10% (p. ej., emulsión de poldimetilsiloxano al 35%, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). A lo largo de toda la producción el pH se ajusta según sea necesario para mantenerlo a
25 aproximadamente 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad disminuya a menos de 70%, el cultivo celular se recoge por centrifugación y se filtra a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. El filtrado se almacena a 4°C o se carga inmediatamente en columnas para la purificación.

[0267] Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las proteínas se purifican
30 usando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni^+ -NTA equilibrada en Hepes 20 mM, pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM, con un caudal de 4-5 ml/min, a 4°C . Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrado adicional y la
35 proteína se eluye con tampón de equilibrado que contiene imidazol 0,25 M. La

proteína altamente purificada posteriormente se desaliniza en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna de 25 ml G25 Superfine (Pharmacia) y se almacena a -80°C.

[0268] Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican del medio condicionado como sigue. El medio condicionado se bombea en una columna de 5 ml de Proteína A (Pharmacia) que se ha equilibrado en tampón de fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava extensamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μ l de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada posteriormente se desaliniza en tampón de almacenamiento como se ha descrito antes para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa por geles de poliacrilamida-SDS y secuenciación del aminoácido N-terminal por degradación de Edman.

[0269] Muchos de los polipéptidos descritos en el documento WO 00/73454 se expresaron con éxito como se ha descrito antes.

EJEMPLO 7: Expresión de PRO en levaduras

[0270] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO en levaduras.

[0271] Primero se construyen vectores de expresión de levaduras para la producción intracelular o secreción de PRO a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO y el promotor se insertan en sitios de enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO. Para la secreción, el ADN que codifica PRO se puede clonar 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 levaduras o señal de secreción de invertasa/secuencia líder y secuencias conectoras (si son necesarias) para la expresión de PRO.

[0272] Las células de levaduras, tales como la cepa de levadura AB110, después se pueden transformar con los plásmidos de expresión descritos antes y cultivar en medio de fermentación seleccionado. Los líquidos sobrenadantes de las levaduras transformadas se pueden analizar por precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación por SDS-PAGE, seguido de tinción de los geles con tinte azul de Coomassie.

[0273] El PRO recombinante posteriormente se puede aislar y purificar para separar las células de levaduras del medio de fermentación por centrifugación y

después concentrar el medio usando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene PRO se puede purificar más usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

[0274] Muchos de los polipéptidos PRO descritos en el documento WO 00/73454 se expresaron satisfactoriamente como se ha descrito antes.

EJEMPLO 8: Expresión de PRO en células de insecto infectadas con baculovirus

[0275] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO en células de insecto infectadas con baculovirus.

[0276] La secuencia que codifica PRO se fusiona secuencia arriba con un epítopo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichos epítopos etiquetas incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulinas (regiones tipo Fc de IgG). Se puede usar una variedad de plásmidos, incluyendo los plásmidos derivados de plásmidos disponibles en el comercio tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica PRO o la parte deseada de la secuencia que codifica PRO, tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifica por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador de 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción flanqueadoras (seleccionados). Después el producto se digiere con aquellas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

[0277] El baculovirus recombinante se genera por transfección simultánea del plásmido anterior y ADN vírico BaculoGold™ (PharMingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (disponible en el comercio en GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se usan para amplificaciones adicionales. La infección vírica y la expresión de proteína se llevan a cabo como describen O'Reilley y col., *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*, Oxford: Oxford University Press (1994).

[0278] El PRO etiquetado con poli-His expresado después se puede purificar, por ejemplo, por cromatografía de afinidad de quelato de Ni²⁺ como sigue. Los extractos se preparan a partir de las células Sf9 infectadas por virus recombinantes como describen Rupert y col., *Nature*, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se vuelven a suspender en tampón de ultrasonidos (25 ml de Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; KCl 0,4 M), y se trataron con ultrasonidos 2 veces durante 20 segundos sobre hielo. El resultado de los ultrasonidos se aclara por centrifugación, y el líquido sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de

carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm . Se prepara una columna de agarosa Ni^{2+} -NTA (disponible en el comercio en Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto de células filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta el valor inicial de A_{280} con tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recolección de fracciones. Después, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína unida de forma no específica. Después de volver a alcanzar el valor inicial de A_{280} , la columna se desarrolla con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan por SDS-PAGE y se tiñen con plata o transferencia Western con Ni^{2+} -NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen PRO etiquetado con His_{10} se mezclan y se dializan contra tampón de carga.

[0279] Alternativamente, la purificación de PRO etiquetado con IgG (o etiquetado con Fc) se puede realizar usando técnicas cromatográficas conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna de proteína A o proteína G.

[0280] Muchos de los polipéptidos descritos en el documento WO 00/73454 se expresaron satisfactoriamente como se ha descrito antes.

EJEMPLO 9: Preparación de anticuerpos que se unen a PRO

[0281] Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a PRO.

[0282] Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales son conocidas en la materia, y se describen, por ejemplo, en Goding, véase antes. Los inmunógenos que se pueden usar incluyen PRO purificado, proteínas de fusión que contienen PRO y células que expresan PRO recombinante en la superficie celular. La selección de inmunógenos la puede hacer el experto en la materia sin excesiva experimentación.

[0283] Ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno PRO emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta por vía subcutánea o intraperitoneal una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras de los animales. Después se administra un refuerzo a los ratones inmunizados de 10 a 12 días más tarde con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Después, durante varias semanas, también se puede reforzar a los ratones con inyecciones de inmunización adicionales. Se pueden obtener periódicamente muestras de suero de los

ratones por sangrado retroorbital para ensayo en ELISA para detectar los anticuerpos anti-PRO.

[0284] Después de detectar un título de anticuerpos adecuado, a los animales “positivos” para los anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de PRO. De 3 a 4 días más tarde, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. Después, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) con una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como P3X63AgU.1, disponible en ATCC nº CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que después se pueden cultivar en placa en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

[0285] Las células de hibridoma se cribarán en un EISA para determinar la reactividad contra PRO. La determinación de células de hibridoma “positivas” que segregan los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO está al alcance del experto en la materia.

[0286] Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar por vía intraperitoneal en ratones Balb/c para producir ascitis que contienen los anticuerpos monoclonales anti-PRO. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden hacer crecer en matraces de cultivo celular o botellas giratorias. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los ascitis se puede llevar a cabo usando precipitación con sulfato amónico, seguido de cromatografía en gel de exclusión. Alternativamente, se puede usar cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o proteína G.

EJEMPLO 10: Purificación de polipéptidos PRO usando anticuerpos específicos

[0287] Los polipéptidos PRO nativos o recombinantes se pueden purificar por una variedad de técnicas estándar en la materia de la purificación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido pro-PRO, polipéptido PRO maduro o polipéptido pre-PRO se purifican por cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO de interés. En general, una columna de inmunoafinidad se construye por acoplamiento covalente del anticuerpo anti-polipéptido PRO con una resina cromatográfica activada.

[0288] Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes por precipitación con sulfato amónico o por purificación en Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Igualmente, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de líquido ascítico de ratón por precipitación con

sulfato amónico o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une de forma covalente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CNBr (Farmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina obtenida se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0289] Dicha columna de inmunoafinidad se usa en la purificación del polipéptido PRO preparando una fracción de las células que contienen el polipéptido PRO en una forma soluble. Esta preparación se obtiene por solubilización de la célula entera o de una fracción subcelular obtenida por centrifugación diferencial por adición de detergente o por otros procedimientos conocidos en la materia. Alternativamente, el polipéptido PRO soluble que contiene una secuencia señal puede ser secretado en una cantidad útil en el medio en el que se hacen crecer las células.

[0290] Una preparación que contiene el polipéptido PRO soluble se pasa por la columna de afinidad y la columna se lava en condiciones que permiten la absorción preferente del polipéptido PRO (p. ej., tampones de fuerza iónica alta en presencia de un detergente). Después, la columna se eluye en condiciones que alteran la unión de anticuerpo/polipéptido PRO (p. ej., un tampón de pH bajo tal como aproximadamente pH 2-3, o una concentración alta de un caótopo tal como urea o ion tiocianato) y se recoge el polipéptido PRO.

20 EJEMPLO 11: Cribado de fármacos

[0291] Esta invención es particularmente útil para el cribado de compuestos usando polipéptidos PRO o fragmentos de unión de los mismos en una variedad de técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido PRO o fragmento usado en dicho ensayo puede estar libre en disolución, fijado en un soporte sólido, transportado en una superficie celular o localizado intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármacos usa células hospedadoras eucariotas o procariotas que se transforman establemente con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO o fragmento. Los fármacos se criban frente a dichas células transformadas en ensayos de unión competitivos. Dichas células, en forma viable o fijada, se pueden usar 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 ensayando. Alternativamente, se puede examinar la disminución de formación de complejo entre el polipéptido PRO y su célula diana o receptores diana causadas por el agente que se está ensayando.

35 **[0292]** Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos para cribar

fármacos o cualquier otro agente que pueda afectar a una enfermedad o trastorno asociado con el polipéptido PRO. Estos procedimientos comprenden poner en contacto dicho agente con un polipéptido PRO o fragmento del mismo y ensayar (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO o fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO o fragmento y la célula, por procedimientos conocidos en la materia. En dichos ensayos de unión competitivos, el polipéptido PRO o fragmento normalmente está marcado. Después de incubación adecuada, el polipéptido PRO libre o fragmento se separa del que está presente en forma unida, y la cantidad de marcador libre o que no forma complejo es una medición de la capacidad del agente particular para unirse al polipéptido PRO o para interferir con el complejo de polipéptido PRO/célula.

[0293] Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona el cribado de alto rendimiento para compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a un polipéptido, y se describe con detalle en el documento WO 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Expuesto brevemente, se sintetiza un número grande de compuestos de ensayo péptidos pequeños diferentes sobre un sustrato sólido, tal como punzones de plástico o alguna otra superficie. Cuando se aplica a un polipéptido PRO, los compuestos de ensayo peptídicos se hacen reaccionar con el polipéptido PRO y se lavan. El polipéptido PRO unido se detecta por procedimientos conocidos en la materia. El polipéptido PRO purificado también se puede aplicar como recubrimiento directamente sobre placas para usar en las técnicas de cribado de fármacos mencionadas antes. Además, se pueden usar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

[0294] Esta invención también contempla el uso de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizantes capaces de unirse al polipéptido PRO compiten específicamente con un compuesto de ensayo por la unión al polipéptido PRO o fragmentos del mismo. De esta forma, los anticuerpos se pueden usar para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO.

30 EJEMPLO 12: Diseño racional de fármacos

[0295] El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales del polipéptido de interés biológicamente activo (es decir, un polipéptido PRO) o de moléculas pequeñas con las que interaccionan, p. ej., agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquier de estos ejemplos se puede usar para diseñar fármacos que son más activos o formas estables del polipéptido PRO o que potencian o

interfieren con la función del polipéptido PRO *in vivo* (véase, Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

[0296] En un procedimiento, la estructura tridimensional del polipéptido PRO, o de un complejo de polipéptido PRO-inhibidor, se determina por cristalografía de rayos X, por modelización por ordenador, o más habitualmente, por una combinación de los dos procedimientos. Deben evaluarse tanto la forma como las cargas del polipéptido PRO para elucidar la estructura y determinar el o los sitios activos de la molécula. Con menos frecuencia, se puede obtener información relacionada con la estructura del polipéptido PRO mediante modelización basada en la estructura de las proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural relevante se usa para diseñar moléculas de tipo polipéptido PRO análogas o para identificar inhibidores eficaces. Los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos pueden incluir moléculas que tienen actividad o estabilidad mejoradas como muestran Braxton y Wells, *Biochemistry*, 31:7796-7801 (1992) o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos, como muestran Athauda y col., *J. Biochem.*, 113:742-746 (1993).

[0297] También se puede aislar un anticuerpo específico de diana, seleccionado por ensayo funcional, como se ha descrito antes, y después resolver su estructura cristalina. Este procedimiento, en principio, da un farmacóforo en el cual se puede basar el posterior diseño de fármaco. Se puede evitar la cristalografía de proteínas generando anticuerpos anti-idiotípicos (anti-id) contra un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. El anti-id después se podría usar para identificar y aislar péptidos de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados después actuarían como farmacóforos.

[0298] En virtud de la presente invención, pueden estar disponibles suficientes cantidades del polipéptido PRO para realizar dichos estudios analíticos como la cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO proporcionada en el presente documento, proporcionará una guía a los que usan técnicas de modelización por ordenador, en lugar de o además de la cristalografía de rayos X.

EJEMPLO 13: Estimulación de la proliferación de células endoteliales (Ensayo 8)

[0299] Este ensayo se diseña para determinar si los polipéptidos PRO de la presente invención presentan capacidad para estimular el crecimiento de células endoteliales de los capilares corticosuprarrenales (ACE). Se espera que polipéptidos PRO que dan la prueba positiva en este ensayo sean útiles para el tratamiento

terapéutico de afecciones o trastornos en los que la angiogénesis fuera beneficiosa, incluyendo, por ejemplo, la curación de heridas y similares (así como los agonistas de estos polipéptidos PRO). Se espera que antagonistas de los polipéptidos PRO que dan positivo en este ensayo sean útiles en el tratamiento terapéutico de tumores cancerosos.

5 **[0300]** Se cultivaron células endoteliales de los capilares corticosuprarrenales (ACE) bovinas (de cultivo primario, máximo de 12-14 pases) en placas de 96 pocillos con 500 células/pocillo por 100 microlitros. El medio de ensayo incluía DMEM con bajo contenido en glucosa, suero de ternero al 10%, glutamina 2 mM, y 1X penicilina/estreptomicina/fungizona. Los pocillos de control incluían lo siguiente: (1)
 10 sin células ACE añadidas; (2) solo células ACE; (3) células ACE más VEGF (5 ng/ml); y (4) células ACE más FGF (5 ng/ml). Después se añadió la muestra de control o de ensayo (en volúmenes de 100 microlitros) a los pocillos (en diluciones de 1%, 0,1% y 0,01%, respectivamente). Los cultivos celulares se incubaron durante 6-7 días a 37°C/CO₂ al 5%. Después de incubación, se aspiró el medio de los pocillos y las
 15 células se lavaron con 1X PBS. Después se añadió a cada pocillo una mezcla de reacción de fosfatasa ácida (100 microlitros; acetato sódico 0,1 M, pH 5,5, Triton X-100 al 0,1%, fosfato de p-nitrofenilo 100 mM). Después de una incubación de 2 horas a 37°C, la reacción se paró por adición de 10 microlitros de NaOH 1 N. Se midió la densidad óptica (DO) en un lector de microplaca a 405 nm.

20 **[0301]** Se calculó la actividad de un polipéptido PRO como el número de veces de aumento de la proliferación (determinado por la actividad de la fosfatasa ácida, DO 405 nm) con respecto a (1) base solo de células, y (2) con respecto a la estimulación máxima por el VEGF. Se usó VEGF (3-10 ng/ml) y FGF (1-5 ng/ml) como una referencia de la actividad para la estimulación máxima. Los resultados del ensayo se
 25 consideraron “positivos” si la estimulación observada era $\geq 50\%$ de aumento frente a la base. El VEGF (5 ng/ml) de control con dilución de 1% dio una estimulación de 1,24 veces; el FGF (5 ng/ml) de control con dilución de 1% dio 1,46 veces de estimulación.

[0302] El polipéptido PRO1186 dio la prueba positiva en este ensayo.

EJEMPLO 14: Detección de polipéptidos PRO que afectan a la absorción de glucosa o

30 FFA por adipocitos de rata primarios (Ensayo 94)

[0303] Este ensayo se diseña para determinar si los polipéptidos PRO presentan la capacidad de afectar a la absorción de glucosa o FFA por las células de adipocitos. Se espera que los polipéptidos PRO que dan la prueba positiva en este ensayo sean útiles para el tratamiento terapéutico de trastornos en los que sería beneficiosa la
 35 estimulación o inhibición de la absorción de glucosa por los adipocitos, incluyendo,

por ejemplo, la obesidad, diabetes o hiper o hipoinsulinemia.

[0304] En un formato de 96 pocillos, se añaden los polipéptidos PRO que se van a ensayar a adipocitos de rata primarios, y se dejan incubar durante la noche. Se toman muestras a las 4 y 16 horas y se analiza la absorción de glicerol, glucosa y FFA.

5 Después de 16 horas de incubación, se añade insulina al medio y se deja incubar durante 4 horas. En este momento, se toma una muestra y se mide la absorción de glicerol, glucosa y FFA. Se usa medio que contiene insulina sin el polipéptido PRO como un control de referencia positivo. Puesto que el polipéptido PRO que se está ensayando puede estimular o inhibir la absorción de glucosa y FFA, los resultados se
10 puntúan como positivos si el ensayo es mayor que 1,5 veces o menor de 0,5 veces el control de insulina.

[0305] El polipéptido PRO1186 dio la prueba positiva como inhibidor de la absorción de glucosa y/o FFA en este ensayo.

EJEMPLO 15: Ensayo de rediferenciación de condrocitos (Ensayo 10)

15 **[0306]** Este ensayo muestra que algunos polipéptidos de la invención actúan para inducir la rediferenciación de condrocitos, y por lo tanto, se espera que sean útiles para el tratamiento de diferentes trastornos óseos y/o de cartílago tales como, por ejemplo, lesiones deportivas y artritis. El ensayo se lleva a cabo como sigue. Los condrocitos porciones se aíslan por digestión con colagenasa durante la noche del cartílago
20 articular de las articulaciones metacarpofalángicas de cerdos hembra de 4-6 meses de edad. Las células aisladas después se siembran, con 25.000 células/cm² en Ham F-12 que contiene FBS al 10% y gentamicina 4 µg/ml. El medio de cultivo se cambia cada tercer día y las células después se siembran en placas de 96 pocillos con 5.000 células/pocillo en 100 µl del mismo medio sin suero y se añaden 100 µl de polipéptido
25 PRO de ensayo, estaurosporina 5 nM (control positivo) o medio solo (control negativo) para dar un volumen final de 200 µl/pocillo. Después de 5 días de incubación a 37°C, se toma una foto de cada pocillo y se determina el estado de diferenciación de los condrocitos. Se produce un resultado positivo en el ensayo cuando la rediferenciación de los condrocitos se determina que es más similar al
30 control positivo que al control negativo. El polipéptido PRO1186 da la prueba positiva en este ensayo.

EJEMPLO 16: Ensayo antitumoral in vitro (Ensayo 161)

[0307] La actividad antiproliferativa de diferentes polipéptidos PRO se determinó en el ensayo in vitro de descubrimiento de fármacos anticancerígenos de investigación
35 orientada a la enfermedad, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), usando un ensayo

de unión a tinte de sulforodamina B (SRB) esencialmente como describen Skehan y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-1112 (1990). Las 60 líneas de células tumorales usadas en este estudio ("el panel del NCI"), así como las condiciones para el mantenimiento y cultivo in vitro las han descrito Monks y col., *J. Natl. Cancer Inst.* 5 83:757-766 (1991). El propósito de este cribado es evaluar inicialmente la actividad citotóxica y/o citostática de los compuestos de ensayo frente a diferentes tipos de tumores (Monks y col., véase antes; Boyd, *Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update* 3(10):1-12 [1989]).

[0308] Se recogieron células de aproximadamente 60 líneas de células tumorales humanas con tripsina/EDTA (Gibco), se lavaron una vez, se volvieron a suspender en IMEM y se determinó su viabilidad. Las suspensiones de células se añadieron mediante pipeta (volumen de 100 µl) a placas separadas de microvaloración de 96 pocillos. La densidad celular para la incubación de 6 días era menor que para la incubación de 2 días para prevenir el sobrecrecimiento. Los inoculados se dejaron 15 durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C para la estabilización. Se añadieron diluciones de dos veces la concentración de ensayo pretendida, en el tiempo cero en partes alícuotas de 100 µl a los pocillos de la placa de microvaloración (dilución 1:2). Los compuestos de ensayo se evaluaron en 5 diluciones semilogarítmicas (de 1000 a 100.000 veces). Las incubaciones tuvieron lugar durante 20 días y 6 días en una atmósfera de CO₂ al 5% y 100% de humedad.

[0309] Después de incubación, se separó el medio y las células se fijaron en 0,1 ml de ácido tricloroacético al 10% a 40°C. Las placas se aclararon 5 veces con agua desionizada, se secaron y se tiñeron durante 30 minutos con 0,1 ml de tinte de sulforodamina B al 0,4% (Sigma) disuelto en ácido acético al 1%, se aclararon 4 veces 25 con ácido acético al 1% para separar el tinte no unido, se secaron y se extrajo el tinte durante 5 minutos con 0,1 ml de base Tris 10 mM [tris(hidroximetil)aminometano], pH 10,5. Se midió la absorbancia (DO) de la sulforodamina B a 492 nm usando un lector de placa de microvaloración de 96 pocillos, conectado a ordenador.

[0310] Una muestra de ensayo se considera positiva si presenta al menos 50% de 30 efecto inhibitor del crecimiento realizado a una o más concentraciones. Los resultados se presentan en la siguiente tabla, en la que las abreviaturas son las siguientes:

CPCNP = carcinoma de pulmón de células no pequeñas

SNC = sistema nervioso central

Tabla 7

Compuesto de ensayo	Concentración	Días	Tipo de línea de células tumorales	Denominación de la línea celular
PR01186	95 nM	2	CPCNP	NCI-H226
PR01186	95 nM	2	Colon	Colo205
PR01186	2,2 nM	6	Mama	MDA-N
PR01186	114 nM	2	CPCNP	NCI-H322M
PR01186	114 nM	2	SNC	SF-268; SF-539
PR01186	114 nM	2	Ovario	IGFOV1
PR01186	114 nM	2	Renal	786-0; SN12C; TK-10
PR01186	114 nM	6	Leucemia	MOLT-4; RPMI-8226
PR01186	114 nM	6	Melanoma	LOX IMVI
PR01186	114 nM	6	Ovario	OVCAR-4; SK-OV-3
PR01186	114 nM	6	Mama	MDA-MB-435; T-47D
PR01186	8,1 nM	6	Leucemia	K-562
PR01186	8,1 nM	6	CPCNP	HOP-62
PR01186	8,1 nM	6	Colon	Colo205. HCC-2998
PR01186	8,1 nM	6	Mama	T-47D
PR01186	15,4 nM	6	Leucemia	K-562
PR01186	3,6 nM	2	Ovario	OVCAR-3
PR01186	3,6 nM	6	CPCNP	HOP-62

[0311] Los resultados de estos ensayos demuestran que los polipéptidos PRO que dan la prueba positiva son útiles para inhibir el crecimiento neoplásico en una serie de tipos de células tumorales diferentes y se pueden de modo terapéutico para ello. Los anticuerpos contra estos polipéptidos PRO son útiles para la purificación por afinidad de estos polipéptidos útiles. Los ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos PRO son útiles para la preparación recombinante de estos polipéptidos.

Depósito de material

[0312] Los siguientes materiales se han depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Tabla 10

Material	Nº de dep en ATCC	Fecha de depósito
DNA60621-1516	203091	4 de agosto, 1998

[0313] Este depósito se hizo de acuerdo con el Tratado de Budapest y el

reconocimiento internacional del Depósito de microorganismos para el propósito de procedimiento de patente y las regulaciones del mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha de depósito. La ATCC pondrá a disposición el depósito bajo los términos del

5 Tratado de Budapest, y sujeto a un acuerdo entre Genentech, Inc., y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito al público tras concesión de la pertinente patente de EE.UU. o tras apertura al público de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, cualquiera que sea antes, y asegura la disponibilidad de la progenie a aquel que el Comisionado de

10 Patentes y Marcas de EE.UU. determine con derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y conforme a las normas del Comisionado de acuerdo con esto (que incluye 37 CFR §1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

[0314] El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en depósito muriera o se perdiera o destruyera cuando se cultivase en

15 condiciones adecuadas, los materiales serían sustituidos inmediatamente tras notificación, con otros iguales. La disponibilidad del material depositado no está considerado como una licencia para la práctica de la invención en contravención con los derechos garantizados por las autoridades de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes sobre patentes.

20 **[0315]** La memoria descriptiva anteriormente escrita se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia la práctica de la invención. La presente invención no está limitada en alcance por la construcción depositada, puesto que la realización depositada se pretende que sea solo una ilustración de determinados aspectos de la invención. El depósito de material del presente documento no constituye

25 la admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento es inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni debe considerarse como limitante del alcance de las reivindicaciones de las ilustraciones específicas que se representan. Realmente, diferentes modificaciones además de las mostradas y descritas en el presente

30 documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0316]

<110> Genentech, Inc.

35 Baker, Kevin

- Chen, Jian
 Goddard, Audrey
 Gurney, Austin
 Smith, Victoria
 5 Watanabe, Colin K.
 Wood, William I.
 Yuan, Jean
 <120> Polipéptidos de transmembrana y secretados y ácidos nucleicos que los codifican
 10 <130> P2730P1PCT
 <140> PCT/US00/08439
 <141> 2000-03-30
 <160> 4
 <210> 1
 15 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótido sintética
 20 <400> 1
 tgtaaacga cggccagta aatagacctg caattattaa tct 43
 <210> 2
 <211> 41
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sonda de oligonucleótido sintética
 <400> 2
 caggaaacag ctatgaccac ctgcacacct gcaaatecat t 41
 30 <210> 3
 <211> 1415
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

tggcctcccc agcttgccag gcacaaggct gagcgggagg aagcgagagg 50
 catctaagca ggcagtgttt tgccttcacc ccaagtgacc atgagaggtg 100
 ccacgcgagt ctcaatcatg ctctcctag taactgtgtc tgactgtgct 150
 gtgatcacag gggcctgtga gcgggatgtc cagtgtgggg caggcacctg 200
 ctgtgccatc agcctgtggc ttcgagggct gcggatgtgc accccgctgg 250
 ggcgggaagg cgaggagtgc caccccggca gccacaaggc ccccttcttc 300
 aggaaacgca agcaccacac ctgtccttgc ttgcccaacc tgctgtgctc 350
 caggttcccc gacggcaggt accgctgctc catggacttg aagaacatca 400
 atttttaggc gcttgccctgg tctcaggata cccaccatcc ttttctgag 450
 cacagcctgg atttttatct ctgccatgaa acccagctcc catgactctc 500
 ccagtcccta cactgactac cctgatctct cttgtctagt acgcacatat 550
 gcacacaggc agacatacct cccatcatga catgggtcccc aggctggcct 600
 gaggatgtca cagcttgagg ctgtggtgtg aaagggtggc agcctggctc 650
 tcttccctgc tcaggctgcc agagaggtgg taaatggcag aaaggacatt 700
 cccctcccc tccccagggtg acctgctctc tttctggggc cctgccccctc 750
 tccccacatg tatccctcgg tctgaattag acattcctgg gcacaggctc 800
 ttgggtgcat tgctcagagt cccaggctct ggctgacctc tcaggccctt 850
 cacgtgaggt ctgtgaggac caatttgtgg gtagtccatc ttcccccgat 900
 tggttaactc cttagtttca gaccacagac tcaagattgg ctcttcccag 950
 agggcagcag acagtcaccc caaggcaggt gtagggagcc cagggaggcc 1000
 aatcagcccc ctgaagactc tgggtcccagt cagcctgtgg cttgtggcct 1050
 gtgacctgtg accttctgcc agaattgtca tgctctgag gccccctctt 1100
 accacacttt accagttaac cactgaagcc cccaattccc acagcttttc 1150
 cattaanaatg caaatgggtg tggttcaatc taatctgata ttgacatatt 1200
 agaaggcaat tagggtgttt ccttaaaaaa ctcctttcca aggatcagcc 1250
 ctgagagcag gttggtgact ttgaggaggg cagtcctctg tccagattgg 1300
 ggtgggagca agggacaggg agcagggcag gggctgaaag gggcactgat 1350
 tcagaccagg gaggcaacta cacaccaaca tgctggcttt agaataaaaag 1400
 caccaactga aaaaa 1415

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado para usar en un procedimiento de tratamiento médico, teniendo el polipéptido:
 - 5 la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEC ID N°: 4), con o sin el péptido señal; o que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 80% respecto a la secuencia de los restos de aminoácidos 1 ó 20 a 105 mostrada en la figura 2 (SEC ID N°: 4), en el que la
 - 10 que el polipéptido tiene la capacidad de estimular el crecimiento de células endoteliales corticosuprarrenales; o
la secuencia de aminoácidos codificada por la molécula de ácido nucleico depositada con el número de acceso en ATCC 203091, con o sin el péptido señal.
- 15 2. Un polipéptido aislado para usar en un procedimiento de tratamiento médico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel de identidad es al menos 85%.
3. Un polipéptido aislado para usar en un procedimiento de tratamiento
20 médico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el nivel de identidad es al menos 90%.
4. Un polipéptido aislado para usar en un procedimiento de tratamiento médico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el nivel de identidad es al menos
25 95%.
5. Una molécula quimérica para usar en un procedimiento de tratamiento médico, comprendiendo la molécula un polipéptido como se define en cualquiera de las reivindicaciones precedentes fusionado con una secuencia de aminoácidos
30 heteróloga.
6. La molécula quimérica de la reivindicación 6, para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que dicha secuencia de aminoácido heteróloga es una región Fc de inmunoglobulina.

7. Un ácido nucleico aislado para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el ácido nucleico:
codifica un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o es el complemento de dicho ácido nucleico; o tiene una
5 identidad de secuencia de al menos 80% con respecto a los restos 91 ó 148 a 405, inclusive, de la figura 1 (SEC ID N°: 3), en el que la identidad de secuencia se determina usando el programa de ordenador ALIGN-2 y en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene la capacidad de estimular el crecimiento de células endoteliales corticosuprarrenales, o el complemento de dicho ácido nucleico; o
10 comprende la secuencia codificante de longitud completa del inserto de ADN (DNA60621-1516) contenido en el número de acceso en ATCC 203091.
8. El ácido nucleico de la reivindicación 7, para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el nivel de identidad es al menos 85%.
- 15 9. El ácido nucleico de la reivindicación 8, para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el nivel de identidad es al menos 90%.
10. El ácido nucleico de la reivindicación 9, para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el nivel de identidad es al menos 95%.
- 20 11. El ácido nucleico de la reivindicación 10, para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el ácido nucleico comprende la secuencia codificante de longitud completa de la secuencia mostrada en la figura 1 (SEC ID N°: 3).
- 25 12. El ácido nucleico de la reivindicación 11, para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el ácido nucleico comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1 (SEC ID N°: 3).
13. Un vector que comprende el ácido nucleico de una cualquiera de las
30 reivindicaciones 7 a 12, para usar en un procedimiento de tratamiento médico.
14. El vector de la reivindicación 13, para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el vector es un vector vírico.
- 35 15. El polipéptido, molécula quimérica, ácido nucleico o vector de cualquier

reivindicación precedente, para usar en la promoción de la angiogénesis.

16. El uso de un polipéptido o molécula quimérica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la preparación de un medicamento para promover la
5 angiogénesis.

17. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido como se define en la reivindicación 1, primera o tercera parte, e inhibe su capacidad para estimular el crecimiento de células endoteliales de capilares
10 corticosuprarrenales.

18. El anticuerpo de la reivindicación 17, para usar en un procedimiento de tratamiento médico.

15 19. Un anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17 o reivindicación 18.

20. Un anticuerpo humanizado o fragmento de anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19.
20

21. Un antagonista del polipéptido de la reivindicación 1, primera o tercera parte, para usar en un procedimiento de tratamiento médico, en el que el antagonista es un oligonucleótido de sentido contrario, ribozima o molécula de triple hélice, que se dirige contra un ácido nucleico como se define en una cualquiera de las
25 reivindicaciones 7, tercera parte, 11 y 12.

22. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo o antagonista de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, para usar en la inhibición de la angiogénesis.

30 23. El anticuerpo, fragmento de anticuerpo o antagonista de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, para usar en el tratamiento de tumores cancerosos.

24. El uso de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o antagonista de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en la preparación de un medicamento para
35 inhibir la angiogénesis.

25. El uso de un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o antagonista de una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 21, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de tumores cancerosos.
- 5 26. Un procedimiento para identificar un antagonista de un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, comprendiendo el procedimiento:
- poner en contacto un compuesto de ensayo con dicho polipéptido en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que el compuesto de ensayo y
- 10 el polipéptido interaccionen; y
- determinar si está modulada la capacidad de dicho polipéptido para estimular el crecimiento de células endoteliales de capilares corticosuprarrenales.

FIGURA 1

TGGCCTCCCCAGCTTGCCAGGCACAAGGCTGAGCGGGAGGAAGCGAGAGGCATCTAAGCAGG
CAGTGTTTTGCCTTCACCCCAAGTGACCATGAGAGGTGCCACGCGAGTCTCAATCATGCTCC
TCCTAGTAACTGTGTCTGACTGTGCTGTGATCACAGGGGCTGTGAGCGGGATGTCCAGTGT
GGGGCAGGCACCTGCTGTGCCATCAGCCTGTGGCTTCGAGGGCTGCGGATGTGCACCCCGCT
GGGGCGGGAAGGCGAGGAGTGCCACCCCGCAGCCACAAGGTCCCCTTCTTCAGGAAACGCA
AGCACCACACCTGTCCCTTGCTTGCCCAACCTGCTGTGCTCCAGGTTCCCGGACGGCAGGTAC
CGCTGCTCCATGGACTTGAAGAACATCAATTTTTTAGGCGCTTGCCTGGTCTCAGGATACCCA
CCATCCTTTTCTGAGCACAGCCTGGATTTTTATTCTGCCATGAAACCCAGCTCCCATGAC
TCTCCCAGTCCCTACACTGACTACCTGATCTCTTGTCTAGTACGCACATATGCACACAG
GCAGACATACTCCCATCATGACATGGTCCCCAGGCTGGCCTGAGGATGTCACAGCTTGAGG
CTGTGGTGTGAAAGGTGGCCAGCCTGGTCTCTTCCCTGCTCAGGCTGCCAGAGAGGTGGTA
AATGGCAGAAAGGACATCCCCCTCCCCCTCCCCAGGTGACCTGCTCTCTTTCCCTGGGCCCTG
CCCCCTCCCCACATGTATCCCTCGGTCTGAATTAGACATTCCTGGGCACAGGCTCTTGGGT
GCATTGCTCAGAGTCCCAGGTCCTGGCCTGACCCTCAGGCCCTTACCGTGAGGTCTGTGAGG
ACCAATTTGTGGGTAGTTCATCTTCCCTCGATTGGTTAACTCCTTAGTTTCAGACCACAGAC
TCAAGATTGGCTCTTCCCAGAGGGCAGCAGACAGTCACCCCAAGGCAGGTGTAGGGAGCCCA
GGGAGGCCAATCAGCCCCCTGAAGACTCTGGTCCCAGTCAGCCTGTGGCTTGTGGCCTGTGA
CCTGTGACCTTCTGCCAGAATTGTCATGCCTCTGAGGCCCTCTTACCACACTTTACCAGT
TAACCACTGAAGCCCCCAATTCCCACAGCTTTTCCATTTAAATGCAAATGGTGGTGGTTCAA
TCTAATCTGATATTGACATATTAGAAGGCAATTAGGGTGTTCCTTAAACAACCTCTTTCCA
AGGATCAGCCCTGAGAGCAGGTTGGTGACTTTGAGGAGGGCAGTCCTCTGTCCAGATTGGGG
TGGGAGCAAGGGACAGGGAGCAGGGCAGGGCTGAAAGGGGCACTGATTTCAGACCAGGGAGG
CAACTACACACCAACATGCTGGCTTTAGAATAAAAGCACCAACTGAAAAA

FIGURA 2

MRGATRVSIMLLLVTVSDCAVITGACERDVQCGAGTCCAISLWLRGLRMCTPLGREGECHP
GSHKVPFFRKRKHHTCPCLPNLLCSRFPDGRYRCSMDLKNINF

Péptido señal:

aminoácidos 1-19

Sitio de fosforilación de la tirosina quinasa:

aminoácidos 88-95

Sitios de N-miristoilación

aminoácidos 33-39, 35-41, 46-52

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • US 5536637 A [0003]
- EP 404097 A [0077]
- WO 9311161 A [0077]
- US 4275149 A [0080]
- US 5364934 A [0088]
- 15 • WO 8705330 A [0100]
- US 4640835 A [0102]
- US 4496689 A [0102]
- US 4301144 A [0102]
- US 4670417 A [0102]
- 20 • US 4791192 A [0102]
- US 4179337 A [0102]
- US 5428130 A [0105]
- WO 8905859 A [0113]
- US 4399216 A [0113]
- 25 • DD 266710 [0114]
- US 4946783 A [0114]
- EP 139383 A [0115]
- US 4943529 A [0115]
- EP 402226 A [0115]
- 30 • EP 183070 A [0115]
- EP 244234 A [0115]
- EP 394538 A [0115]
- WO 9100357 A [0115]
- US 5010182 A [0118]
- 35 • EP 362179 A [0118]
- WO 9013646 A [0118]
- EP 36776 A [0122]
- EP 73657 A [0124]
- GB 2211504 A [0125]
- 40 • EP 117060 A [0128]
- EP 117058 A [0128]
- WO 9106629 A [0137]
- WO 9010048 A [0138]
- WO 9013641 A [0139]
- 45 • WO 9104753 A [0140]
- WO 9010448 A [0141]
- US 4736866 A [0146]
- US 4870009 A [0146]
- US 4657760 A [0158]
- 50 • US 5206344 A [0158]
- US 5225212 A [0158]
- WO 9703692 A [0159]
- WO 9640072 A [0159]
- WO 9607399 A [0159]
- 55 • US 5654010 A [0159]
- WO 9733551 A [0174] [0175]
- US 4816567 A [0186] [0190]
- US 5545807 A [0191]
- US 5545806 A [0191]
- 60 • US 5569825 A [0191]
- US 5625126 A [0191]
- US 5633425 A [0191]
- US 5661016 A [0191]
- WO 9308829 A [0193]
- 65 • WO 9627011 A [0195]
- US 4676980 A [0200]
- WO 9100360 A [0200]
- WO 92200373 A [0200]
- EP 03089 A [0200]
- 70 • WO 9411026 A [0203]
- US 4485045 A [0205]
- US 4544545 A [0205]
- US 5013556 A [0205]
- US 3773919 A [0211]
- 75 • WO 0073454 A [0254] [0269] [0274]
- [0280]
- EP 307247 A [0256]
- US 5122469 A [0266]
- WO 8403564 A [0293]
- 80 • US 0008439 W [0316]

Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción

- Klein et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996, vol. 93, 7108-7113 [0003]
- 5 • Int. J. Biochem, 1985, vol. 17 (6), 695-699 [0007]
- Joubert ; Strydom. Hoppe Seylers Z Physiol. Chem., 1980, vol. 361 (12), 1787-1794 [0007]
- Nielsen et al. Prot. Eng., 1997, vol. 10, 1-6 [0033]
- von Heinje et al. Nucl. Acids. Res., 1986, vol. 14, 4683-4690 [0033]
- 10 • Altschul et al. Methods in Enzymology, 1996, vol. 266, 460-480 [0038] [0045] [0216]
- Altschul et al. Nucleic Acids Res., 1997, vol. 25, 3389-3402 [0039] [0046]
- Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience Publishers, 1995 [0057]
- 15 • Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0060]
- Zapata et al. Protein Eng., 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0070]
- Pluckthun. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0076]
- 20 • Hollinger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0077] [0198]
- Carter et al. Nucl. Acids Res., 1986, vol. 13, 4331 [0094]
- Wells et al. Gene, 1985, vol. 34, 315 [0094]
- Wells et al. Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 1986, vol. 317, 415 [0094]
- Cunningham ; Wells. Science, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0095]
- 25 • Creighton. The Proteins. W.H. Freeman & Co, [0095]
- Chothia. J. Mol. Biol., 1976, vol. 150, 1 [0095]
- T.E. Creighton. Proteins: Structure and Molecular Properties. W.H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0097]
- Aplin ; Wriston. CRC Crit. Rev. Biochem., 1981, 259-306 [0100]
- 30 • Hakimuddin et al. Arch. Biochem. Biophys., 1987, vol. 259, 52 [0101]
- Edge et al. Anal. Biochem., 1981, vol. 118, 131 [0101]
- Thotakura et al. Meth. Enzymol., 1987, vol. 138, 350 [0101]
- Field et al. Mol. Cell. Biol., 1988, vol. 8, 2159-2165 [0104]
- Evan et al. Molecular and Cellular Biology, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0104]
- 35 • Paborsky et al. Protein Engineering, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0104]
- Hopp et al. BioTechnology, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0104]
- Martin et al. Science, 1992, vol. 255, 192-194 [0104]
- Skinner et al. J. Biol. Chem., 1991, vol. 266, 15163-15166 [0104]
- Lutz-Freyermuth et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0104]
- 40 • Stewart et al. Solid-Phase Peptide Synthesis. W.H. Freeman Co, 1969 [0106]
- Merrifield. J. Am. Chem. Soc., 1963, vol. 85, 2149-2154 [0106]
- Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0108]
- Dieffenbach et al. PCR Primer: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor
- 45 Laboratory Press, 1995 [0108]

- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. IRL Press, 1991 [0112]
- Shaw et al. *Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0113]
- Eb. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0113]
- Van Solingen et al. *J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0113]
- 5 • Hsiao et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0113]
- Keown et al. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0113]
- Mansour et al. *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0113]
- Beach ; Nurse. *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0115]
- Fler et al. *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0115]
- 10 • Louvencourt et al. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154 (2), 737-742 [0115]
- Van den Berg et al. *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0115]
- Sreekrishna et al. *J. Basic Microbiol.*, 1988, vol. 28, 265-278 [0115]
- Case et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0115]
- Ballance et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0115]
- 15 • Tilburn et al. *Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0115]
- Yelton et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0115]
- Kelly ; Hynes. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0115]
- C. Anthony. *The Biochemistry of Methylotrophs*, 1982, 269 [0115]
- Graham et al. *J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0116]
- 20 • Urlaub; Chasin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0116]
- Mather. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0116]
- Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0121]
- Stinchcomb et al. *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0121]
- Kingsman et al. *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0121]
- 25 • Tschemper et al. *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0121]
- Jones. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0121]
- Chang et al. *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0122]
- Goeddel et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0122]
- Goeddel. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0122]
- 30 • deBoer et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0122]
- Hitzeman et al. *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0123]
- Hess et al. *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0123]
- Holland. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0123]
- Gething et al. *Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0128]
- 35 • Mantei et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0128]
- Thomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0129]
- Deutscher. *Methods in Enzymology*, 1990, 182 [0132]
- Scopes. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag, 1982 [0132]
- Stein ; Cohen. *Cancer Res*, 1988, vol. 48, 2659 [0136]
- 40 • van der Krol et al. *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 958 [0136]
- Thomas ; Capecchi. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0147]
- Li et al. *Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0147]
- Bradley. *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*. IRL, 1987, 113-152 [0147]
- 45 • Zamecnik et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 4143-4146 [0148]

- Dzau et al. Trends in Biotechnology, 1993, vol. 11, 205-210 [0149]
- Wu et al. J. Biol. Chem., 1987, vol. 262, 4429-4432 [0149]
- Wagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0149]
- Anderson et al. Science, 1992, vol. 256, 808-813 [0149]
- 5 • Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0153]
- The use of interspecies scaling in toxicokinetics. Mordenti, J. ; Chappell, W. et al. Toxicokinetics and New Drug Development. Pergamon Press, 1989, 42-96 [0157]
- Johnson et al. Nat. Med., 1996, vol. 2, 795-799 [0159]
- Yasuda. Biomed. Ther., 1993, vol. 27, 1221-1223 [0159]
- 10 • Hora et al. Bio/Technology, 1990, vol. 8, 755-758 [0159]
- Design and Production of Single Immunization Bacines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems. Cleland. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. Plenum Press, 1995, 439-462 [0159]
- iodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. Marcel Dekker, 1990, 1-41 [0160]
- 15 • Fields ; Song. Nature (London), 1989, vol. 340, 245-246 [0165]
- Chien et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0165]
- Chevray ; Nathans. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, vol. 89, 5789-5793 [0165]
- Coligan et al. Current Protocols in Immun. 1991, vol. 1 [0168]
- Lee et al. Nucl. Acids Res., 1979, vol. 6, 3073 [0172]
- 20 • Cooney et al. Science, 1988, vol. 241, 456 [0172]
- Dervan et al. Science, 1991, vol. 251, 1360 [0172]
- Okano. Neurochem., 1991, vol. 56, 560 [0172]
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression. CRC Press, 1988 [0172]
- 25 • Rossi. Current Biology, 1994, vol. 4, 469-471 [0174]
- Kohler ; Milstein. Nature, 1975, vol. 256, 495 [0180]
- Goding. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, 1986, 59-103 [0181]
- Kozbor. J. Immunol., 1984, vol. 133, 3001 [0182]
- 30 • Brodeur et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0182]
- Munson ; Pollard. Anal. Biochem., 1980, vol. 107, 220 [0183]
- Jones et al. Nature, 1986, vol. 321, 522-525 [0189] [0190]
- Riechmann et al. Nature, 1988, vol. 332, 323-329 [0189]
- 35 • Presta. Curr. Op. Struct. Biol., 1992, vol. 2, 593-596 [0189]
- Riechmann et al. Nature, 1988, vol. 332, 323-327 [0190]
- Verhoeyen et al. Science, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0190]
- Hoogenboom ; Winter. J. Mol. Biol., 1991, vol. 227, 381 [0191]
- Marks et al. J. Mol. Biol., 1991, vol. 222, 581 [0191]
- 40 • Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, 1985, 77 [0191]
- Boerner et al. J. Immunol., 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0191]
- Marks et al. Bio/Technology, 1992, vol. 10, 779-783 [0191]
- Lonberg et al. Nature, 1994, vol. 368, 856-859 [0191]
- 45 • Morrison. 368. Nature, 1994, 812-13 [0191]

- Fishwild et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0191]
- Neuberger. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0191]
- Lonberg ; Huszar. *Intern. Rev. Immunol.*, 1995, vol. 13, 65-93 [0191]
- Milstein ; Cuello. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0193]
- 5 • Traunecker et al. *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0193]
- Suresh et al. *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0194]
- Brennan et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0196]
- Shalaby et al. *J. Exp. Med*, 1992, vol. 175, 217-225 [0197]
- Kostelny et al. *J. Immunol.*, 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0198]
- 10 • Gruber et al. *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 5368 [0198]
- Tutt et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 60 [0198]
- Caron et al. *J. Exp Med.*, 1992, vol. 176, 1191-1195 [0201]
- Shopes. *J. Immunol*, 1992, vol. 148, 2918-2922 [0201]
- Wolff et al. *Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0201]
- 15 • Stevenson et al. *Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0201]
- Vitetta et al. *Science*, 1987, vol. 238, 1098 [0203]
- Epstein et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0205]
- Hwang et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0205]
- Martin et al. *J. Biol. Chem*, 1982, vol. 257, 286-288 [0206]
- 20 • Gabizon et al. *J. National Cancer Inst.*, 1989, vol. 81 (19), 1484 [0206]
- Marasco et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0208]
- Zola. *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*. CRC Press, Inc, 1987, 147-158 [0212]
- Hunter et al. *Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0212]
- 25 • David et al. *Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014 [0212]
- Pain et al. *J. Immunol. Meth.*, 1981, vol. 40, 219 [0212]
- Nygren. *J. Histochem. and Cytochem.*, 1982, vol. 30, 407 [0212]
- Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology* [0218]
- Holmes et al. *Science*, 1991, vol. 253, 1278-1280 [0219]
- 30 • Gietz et al. *Nucl. Acid. Res.*, 1992, vol. 20, 1425 [0225]
- Kaiser et al. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press, 1994, 207 [0225]
- Kaiser et al. *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Press, 1994, 208-210 [0229]
- Biely et al. *Anal. Biochem.*, 1988, vol. 172, 176-179 [0230]
- 35 • Altshul et al. *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0237]
- Bolivar et al. *Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0246]
- Thimmappaya et al. *Cell*, 1982, vol. 31, 543 [0257]
- Somparyac et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 12, 7575 [0259]
- Ausubel et al. *Protocols of Molecular Biology*. John Wiley and Sons, 1997 [0264]
- 40 • Lucas et al. *Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24 (9), 1774-1779 [0264]
- O'Reilley et al. *Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual*. Oxford University Press, 1994 [0277]
- Rupert et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 175-179 [0278]
- Hodgson. *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 19-21 [0295]
- 45 • Braxton ; Wells. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 7796-7801 [0296]

- Athauda et al. *Biochem.*, 1993, vol. 113, 742-746 [0296]
- Skehan et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, vol. 82, 1107-1112 [0307]
- Monks et al. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1991, vol. 83, 757-766 [0307]
- Boyd. *Cancer: Princ. Pract. Oncol. Update*, 1989, vol. 3 (10), 1-12 [0307]