(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 295 224**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Número de solicitud europea: **01986152 .5**
(86) Fecha de presentación : **07.12.2001**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1366161**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **03.12.2003**

(54) Título: **Anticuerpo antagonista anti-PRO842.**

(30) Prioridad: **28.02.2001 WO PCT/US01/06520**
28.08.2001 US 941992

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2008

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

(72) Inventor/es: **French, Dorothy;**
Grimaldi, J. Christopher;
Hillan, Kenneth, J.;
Pisabarro, Maria, Teresa;
Schmidt, Kerstin, N.;
Smith, Victoria;
Tumas, Daniel;
Vandlen, Richard, L.;
Watanabe, Colin, K.;
Williams, P. Mickey;
Wood, William, I. y
Eaton, Dan L.

(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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo antagonista anti-PRO842.

Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a la identificación y aislamiento de ADN nuevo y a la producción recombinante de polipéptidos nuevos que tienen una homología estructural con la quimioquina interleuquina-8.

Antecedentes de la invención

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

Las proteínas secretadas tienen varias aplicaciones industriales, incluyendo productos farmacéuticos, de diagnóstico, bionsensores y biorreactores. La mayoría de los fármacos de proteínas disponibles actualmente, tales como agentes trombolíticos, interferones, interleuquinas, eritropoyetinas, factores estimulantes de colonias, y varias otras citoquinas, son proteínas secretoras. Sus receptores, que son proteínas de membrana, también tienen potencial como agentes terapéuticos o de diagnóstico.

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

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

Se están realizando esfuerzos tanto a nivel de industria como académica para identificar nuevas proteínas nativas secretadas y nuevas proteínas unidas a membrana o receptores nativos. Muchos esfuerzos se centran en el cribado de bibliotecas de ADN recombinante de mamífero para identificar las secuencias codificantes de nuevas proteínas secretadas. En la literatura se describen procedimientos y técnicas de cribado [véase, por ejemplo, Klein *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci., 93: 7108-7113 (1996); Patente de Estados nidos No. 5.536.637)].

En este sentido, la presente invención se refiere a la identificación de polipéptidos secretados nuevos de la familia de la interleuquina-8 (IL-8) que se ha observado que están relacionados con enfermedades mediadas por el sistema inmune y enfermedades inflamatorias. Las enfermedades mediadas por el sistema inmune y las enfermedades inflamatorias son la manifestación o la consecuencia de múltiples mecanismos biológicos bastante complejos, frecuentemente interconectados, que en la fisiología normal son críticos para responder a la lesión o daño, iniciar la reparación de la lesión o daño, y montar la defensa innata y adquirida contra organismos extraños. La enfermedad o patología aparece cuando estos mecanismos fisiológicos normales provocan una lesión o daño adicionales directamente relacionados con la intensidad de la respuesta, como consecuencia de la regulación anormal o la estimulación excesiva, como una reacción consigo mismo o como una combinación de éstos.

Aunque la génesis de enfermedades relacionadas con el sistema inmune implica frecuentemente mecanismos con múltiples etapas y frecuentemente múltiples mecanismos/sistemas biológicos diferentes, la intervención en los puntos críticos de uno o más de estos mecanismos puede tener un efecto de mejora o terapéutico. La intervención terapéutica puede tener lugar mediante antagonismo de un proceso/mecanismo perjudicial o la estimulación de un proceso/mecanismo beneficioso.

Se conocen y se han estudiado de forma extensa muchas enfermedades relacionadas con el sistema inmune. Dichas enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune (tal como artritis reumatoide, enfermedad renal mediada por el sistema inmune, enfermedades hepatobiliares, enfermedad de intestino inflamatorio (IBD), psoriasis y asma), enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmune, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasia, etc.

Las enfermedades relacionadas con el sistema inmune podrían tratarse mediante la supresión de la respuesta inmune. La utilización de anticuerpos neutralizantes que inhiben moléculas que tienen una actividad estimuladora inmune sería beneficioso en el tratamiento de enfermedades mediadas por el sistema inmune y enfermedades inflamatorias. Se pueden utilizar moléculas que inhiben la respuesta inmune (proteínas de manera directa o mediante la utilización de anticuerpos agonistas) para inhibir la respuesta inmune y, de este modo, mejorar la enfermedad relacionada con el sistema inmune.

La presente invención se refiere a la identificación de una quimioquina nueva que tiene homología estructural con la interleuquina-8 (IL-8). La secuencia de aminoácidos entre las dos proteínas es baja, aunque ambas tienen un motivo CXC, que clasifica a IL-8 como un miembro de la familia de quimioquinas CXC. Se ha observado que la interleuquina-8 tiene una función importante en la respuesta inflamatoria aguda. Esta respuesta está mediada principalmente por TNF-α, IL-1 e IL-6. Ente los efectos localizados se incluyen una mayor adherencia de glóbulos blancos circulantes a células endoteliales vasculares y su extravasación en espacios tisulares. Tanto IL-1 como TNF-α inducen un aumento de la expresión de las moléculas de adhesión celular (CAMs) en células endoteliales. Estas dos citoquinas también inducen la producción de interleuquina-8 por macrófagos y células endoteliales. IL-8 atrae quimiotácticamente meutrófilos y provoca su adherencia a células endoteliales. Específicamente, la IL-8 quimioatrae monocitos y células dendríticas. Ambos tipos de células tienen una función importante en la iniciación de una respuesta inmune.

Desde el descubrimiento hace 13 años de la interleuquina-8 (IL-8) como un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, ha habido una acumulación de evidencias que lo han establecido como un mediador crucial en la inflamación aguda dependiente de neutrófilos. De hecho, la infiltración de leucocitos es un sello característico de la inflamación. Numerosas observaciones han demostrado que varios tipos de células pueden producir una gran cantidad de IL-8, en respuesta a varios estímulos o constitutivamente después de una transformación maligna (Mukaida, N., International Journal of Hematology, 72 (4): 391-398 (2000)). La liberación de IL-8 es desencandenada por señales inflamatorias de una serie de células. La diversidad en la fuente celular indica una pleiotropía de sus funciones. IL-8 juega un papel clave en el mecanismo de defensa del huésped a través de sus efectos en la activación de neutrófilos, pero una presencia continuada de IL-8 en la circulación en respuesta a condiciones inflamatorias implica que el bloqueo de sus acciones podría explotarse con objetivos terapéuticos (Atta-ur-Rahman *et al*., Current Pharmaceutical Design, 5(4): 241-253 (1999)). Recientemente, se ha observado que IL-8 es un factor de crecimiento autocrino para el cáncer de ovario humano. Parece que IL-8 juega un papel directo en el crecimiento progresivo de las células de cáncer de ovario (Xu, L. y Fidler, I.J., Oncology Research, 12(2): 97-106 (2000)). Además, se han observado mayores niveles de IL-8 en fluidos de lavados broncoalveolares (BAL) de pacientes con síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS). La presencia de complejos anti-IL-8:IL-8 en fluidos BAL de pacientes con ARDS es un indicador de pronóstico importante para el desarrollo y situación de ARDS (Kurdowska, A. *et al*., American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 163(2): 463-468 (2001)).

Tal y como se ha descrito anteriormente, la clase de moléculas conocidas como quimioquinas son una familia de citoquinas proinflamatorias de peso molecular bajo (8-11 kDa) caracterizadas por un motivo estructuralmente conservado y su capacidad para mediar la quimiotaxis de leucocitos, jugando así un papel importante en el tráfico de leucocitos, así como en la función de regulación. Ahora está claro que estas citoquinas pequeñas juegan un papel en una serie de procesos homoestáticos y de la enfermedad, incluyendo el desarrollo, hematopoyesis, alergias, angiogénesis, y oncogénesis (véase Broxmeyer, H.E. *et al*., J. Exp. Med., 170: 1583 (1989); Cao, Y. *et al*., J. Exp. Med., 182: 2069 (1995); y Strieter, R. M. *et al*., J. Biol. Chem., 270: 27348 (1995)). La mayoría de quimioquinas se expresan en respuesta a algunos estímulos, pero varios se expresan constitutivamente (Wang, J. M. *et al*., J. Immunol. Methods, 220: 1-17 (1998); Baggiolini, M., Annu. Rev. Immunol., 15: 675-705 (1997); y Gale, L. M. y McColl, S.R., Bioessays, 21: 17-28 (1999). Además, se ha observado que diversas citoquinas CC, incluyendo RANTES, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP)^4-1α y MIP-1β, son capaces de inhibir la infección por VIH (Cocchi, F. *et al*., Science, 270: 1811 (1995)).

La familia de quimioquinas se puede dividir en cuatro subfamilias principales basadas en las posiciones de residuos de cisteína amino terminal. En las quimioquinas CXC, las primeras dos cisteínas están separadas por un aminoácido no conservado, mientras que en la subfamilia de quimioquinas CC, estas dos cisteínas están adyacentes entre sí. La subfamilia de quimioquinas C donde el único miembro de linfotactina carece de la segunda y la cuarta cisteína, que se conservan en las quimioquinas CXC y CC. Las quimioquinas unidas a membrana CX_3C tienen 3 aminoácidos entre las primeras dos cisteínas, un tallo tipo mucina largo y un dominio transmembrana corto (Bazan, J. F. *et al*., Nature 385: 640 (1997); Pan, Y. *et al*., Nature, 387: 611 (1997)). En general, las quimioquinas CXC recrutan principalmente neutófilos, mientras que las quimioquinas CC atraen principalmente monocitos y también linfocitos, basófilos y/o eosinófilos con una selectividad variable. La quimioquina C de linfotactina parece actuar específicamente sobre linfocitos T y células NK (Kelner, G. S. *et al*., Science, 266: 1395 (1994) y Kennedy, J. G. *et al*., J. Immunol., 155: 203 (1995)).

Las células dendríticas (DC) son las APCs únicamente potentes implicadas en las respuestas inmunes (Banchereau, J., y Steinman, R. M., Nature, 392: 245 (1998)). Como adyuvantes para la liberación de Ag, las células dendríticas inmaduras recogen Ags en la periferia y las transportan al área de las células T en órganos linfoides para cebar las respuestas inmunes, a la vez que maduran. De este modo, las quimioquinas juegan un papel vital en el tráfico, maduración y funcionamiento de dendríticas.

Además, numerosas citoquinas juegan un papel en la generación de una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). El patrón de citoquinas implicadas en una respuesta DTH sugiere que células T activadas pueden ser principalmente del subgrupo Th1. La IL-2 funciona de una manera autocrina para amplificar la población de células T productoras de citoquinas. Entre las citoquinas producidas por estas células están un grupo que actúan para activar y atraer macrófagos al sitio de activación de Th1. La IL-3 y GM-CSF inducen una hematopoyesis localizada del linaje de granulocitos-monocitos. IFN-γ y TNF-β (junto con TNF-α derivado de macrófagos e IL-1) actúan sobre células endoteliales próximas, induciendo una serie de cambios que facilitan la extravasación de monocitos y otras células inflamatorias no específicas. Entre los cambios inducidos están los incrementos en la expresión de moléculas de adhesión celular incluyendo ICAMs, VCAMs y ELAMss; cambios en la forma de las células endoteliales vasculares para facilitar la extravasación; y la secreción de IL-8 y el facto quimiotáctico de monocitos. Los neutrófilos y monocitos circulantes se adhieren a las moléculas de adhesión mostradas en las células endoteliales vasculares y se extravasan a los espacios de los tejidos. Los neutrófilos aparecen pronto en la reacción, mientras que la infiltración de monocitos aparece más tarde. (Véase, Immunology, Segunda Edición, Capítulo 15, páginas 363-364 (copyright 1994) W.H. Freeman and Company Publishers).

El interés por esta familia ha aumentado ya que ha quedado claro que las quimioquinas pueden contribuir a una serie de condiciones médicas importantes relacionadas con la función inmune; incluyendo artritis reumatoide, enfermedades renales mediadas por el sistema inmune, enfermedades hepatobiliares, enfermedad inflamatoris intestinal, psoriasis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, promoción del crecimiento tumoral o enfermedad degenerativa de las articulaciones. Dado el potencial de las moléculas relacionadas con las citoquinas para desarrollar funciones importantes en el control de la función inmune, existe un interés por la identificación de otros miembros de esta familia y los receptores que dirigen las acciones de estas moléculas a través de poblaciones de células diana concretas. En este aspecto, la presente invención describe la clonación y caracterización de proteínas novedosas (designada en la presente invención como polipéptidos "PRO842") que son estructuralmente similares a IL-8 y variantes activas de la misma.

Descripción resumida de la invención

A. *Realizaciones*

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos útiles para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune en mamíferos, incluyendo humanos. La presente invención se basa en la identificación de proteínas (incluyendo anticuerpos antagonistas) que estimulan o inhiben la respuesta inmune en mamíferos, en particular, la infiltración de células inmunes. Las enfermedades relacionadas con el sistema inmune se pueden tratar mediante la supresión o aumento de la respuesta inmune. Las moléculas que aumentan la respuesta inmune estimulan o potencian la respuesta inmune a un antígeno. Las moléculas que estimulan la respuesta inmune se pueden utilizar terapéuticamente cuando el aumento de la respuesta inmune sea beneficioso. Alternativamente, se pueden utilizar terapéuticamente moléculas que suprimen la respuesta inmune, atenúan o reducen la respuesta inmune a un antígeno (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) cuando la atenuación de la respuesta inmune sea beneficiosa (por ejemplo, inflamación). Por consiguiente, los polipéptidos PRO842 y anticuerpos antagonistas de los mismos de la presente invención también son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune y enfermedades inflamatorias. Dichas medicinas y medicamentos pueden comprender una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido PRO842, o anticuerpo antagonista del mismo con un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la mezcla es estéril.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de agonistas o antagonistas a un polipéptido PRO842 que comprende poner en contacto el polipéptido PRO842 con una molécula candidata y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO842 tal y como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, el polipéptido PRO842 es un polipéptido PRO842 nativo de secuencia nativa. En un aspecto específico, el agonista o antagonista de PRO842 es un anticuerpo anti-PRO842.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende un anticuerpo antagonista de polipéptido PRO842 que se une al polipéptido en una mezcla con un portador o excipiente. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. Cuando una composición comprende una molécula estimuladora del sistema inmune, la composición es útil para: (a) aumentar la infiltración de células inflamatorias en un tejido de un mamífero con necesidad de las mismas, (b) estimular o aumentar una respuesta inmune en un mamífero con necesidad de la misma, (c) incrementar la proliferación de linfocitos T en un mamífero con necesidad de los mismos en respuesta a un antígeno, (d) estimular la actividad de linfocitos T o (e) aumentar la permeabilidad vascular. Además, cuando una composición comprende una molécula inhibidora del sistema inmune, la composición es útil para: (a) disminuir la infiltración de células inflamatorias en un tejido de un mamífero con necesidad de las mismas, (b) inhibir o reducir una respuesta inmune en un mamífero con necesidad de la misma, (c) disminuir la actividad de linfocitos T o (d) disminuir la proliferación de linfocitos T en un mamífero con necesidad de

los mismos en respuesta a un antígeno. En otro aspecto, la composición comprende un principio activo adicional, que puede, por ejemplo, ser un anticuerpo adicional o un agente citotóxico o agente quimioterapéutico. Preferiblemente, la composición es estéril.

En la presente invención se describe la utilización de un polipéptido PRO842, o un anticuerpo antagonista para el mismo, en la preparación de un medicamento para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmune en un mamífero con necesidad del mismo. Entre las enfermedades relacionadas con el sistema inmune se incluyen: lupus eritematosis sistémico, artritis reumatoide, osteoartritis, artritis juvenil crónica, espondiloartropatías, esclerosis sistémica, miopatías inflamatorias idiopáticas, síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune, trombocitopenia autoinmune, tiroiditis, diabetes melitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune, enfermedades de desmielinación de los sistemas nervioso central y periférico, tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares, tales como infecciones, hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino, enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune incluyendo enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como penumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y pneumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas con el transplante incluyendo el rechazo de injertos y enfermedad de injerto contra huésped.

En la presente invención también se describe un anticuerpo que se une específicamente a cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, anticuerpo humanizado, fragmento de anticuerpo o anticuerpo de cadena única. El anticuerpo puede ser un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido PRO842. En otro aspecto, el anticuerpo mimetiza la actividad de un polipéptido PRO842 (un anticuerpo agonista). En cambio, en un aspecto de la presente invención, el anticuerpo inhibe o neutraliza la actividad de un polipéptido PRO842 (un anticuerpo antagonista). En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que preferiblemente tiene residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) no humana y residuos de una región de armazón ("framework") (FR) humana. El anticuerpo puede estar marcado y puede inmovilizarse en un soporte sólido. En un aspecto adicional, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena única, o un anticuerpo anti-idiotípico.

En aun otra realización, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo antagonista anti-PRO842 en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. Preferiblemente, la composición es estéril. La composición se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica líquida que se puede conservar para conseguir una mayor estabilidad de almacenamiento. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo de cadena única.

En la presente invención se describe un artículo de fabricación que comprende:

(a) una composición de materia que comprende un polipéptido PRO842 o agonista, antagonista, o un anticuerpo que se une específicamente a dicho polipéptido del mismo;

(b) un recipiente que contiene dicha composición; y

(c) una etiqueta fijada a dicho recipiente, o un prospecto incluido en dicho recipiente que hace referencia a la utilización de dicho polipéptido PRO842 o agonista o antagonista del mismo en el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmune. La composición puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido PRO842 o el agonista o antagonista del mismo.

En la presente invención también se describe un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad relacionada con el sistema inmune en un mamífero, que comprende la detección del nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido PRO842 (a) en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) en una muestra de control de células de tejido normal conocido del mismo tipo de células, donde un nivel de expresión más elevado o inferior a la muestra de prueba de comparación indica la presencia de una enfermedad relacionada con el sistema inmune en el mamífero del que se obtienen las células de tejido de prueba.

En la presente invención también se describe un procedimiento de diagnóstico en un mamífero que comprende (a) poner en contacto un anticuerpo ad-PRO842 con una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y un polipéptido PRO842 en la muestra de prueba; donde la formación de dicho complejo es indicativa de la presencia o ausencia de dicha enfermedad. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa y se puede realizar comparando con la monitorización de la formación del complejo en una muestra de control de células de tejido normal conocido del mismo tipo de células. Una mayor cantidad de complejos formados en la muestra de prueba indica la presencia o ausencia de una enfermedad inmune en el mamífero del que se obtienen las células de tejido de prueba. El anticuerpo preferiblemente transporta un marcador detectable. La formación de complejos se puede monitorizar, por ejemplo, mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en la técnica. La muestra de prueba se obtiene habitualmente de un individuo sospechoso de tener una deficiencia o anormalidad del sistema inmune.

En la presente invención también se describe un procedimiento para determinar la presencia de un polipéptido PRO842 en una muestra que comprende exponer una muestra de prueba de células sospechosas de contener el polipéptido PRO842 a un anticuerpo anti-PRO842 y determinar la unión de dicho anticuerpo a dicha muestra de células. En un aspecto específico, la muestra comprende una célula sospechosa de contener el polipéptido PRO842 y el anticuerpo que se une a la célula. El anticuerpo se detecta preferiblemente mediante un marcador y/o unido a un soporte sólido.

En la presente invención también se describe un kit de diagnóstico de una enfermedad relacionada con el sistema inmune, que comprende un anticuerpo anti-PRO842 y un portador en un envase adecuado. El kit contiene preferiblemente las instrucciones para la utilización del anticuerpo para detectar la presencia del polipéptido PRO842. Preferiblemente, el portador es farmacéuticamente aceptable.

En la presente invención también se describe un kit de diagnóstico, que contiene un anticuerpo anti-PRO842 en un envase adecuado. El kit contiene preferiblemente las instrucciones para la utilización del anticuerpo para detectar la presencia del polipéptido PRO842.

En otro aspecto, se describe un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad relacionada con el sistema inmune en un mamífero, que comprende la detección de la presencia o ausencia de un polipéptido PRO842 en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas de dicho mamífero, donde la presencia o ausencia del polipéptido PRO842 en dicha muestra de prueba es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con el sistema inmune.

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar un agonista de un polipéptido PRO842 tal y como se define en las reivindicaciones que comprende: (a) poner en contacto las células y un compuesto de prueba a cribar bajo condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular inducida normalmente por un polipéptido PRO842; y (b) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si el compuesto de prueba es un agonista eficaz, donde la inducción de dicha respuesta celular es indicativa de que dicho compuesto de prueba es un agonista eficaz.

En otra realización, la presente invención se refiere a un procedimiento para identificar un compuesto capaz de inhibir la actividad de un polipéptido PRO842 tal y como se define en las reivindicaciones, que comprende el poner en contacto un compuesto candidato con un polipéptido PRO842 bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen y determinar si se inhibe la actividad del polipéptido PRO842. En un aspecto específico, el compuesto candidato o el polipéptido PRO842 se inmovilizan en un soporte sólido. En otro aspecto, el compuesto no inmovilizado transporta un marcador detectable. En un aspecto preferido, este procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto células y un compuesto de prueba a cribar en presencia de un polipéptido PRO842 bajo condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular inducida normalmente por un polipéptido PRO842; y (b) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si el compuesto de prueba es un agonista eficaz.

En la presente invención se describe un procedimiento para identificar un compuesto que inhibe la expresión de un polipéptido PRO842 en células que normalmente expresan el polipéptido, donde el procedimiento comprende poner en contacto las células con un compuesto de prueba y determinar si se inhibe la expresión del polipéptido PRO842. En un aspecto preferido, este procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto células y un compuesto de prueba a cribar bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión del polipéptido PRO842; y (b) determinar la inhibición de la expresión de dicho polipéptido.

En la presente invención se describe la utilización de una molécula de ácido nucleico que codifica para (a) un polipéptido PRO842, o (b) un antagonista de un polipéptido PRO842, donde dicho antagonista es un anticuerpo anti-PRO842 en la preparación de medicamentos para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmune en un mamífero que padece del mismo. En una realización preferida, el mamífero es humano. En otra realización preferida, el medicamento es para la administración a través de terapia génica *ex vivo*. En una realización preferida adicional, el ácido nucleico está comprendido en un vector, más preferiblemente un vector adenoviral, viral asociado a adeno, lentiviral o retroviral.

En la presente invención se describe una partícula viral recombinante que comprende un vector viral que consiste esencialmente en un promotor, un ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido PRO842, (b) un polipéptido agonista de un polipéptido PRO842, o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido PRO842, y una secuencia señal para la secreción celular del polipéptido, donde el vector viral está asociado con proteínas estructurales virales. Preferiblemente, la secuencia señal es de un mamífero, tal como de un polipéptido PRO842 nativo.

En la presente invención se describe una célula productora *ex vivo* que comprende una construcción de ácidos nucleicos que expresa proteínas estructurales retrovirales y también comprende un vector retroviral que consiste esencialmente en un promotor, ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido PRO842, (b) un polipéptido agonista de un polipéptido PRO842 o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido PRO842 y una secuencia señal para la secreción celular del polipéptido, donde dicha célula productora empaqueta el vector retroviral asociado con las proteínas estructurales para producir partículas retrovirales recombinantes.

Se describen también usos médicos de (a) un polipéptido PRO842, o (b) un anticuerpo antagonista de un polipéptido PRO842 en un procedimiento para aumentar la infiltración de células inflamatorias desde la vasculatura hasta un tejido de un mamífero, donde se aumenta la infiltración de células inflamatorias desde la vasculatura en el mamífero.

En la presente invención se describen usos médicos de (a) un polipéptido PRO842 o (b) un anticuerpo antagonista de un polipéptido PRO842 en un procedimiento para disminuir la infiltración de células inflamatorias infiltración de células inflamatorias desde la vasculatura hasta un tejido de un mamífero, donde se disminuye la infiltración de células inflamatorias desde la vasculatura en el mamífero.

En la presente invención se describe un procedimiento para aumentar la actividad de linfocitos T en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de (a) un polipéptido PRO842, (b) un agonista de un polipéptido PRO842 o (c) un antagonista de un polipéptido PRO842, donde se aumenta la actividad de linfocitos T en el mamífero.

En la presente invención se describe un procedimiento para disminuir la actividad de linfocitos T en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de (a) un polipéptido PRO842, (b) un agonista de un polipéptido PRO842 o (c) un antagonista de un polipéptido PRO842, donde se disminuye la actividad de linfocitos T en el mamífero.

En la presente invención se describe un procedimiento para aumentar la proliferación de linfocitos T en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de (a) un polipéptido PRO842, (b) un agonista de un polipéptido PRO842 o (c) un antagonista de un polipéptido PRO842, donde se aumenta la proliferación de linfocitos T en el mamífero.

En la presente invención se describe un procedimiento para disminuir la proliferación de linfocitos T en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de (a) un polipéptido PRO842, (b) un agonista de un polipéptido PRO842 o (c) un antagonista de un polipéptido PRO842, donde se disminuye la proliferación de linfocitos T en el mamífero.

En la presente invención se describe un kit que comprende una composición que comprende un PRO842, o un agonista o antagonista del mismo, en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable; un recipiente que contiene dicha composición; y un marcador fijado a dicho recipiente, refiriéndose el uso de dicha composición al tratamiento de un trastorno cartilaginoso degenerativo.

B. *Realizaciones adicionales*

En la presente invención también se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO842.

En un aspecto, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido PRO842 que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de aminoácidos que carece de péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente

un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificante de un ADNc de polipéptido PRO842 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, la secuencia codificante de un polipéptido PRO842 que carece de péptido señal tal y como se describe en la presente invención, la secuencia codificante de un dominio extracelular de un polipéptido PRO842 transmembrana, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o la secuencia codificante de cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

En un aspecto adicional, se describe la molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por cualquier ADNc de proteína humana depositado con la ATCC tal y como se describe en la presente invención, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

Otro aspecto describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido PRO842 que es transmembrana con dominio eliminado o transmembrana con dominio inactivado, o es complementario a dicha secuencia de nucleótidos codificante, donde el dominio o dominios transmembrana de dicho polipéptido se describen en la presente invención. Por lo tanto, se consideran dominios extracelulares solubles de los polipéptidos PRO842 descritos en la presente invención.

Otro aspecto describe fragmentos de una secuencia codificante de polipéptido PRO842, o el complemento de la misma, que se pueden utilizar como , por ejemplo, sondas de hibridación, para codificar fragmentos de un polipéptido PRO842 que puede opcionalmente codificar un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO842 o como sondas de oligonucleótidos antisentido. Dichos fragmentos de ácidos nucleicos habitualmente tienen por lo menos 20 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 40 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 80 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 110 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 130 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 140 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 160 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 170 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 190 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos

aproximadamente 200 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 250 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 350 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 400 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 500 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 700 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 800 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud y alternativamente por lo menos aproximadamente 1000, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de secuencia de nucleótidos de referencias más o menos un 10% de la longitud de referencia. Debe indicarse que los fragmentos nuevos de una secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO842 se pueden determinar de forma rutinaria mediante la alineación de la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO842 con otra secuencia de nucleótidos conocida utilizando cualquiera de una serie de programas de alineación de secuencias bien conocidos y la determinación de qué fragmento o fragmentos de secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO842 son nuevos. Todas dichas secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido PRO842 se consideran en la presente invención. También se consideran los fragmentos de polipéptidos PRO842 codificados por estos fragmentos de moléculas de nucleótidos, preferiblemente los fragmentos de polipéptidos PRO842 que comprenden un sitio de unión para un anticuerpo anti-PRO842.

Un polipéptido PRO842 aislado puede ser codificado por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos aisladas identificadas anteriormente en la presente invención.

En cierto aspecto, se describe un polipéptido PRO842 aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con un polipéptido PRO842 que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente.

También se describe un polipéptido PRO842 aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de aminoácidos de longitud codificada por cualquier de los ADNcs de proteína humana depositados con la ATCC tal y como se describe en la presente invención.

También se describe un polipéptido PRO842 aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que muestra por lo menos aproximadamente un 80% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de positivos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de positivos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de positivos cuando se compara con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido PRO842 que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de aminoácidos que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de una proteína transmembrana, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos de longitud completa tal y como se describe en la presente invención.

También se describe un polipéptido PRO842 aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o la metionina de iniciación es codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos tal y como se ha descrito anteriormente en la presente invención. Los procesos para producir los mismos también se describen en la presente invención, donde estos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificadora adecuada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido PRO842 y la recuperación del polipéptido PRO842 del cultivo celular.

Se describe también un polipéptido PRO842 aislado que es transmembrana con dominio eliminado o transmembrana con dominio inactivado. En la presente invención también se describen procesos para producir el mismo. En la presente estos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante adecuada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido PRO842 y la recuperación del polipéptido PRO842 del cultivo celular.

En otra realización adicional, la presente invención se refiere a antagonistas de un polipéptido PRO842 nativo tal y como se define en la presente invención. El antagonista es un anticuerpo anti-PRO842.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de identificación de agonistas o antagonistas a un polipéptido PRO842 que comprende poner en contacto el polipéptido PRO842 con una molécula candidata y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO842 tal y como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, el polipéptido PRO842 es un polipéptido PRO842 nativo.

En aún otra realización, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende un antagonista de un polipéptido PRO842 tal y como se describe en la presente invención, un anticuerpo anti-PRO842, combinado con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

En la presente invención también se describe la utilización de un polipéptido PRO842, o un antagonista del mismo tal y como se ha descrito anteriormente, un anticuerpo anti-PRO842, para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una condición que es sensible al polipéptido PRO842, o un antagonista del mismo, o un anticuerpo anti-PRO842.

En aspectos adicionales se describen vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención. También se proporcionan células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, *E. coli*, levadura o células de insecto infectadas con Baculovirus. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención y comprende el cultivo de células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y la recuperación del polipéptido deseado del cultivo celular.

En la presente invención se describen moléculas quiméricas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención fusionados a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. Un ejemplo de dichas moléculas quiméricas comprende cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente invención fusionados a una secuencia de epítopo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

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

En la presente invención también se describen sondas de oligonucleótidos útiles para aislar secuencias de nucleótidos genómicos y ADNc o como sondas antisentido, donde estas sondas pueden derivar de cualquiera de las secuencias de nucleótidos descritas anterior o posteriormente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID No: 1) de ADNc de PRO842 de secuencia nativa, donde SEC ID No: 1 es un clon designado en la presente invención como "DNA56855-1447".

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID No: 2) derivada de la secuencia codificante de SEC ID No: 1 mostrada en la figura 1.

La figura 3 muestra el patrón de expresión en tejido de DNA56855 (CK27) según se demuestra mediante la hibridación a un "array" de expresión en múltiples tejidos humanos. Se observó una expresión significativa en pulmón (A8), estómago (B5) y tráquea (H7). En los ovarios, próstata, colon y pulmón fetal se detectó una expresión débil de CK27.

La figura 4 muestra el patrón de expresión en tejidos de DNA56855 (CK27) según se muestra mediante la hibridación de una sonda de 150 pb a una transferencia Northern en múltiples tejidos humanos. Se observó una expresión significativa en el estómago, tiroides, nódulos linfáticos y tráquea.

La figura 5 muestra el patrón de expresión en tejidos de CK27 murino en una transferencia de ARN de ratón. Se observó una expresión significativa en el pulmón (A4), tiroides (C2), glándula submaxilar (C4) y útero (D5).

La figura 6 demuestra que PRO842 (CK27) atrae específicamente células dendríticas (células $CD11c^+$) en comparación con células $CD3^+$ o células $CD16^+$.

La figura 7 muestra que diferentes lotes de PRO842 (CK27) muestran una actividad quimioatractiva similar.

La figura 8 demuestra que el tratamiento térmico de PRO842 (CK27) reduce la quimioatración de células dendríticas (células $CD11c^+$) y células monocíticas (células $CD14^+$) a PRO842 (CK27).

La figura 9 demuestra la formación de quistes ováricos en ratones transgénicos con DNA56855 humano (CK27). La imagen superior izquierda corresponde al control (ovario normal en ratones no transgénicos); la imagen inferior izquierda muestra la degeneración quística y hemosiderina en ratones transgénicos CK27; la imagen superior derecha muestra el ovario con cambios de hemosiderina que se extienden el tejido adiposo adyacente en ratones transgénicos CK27; y la imagen inferior derecha de alta resolución muestra la presencia de macrófagos cargados de pigmento.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. *Definiciones*

Los términos "polipéptido PRO" y "PRO" tal y como se utilizan en la presente invención y cuando va seguido inmediatamente por una denominación numérica se refiere a varios polipéptidos, en los que la denominación completa (es decir, PRO/número) se refiere a secuencias de polipéptido específicas tal y como se describen en la presente invención. Los términos "polipéptido PRO/número" y "PRO/número" en los que el término "número" se proporciona como una designación numérica real, tal y como se utiliza en la presente invención, comprenden polipéptidos de secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que se definen posteriormente en la presente invención). Los polipéptidos PRO descritos en la presente invención pueden aislarse de una variedad de orígenes, tales como tipos de tejido humano o de otros orígenes, o prepararse mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido PRO" se refiere a cada polipéptido PRO/número individual descrito en la presente invención. Todas las descripciones de esta memoria que se refieren al "polipéptido PRO" se refieren a cada uno de los polipéptidos de forma individual como colectivamente. Por ejemplo, las descripciones de la preparación, purificación, derivación, formación de anticuerpos para o contra, administración, composiciones que lo contienen, tratamiento de una enfermedad con el mismo, etc., pertenecen a cada polipéptido de la presente invención de forma individual. El término "polipéptido PRO" también incluye variantes de los polipéptidos PRO/número descritos en la presente invención.

Un "polipéptido PRO842 de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido PRO842 derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos PRO842 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido PRO842 de secuencia nativa" comprende específicamente formas secretadas o truncadas naturales del polipéptido PRO842 específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme ("spliced") alternativas) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En varias realizaciones de la presente invención, los polipéptidos PRO842 de secuencia nativa descritos en la presente invención son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras que se acompañan. Los codones de inicio y detención se muestran en letra negrita y están subrayadas en las figuras. Sin embargo, aunque el polipéptido PRO842 descrito en las figuras acompañantes se muestra que empieza con residuos de metionina designados en la presente invención como posición 1 de los aminoácidos en las figuras, es concebible y posible que se puedan utilizar otros residuos de metionina situados en dirección corriente arriba o dirección corriente abajo desde la posición 1 de los aminoácidos en las figuras como el residuo de aminoácido de partida para los polipéptidos PRO842.

El "dominio extracelular" o "ECD" del polipéptido PRO842 se refiere a una forma del polipéptido PRO842 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmico. Normalmente, el ECD del polipéptido PRO842 tendrá menos de un 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplásmicos y preferiblemente, tendrá menos de un 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos PRO842 de la presente invención se identifica según el criterio utilizado habitualmente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana puede variar pero probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio según se ha identificado inicialmente en la presente invención. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido PRO842 puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier parte del límite del dominio transmembrana/dominio extracelular tal y como se identifica en los Ejemplos o la descripción y la presente invención considera dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica.

La localización aproximada de los "péptidos señal" de los diversos polipéptidos PRO842 descritos en la presente invención se muestra en la presente descripción y/o las figuras que se acompañan. Sin embargo, hay que indicar que el extremo C-terminal de un péptido señal puede variar, pero probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier parte del extremo C-terminal del péptido señal según se ha identificado inicialmente en la presente invención, donde el extremo C-terminal del péptido señal se puede identificar según el criterio utilizado habitualmente en la técnica para identificar ese tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen *et al*., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) y von Henje *et al*., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la división de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, dando lugar a más de una especie secretada. La presente invención también considera estos polipéptidos maduros, en los que el péptido señal se divide en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier parte del extremo C-terminal del péptido señal según se ha identificado en la presente invención, y los polinucleótidos que los codifican.

La "variante de polipéptido PRO842" significa un polipéptido PRO842 activo tal y como se ha definido anteriormente o posteriormente que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido PRO842 de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido PRO842 que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO842, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO842 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Entre dichas variantes de polipéptido PRO842 se incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO842 en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden, o se eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Habitualmente, una variante de polipéptido PRO842 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido PRO842 de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente, una secuencia de polipéptido PRO842 que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO842, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido PRO842 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Habitualmente, los polipéptidos variantes de PRO842 tienen por los menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias del polipéptido PRO842 identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de polipéptido PRO842, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

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

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A con B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B con A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizando este procedimiento, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "Proteína de comparación" con la secuencia de aminoácidos denominada "PRO", en la que "PRO" representa la secuencia de aminoácidos de un hipotético polipéptido PRO de interés, "Proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que se está comparando el polipéptido "PRO" de interés, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos.

A menos que se afirme específicamente lo contrario, los valores en % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad en la secuencia de aminoácidos también se pueden obtener tal y como se describe a continuación mediante la utilización del programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al*., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento ("overlap span") = 1, fracción de solapamiento ("overlap fraction") = 0,125, umbral de palabra ("word threshold") T = 11, y matriz de puntuación ("scoring matrix") = BLOSUM 62. Cuando se utiliza WU-BLAST-2, el valor en % de identidad en la secuencia de aminoácidos se determina dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido PRO nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara el polipéptido PRO de interés que puede ser un polipéptido variante PRO) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de B", la secuencia de aminoácidos A es la secuencia de aminoácidos de comparación de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés.

El porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos también se puede determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al*., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de http://www.ncbi.nlmn.nih.gov o bien se obtiene del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo, por ejemplo, desenmascarado = sí, cadena = todos, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, e-valor de multipaso = 0,01, constante para multipaso = 25, caída para alineación con espacios final ("dropoff for final gapped alignment") = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62.

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

100 veces la fracción X/Y

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

El "polipéptido variante PRO842" o "secuencia de ácidos nucleicos variante de PRO842" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido PRO842 activo tal y como se define a continuación y que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido PRO842 de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido PRO842 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO842, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO842 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Habitualmente, un polinucleótido variante de PRO842 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 82% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 83% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 84% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 86% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 87% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 88% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 89% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 91% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 92% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 93% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 94% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 96% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 97% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente por lo menos aproximadamente un 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido PRO842 de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido PRO842 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido PRO842, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO842 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

Normalmente, los polinucleótidos variantes de PRO842 tienen por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

El "porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el PRO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos de PRO de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad

en la secuencia de ácidos nucleicos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 siguiente. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 siguiente se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 siguiente. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

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

100 veces la fracción W/Z

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

A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados en la presente invención se obtienen tal y como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se pueden obtener tal y como se describe a continuación mediante la utilización del programa informático WU-BLAST-2 (Altschul *et al*., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento (“overlap span”) = 1, fracción de solapamiento (“overlap fraction”) = 0,125, umbral de palabra (“word threshold”) T = 11, y matriz de puntuación (“scoring matrix”) = BLOSUM 62. Cuando se utiliza WU-BLAST-2, el valor en % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se determina dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de secuencia nativa y la molécula de ácido nucleico de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés que puede ser un polipéptido variante PRO) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la afirmación “un molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos A que tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos nucleicos de B”, la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácidos nucleicos B es la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés.

El porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos también se puede determinar utilizando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul *et al*., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de http://www.ncbi.nlmn.nih.gov o bien se obtiene del National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo, por ejemplo, desenmascarado = sí, cadena = todos, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, e-valor de multipaso = 0,01, constante para multipaso = 25, caída para alineación con espacios final “(dropoff for final gapped alignment)” = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62.

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

100 veces la fracción W/Z

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

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes PRO842 son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido PRO842 activo y que es capaz de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado astringentes, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido PRO842 de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Los polipéptidos variantes PRO842 pueden ser aquéllos codificados por un polinucleótido variante PRO842.

El término "aislado" cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos descritos en la presente invención, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido PRO842 no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico "aislado" que codifica un polipéptido PRO842 u otro ácido nucleico "aislado" que codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica que codifica el polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

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

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

El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-PRO842 individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas, y neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-PRO842 con especificidad poliepitópica, anticuerpos anti-PRO842 de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-PRO842 (ver a continuación). El término "anticuerpo monoclonal", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

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

"Condiciones astringentes" o "condiciones de astringencia elevada", tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50ºC; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42ºC; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 μg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42ºC, con lavados a 42ºC en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55ºC, seguido de un lavado de astringencia elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55ºC.

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

El término "epítopo etiquetado" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido PRO842 fusionado a un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítopo frente al que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

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

El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido PRO842 nativo descrito en la presente invención. De forma similar, el término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido PRO842 nativo descrito en la presente invención. Entre las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas se incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos PRO842 nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, pequeñas moléculas orgánicas agonistas o antagonistas, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO842 pueden comprender poner en contacto un polipéptido PRO842 con una molécula agonista o antagonista candidata y la medida de un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido PRO842.

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

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

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

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

"Portadores" tal y como se utilizan en la presente invención incluyen portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuestos a los mismos en las dosis y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa a pH tamponado. Entre los ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de peso molecular bajo (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivnilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA, alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contrapones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG); y PLURONICS™.

El término "fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; "diabodies"; anticuerpos lineales (Zapata *et al., Protein Eng*., 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno de los cuales posee un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y que incluso es capaz de entrecruzar el antígeno.

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

El fragmento Fab contiene también 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' en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio de la cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región de la bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente invención para Fab' en el cual el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')2 se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno entre dos tipos claramente diferentes, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas pueden dividirse a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.

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

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

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con las utilizaciones de diagnóstico y terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el compuesto de la presente invención se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con pla-

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

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un polipéptido particular es aquel que se une a ese polipéptido particular o epítopo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítopo de polipéptido.

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

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

Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido PRO842 o anticuerpo para el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

Una "molécula pequeña" se define en la presente invención como una molécula que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 daltons.

El término "modular" significa afectar (por ejemplo, regular por incremento, regular por disminución o en cualquier caso controlar) el nivel del mecanismo de señalización. Entre los procesos celulares bajo el control de la transducción de señal se incluyen, pero no se limitan a, transcripción de genes específicos, funciones celulares normales, tales como metabolismo, proliferación, diferenciación, adhesión, apoptosis y supervivencia, así como procesos anormales, tales como transformación, bloqueo de diferenciación y metástasis.

"Activo" o "actividad" para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de un polipéptido PRO842 que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de polipéptidos PRO842 nativos o naturales, donde actividad "biológica" se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) causada por un polipéptido PRO842 nativo o natural diferente de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que se encuentra en un polipéptido PRO842 nativo o natural y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que se encuentra en un polipéptido PRO842 nativo o natural.

Una actividad "inmunológica" se refiere sólo a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que se encuentra en un polipéptido PRO842 nativo o natural.

El término "enfermedad relacionada con el sistema inmune" significa una enfermedad en la que un componente del sistema inmune de un mamífero causa, media o, en cualquier caso, contribuye a una morbidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en las que la estimulación o intervención de la respuesta inmune tiene un efecto de mejora en la progresión de la enfermedad. Se incluyen en este término enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune, enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmune, enfermedades infecciosas, enfermedades inmunodeficientes, neoplasia, etc.

El término "enfermedad mediada por células T" significa una enfermedad en la que las células T directa o indirectamente o, en cualquier caso, contribuyen a una morbidad en el mamífero. La enfermedad mediada por células T puede estar asociada con los efectos mediados por células, efectos mediados por linfoquinas, etc., e incluso efectos asociados con células B si las células B son estimuladas, por ejemplo, por las linfoquinas secretadas por células T.

Entre los ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmune y enfermedades inflamatorias, algunas de las cuales están mediadas por el sistema inmune o células T, que se pueden tratar según la presente invención se incluyen lupus eritematosis sistémico, artritis reumatoide, artritis juvenil crónica, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiomáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trobocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica) diabetes melitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades de desmielinación de los sistemas nervioso central y periférico, tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmieli-

nizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares, tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D y E, y otros virus no hepatotróficos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune incluyendo enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas de los ovarios, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como penumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y pneumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas con el transplante incluyendo el rechazo de injertos y enfermedad de injerto contra huésped. Las enfermedades infecciosas incluyen enfermedades víricas, tales como SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B, C, d y E, herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones por protozoos e infecciones parasitarias.

El término "cantidad eficaz" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO842 y/o agonista/antagonista que permite conseguir el objetivo particular indicado. Una "cantidad eficaz" de un polipéptido PRO842 o agonista o antagonista del mismo se puede determinar empíricamente. Además, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO842 y/o agonista/antagonista que es eficaz para conseguir un efecto terapéutico indicado. Esta cantidad se puede determinar empíricamente.

El término "agente citotóxico" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo I^{131}, I^{125}, Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas activadas enzimáticamente de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen la adriamicina, la doxorubicina, la epirubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina ("Ara-C"), la ciclofosfamida, el tiotepa, el busulfano, la citoxina, los taxoídes, por ejemplo el paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton. N.J.) y el doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Roher, Antony, Francia), el toxotere, el metotrexato, el cisplatino, el melfalán, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C, la mitoxantrona, la vincristina, la vinorrelbina, el carboplatino, el tenipósido, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (ver Patente de Estados Unidos Nº 4.675.187), el melfalán, y otros gases de nitrógeno relacionados. También se incluyen en esta definición los agentes homonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como el tamoxifeno y la onapristona.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente células cancerígenas que sobreexpresan cualquiera de los genes identificados en la presente invención, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de las células que sobreexpresan dichos genes en fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los alcaloides vinca (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores topo II como por ejemplo doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como por ejemplo tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Chapter 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami *et al*., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas de polipéptidos tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteínica (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF-β; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF-α y TGF-β, factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón-α, β, y γ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF-α o TNF-β, y otros factores de polipéptidos que incluyen factor inhibidor de leucemia LIF y ligando kit (KL). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término “quimioquina” se refiere a una clase de moléculas que pertenecen a la familia de citoquinas proinflamatorias de masa molecular baja (8-11 kDa) caracterizadas por un motivo estructuralmente conservado y su capacidad para mediar la quimiotaxis de leucocitos, jugando de este modo un papel en el tráfico de leucocitos, así como jugando un papel en la regulación de leucocitos.

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, _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}
};
```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    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;
                }
```

...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
         */
```

...nw

```
                id = xx - yy + len1 - 1;
                if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                        col1[yy] = mis;
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[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 {
                        col1[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)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[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);                      }
```

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

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

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
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);
```

...getmat

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

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

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

/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
```

pr_align

```
pr_align()
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

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

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

...pr_align

```
        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()                                                    dumpblock
{
        register  i;

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

...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; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}

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

...putline

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

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
           !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[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';
}

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                                    stripname
        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));
}
```

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

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

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

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

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

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

...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_calloc(msg, nx, sz)                                                   g_calloc
        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_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

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

```
                        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;
        }                                       }
```

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                                    writejmps
        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	XXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

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

5 dividido por 15 = 33,3%

TABLA 3

PRO	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

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

5 dividido por 10 = 50%

TABLA 4

PRO-ADN	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

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

6 dividido por 14 = 42,9%

TABLA 5

PRO-ADN	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

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

II. *Composiciones y procedimientos de la invención*

A. *Polipéptidos PRO de longitud completa*

La presente invención describe secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos a las que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos PRO842. En particular, se han identificado y aislado los ADNc que codifican varios polipéptidos PRO842, tal y como se describe con mayor detalle en los posteriores ejemplos. Cabe indicar que las proteínas fabricadas en ciclos de expresión separados pueden ser números PRO diferentes determinados, pero el número UNQ es único para cualquier ADN determinado y la proteína codificada, y no cambiará. Sin embargo, por simplicidad, en el presente documento la proteína codificada por las moléculas de ácido nucleico nativo de longitud completa descritas en la presente invención, así como todos los homólogos nativos adicionales y variantes incluidas en la definición anterior de PRO, se referirán como "PRO/número", independientemente de su origen o modo de preparación.

Tal y como se describe en los Ejemplos posteriores, se han depositado varias clases de ADNc con el ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de dichos clones se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia mediante la secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos rutinarios en la técnica. La secuencia de aminoácidos prevista se puede determinar a partir de la secuencia de nucleótidos utilizando técnicas de rutina. Para los polipéptidos PRO842 y los ácidos nucleicos codificantes descritos en la presente invención, los solicitantes han identificado lo que se cree que es el mejor marco de lectura identificable con la información de la secuencia disponible en el momento.

B. *Variantes del polipéptido PRO842*

Además de los polipéptidos PRO842 de secuencia nativa de longitud completa descritos en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de PRO842. Las variantes de PRO842 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de PRO842, y/o mediante la síntesis del polipéptido PRO842 deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del PRO842, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la membrana.

Las variaciones en el PRO842 de secuencia nativa de longitud completa o en varios dominios del PRO842 descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una deleción o una inserción de uno o más codones que codifican el PRO842 que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del PRO842 en comparación con el PRO842 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del PRO842. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del PRO842 con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizadas en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o deleciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de forma sistemática y probando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

En la presente invención se proporcionan fragmentos de polipéptido PRO842. Dichos fragmentos se pueden truncar en el extremo N-terminal o C-terminal, o puede carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO842.

Los fragmentos de PRO842 se pueden preparar mediante cualquiera del grupo de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de PRO842 mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Aún otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores del extremo 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de polipéptido PRO842 comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO842 nativo descrito en la presente invención.

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

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 6

Residuo 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

Las modificaciones sustanciales en la identidad funcional o inmunológica del polipéptido PRO842 se llevan a cabo mediante la selección de las sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el conjunto de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrofóbica: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrofílica neutra: cys, ser, thr;

(3) ácida: asp, glu;

(4) básica: asn, gln, his, lys, arg;

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

(6) aromática: trp, tyr, phe.

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

Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutágenesis por PCR. Para fabricar el ADN variante de PRO842 se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter *et al*., Nucl. Acids. Res., 13: 4331 (1986); Zoller *et al*., Nucl. Acids. Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells *et al*., Gene, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells *et al*., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

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

C. *Modificaciones de PRO842*

Las modificaciones covalentes de PRO842 están incluidas en la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un polipéptido PRO842 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del PRO842. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular PRO842 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO842, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

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

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO842 incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en PRO842 de secuencia nativa (mediante el cambio del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el PRO842 de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO842 se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina al PRO842 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos de PRO842 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO842 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido PRO842 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., 259-306 (1981).

La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido PRO842 se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación químicas son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, *et. al*. Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge, *et al*. Anal. Biochem., 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura *et al*. Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de PRO842 comprende la unión del polipéptido PRO842 a uno del conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

El PRO842 de la presente invención también se puede modificar de manera que forma una molécula quimérica que comprende PRO842 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos.

En un ejemplo, dicha molécula quimérica comprende una fusión del PRO842 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítopo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítopo etiqueta se sitúa generalmente en el extremo terminal amino o carboxilo del PRO842. La presencia de dichas formas epítopo etiquetadas del PRO842 se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítopo etiqueta permite que el PRO842 se purifique fácilmente mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítopo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field *et al*., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan *et al*., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de gliproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky *et al*., Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido-Flag [Hopp *et al*., BioTechnology,6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítopo KT3 [Martin *et al*., Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítopo de α-tubulina [Skinner *et al*., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

En un ejemplo alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO842 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser a una región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido PRO842 en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de de Estados Unidos No. 5.428.130 publicada el 27 de junio de 1995.

En una realización adicional, los polipéptidos PRO842 también se pueden modificar de una manera que forman una molécula quimérica que comprende un polipéptido PRO842 fusionado a una cremallera de leucinas. En la técnica se han descrito varios polipéptidos de cremalleras de leucinas. Véase, por ejemplo, Landschultz *et al*., Science, 240: 1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe *et al*., FEES Letters, 344:1991 (1994); Maniatis *et al*., Nature, 341: 24 (1989). Se cree que la utilización de un cremallera de leucinas fusionada a un polipéptido PRO842 puede ser deseable para ayudar en la dimerización o trimerización de polipéptido PRO842 soluble en solución. Los expertos en la materia entenderán que la cremallera de leucinas se puede fusionar al extremo N- o C-terminal de la molécula PRO842.

D. *Preparación de PRO842*

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de PRO842 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de PRO842. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar PRO842. Por ejemplo, la secuencia de PRO842, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart *et al*., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se pueden realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes del PRO842 de forma separada y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir PRO842 de longitud completa.

1. *Aislamiento del ADN que codifica PRO842*

El ADN que codifica PRO842 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO842 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de PRO842 humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica PRO842 también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para PRO842 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al*., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica PRO842 es utilizar la metodología de PCR [Sambrook *et al., supra*; Dieffenbach *et al*., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca que se minimizan los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación

a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ^{32}P, biotinilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook *et al., supra*.

Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear a otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en los bancos de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otros bancos de datos de secuencias privados. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen en la presente.

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

2. *Selección y transformación de células huésped*

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente invención para la producción de PRO842 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un técnico en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al., supra*.

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

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, de levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero so se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium, Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa huésped para fermentaciones de producto de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticos. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *ton*A; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *ton*A *ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *ton*A *ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan*^{r}; la cepa de *E. coli* W3110 37D6 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *ton*A *ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de deleción *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican PRO842. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach

and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer *et al*., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt *et al*. J. Bacterial., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906; Van den Berg *et al*., Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans y K. marxianus; yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna *et al., J. Basic. Microbiol*. 28:265-278 [1988]); *Candida; Trichoderma recia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al*., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al*., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Nelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metiltrópicas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionado del género que consiste en *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Sacckaromyces, Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO842 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como células de *Droshophila* S2 y *Spodoptera* Sf9 o *Spodoptera* High 5, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham *et al*., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO. Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCl51). La selección de la célula huésped apropiada se estima que está dentro de la técnica.

3. *Selección y utilización de un vector replicable*

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica PRO842 se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un técnico en la materia.

El PRO842 se puede producir recombinantemente, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el PRO842 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líderes de fosfatasa alcalina, penicilinasa, Ipp o enterotoxinaII estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la invertasa de levadura líder, el factor alfa líder (incluyendo factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* líderes, el último descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o fosfatasa ácida líder, la *C. Albicans* glucoamilasa líder (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de *mamíferos* se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como secuencias líderes virales secretoras.

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

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

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica PRO842, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo natural es la línea de células CHO deficiente

en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb *et al*., Nature, 282:39 (1979); Kingsman *et al*., Gene, 7:141 (1979); Tschemper *et al*., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica PRO842 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales son conocidos. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β-lactamasa y lactosa [Chang *et al., Nature*, 275:615 (1978); Goeddel *et al*., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor tac [deBoer *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el PRO842.

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

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tiene la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657.

La transcripción de PRO842 desde vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de célula huésped.

Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el PRO842 por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias de potenciador se conocen actualmente de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de PRO842, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en células huésped eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica PRO842.

En Gething *et al*., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei *et al*., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de PRO842 en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

4. *Detección de la amplificación/expresión de genes*

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

Alternativamente, la expresión génica se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de ejemplo pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido PRO842 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de PRO842 y que codifica un epítopo de anticuerpo específico.

5. *Purificación de polipéptido*

Las formas de PRO842 se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisatos de células huésped. Si están unidas a membrana, se pueden liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión de PRO842 se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclo congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica, o agentes para lisar células.

Se puede desear purificar PRO842 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefarosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítopo del PRO842. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteína y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles ad Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el PRO842 concreto producido.

E. *Usos para PRO842*

Las secuencias de nucleótidos (o sus complementarias) que codifican PRO842 tienen varias aplicaciones en la disciplina de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en el mapeo de cromosomas y genes y en la generación de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico de PRO842 también será útil para la preparación de polipéptidos PRO842 mediante las técnicas recombinantes descritas en la presente invención.

El gen de PRO842 de secuencia nativa de longitud completa, o partes del mismo, se pueden utilizar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de PRO842 de longitud completa o para aislar incluso otros ADNcs (por ejemplo, aquéllos que codifican variantes naturales de PRO842 o PRO842 de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada a la secuencia de PRO842 nativa descrita en la presente. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación se pueden derivar de por lo menos regiones parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa en la que dichas regiones se pueden determinar sin una experimentación excesiva o de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de PRO842 de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen de PRO842 utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación se pueden marcar con una serie de marcadores, incluyendo radionucleótidos, tales como ^{32}P o ^{35}S, marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda a través de los sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen de PRO842 de la presente invención se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN o ARNm genómico para determinar a qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen con mayor detalle en los siguientes Ejemplos.

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

Entre otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de PRO842 se incluyen oligonucleótidos antisentido y sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico de cadena única (ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm de PRO842 diana (sentido) o ADN de PRO842 (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido, según la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante de ADN de PRO842. Dicho fragmento comprende generalmente por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basado en una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res., 48:2659, 1988) y van der Krol *et al*. (BioTechniques 6:958, 1988).

La unión de oligonucleótidos sentido y antisentido a secuencias de ácidos nucleico diana da lugar a la formación de dobles cadenas que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno de los diferentes medios, que incluyen la degradación aumentada de las dobles cadenas, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o mediante cualquier otro medio. De este modo, los oligonucleótidos antisentido se puede utilizar para bloquear la expresión de proteínas PRO842. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones a azúcares, tales como las

descritas en WO 91/06629) y en los que dichas uniones a azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones a azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero mantienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

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

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

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

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

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

Las sondas también se pueden utilizar en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para la identificación de secuencias de codificación de PRO842 estrechamente relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un PRO842 también se puede utilizar para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica el PRO842 y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden mapear a un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de unión contra marcadores cromosómicos conocidos, y el cribado de hibridación con bibliotecas.

Cuando las secuencias codificantes para PRO842 codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el PRO842 es un receptor), el PRO842 se puede utilizar en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos procedimientos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión también se pueden utilizar para cribar inhibidores o agonistas de péptidos o moléculas pequeñas de la interacción de unión. Además, el receptor de PRO842 se puede utilizar para aislar el ligando o ligando correlativos. Los ensayos de cribado se pueden diseñar para encontrar compuestos candidatos que imitan la actividad biológica de un PRO842 nativo o un receptor para PRO842. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribar con un alto rendimiento bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar pequeñas moléculas como fármacos candidatos. Entre las pequeñas moléculas contempladas se incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican PRO842 o sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que

contienen un transgén, el cual se introdujo en el animal o en un antecesor del animal en estado prenatal, por ejemplo, una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica PRO842 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica PRO842 según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica PRO842. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, se marcarían células concretas para la incorporación del transgén de PRO842 con potenciadores específicos de tejido. Se pueden utilizar animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica PRO842 introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria, para examinar el efecto de la expresión aumentada de ADN que codifica PRO842. Dichos animales se pueden utilizar como animales de prueba para reactivos pensados para conferir protección de, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. Según este aspecto de la invención, el tratamiento de un animal con el reactivo y la reducción de la incidencia de la condición patológica, en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial en la condición patológica.

Alternativamente, se pueden utilizar homólogos no humanos de PRO842 para construir un animal "knock out" con PRO842 que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica PRO842 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica PRO842 y el ADN genómico alterado que codifica PRO842 introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica PRO842 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica PRO842 según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica PRO842 se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madres embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li *et al*., Cell, 69: 915 (1992)]. A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en Teralocarcinomas y Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152]. A continuación, un embrión quimérico se puede implantar en un animal criado hembra pseudoembarazada adecuado y el embrión producido para crear un animal "knock out". La progenie que porta el ADN recombinado homólogamente en las células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y utilizada para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knock out se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido PRO842.

El ácido nucleico que codifica los polipéptidos PRO842 también se pueden utilizar en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células para conseguir una síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. La "terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencional en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una vez o repetitiva de un ADN o ARN terapéuticamente eficaz. Se pueden utilizar los ADNs y ARNs antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. También se ha observado que los oligonucleótidos antisentido cortos se pueden importar en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su captación limitada por la membrana celular. (Zamecnik *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos diéster cargados negativamente por grupos no cargados.

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

Los polipéptidos PRO842 descritos en la presente invención también se pueden utilizar como marcadores del peso molecular para una electroforesis de proteínas y las secuencias de ácido nucleico aisladas se pueden utilizar para expresar recombinantemente dichos marcadores.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos PRO842 o fragmentos de los mismas descritas en las presente invención son útiles para la identificación de cromosomas. En este aspecto, existe una necesidad actual para identificar nuevos marcadores de cromosomas, ya que actualmente hay disponibles relativamente pocos reactivos marcadores de cromosomas, en base a los datos de secuencias disponibles. Cada molécula de ácido nucleico de PRO842 de la presente invención se puede utilizar como marcador de cromosomas.

Los polipéptidos PRO842 y las moléculas de ácido nucleico también se pueden utilizar de forma diagnóstica para la caracterización de tejidos, donde los polipéptidos PRO842 se pueden expresar diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferiblemente en un tejido enfermo en comparación con un tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácido nucleico de PRO842 se utilizarán para generar sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

Los polipéptidos PRO842 descritos en la presente invención también se pueden utilizar como agentes terapéuticos. Los polipéptidos PRO842 se pueden formular según los procedimientos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, a través de los cuales el producto PRO842 de los mismos se combina en una mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones terapéuticas se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla del principio activo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980)) en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los destinatarios de las dosis y las concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

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

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

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

Las dosis y concentraciones del fármaco deseadas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo de la utilización particular prevista. La determinación de la dosis o la ruta de administración apropiadas están dentro del conocimiento de un médico habitual. Los experimentos con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de dosis eficaces para la terapia humana. El escalado entre especies de dosis eficaces se puede llevar a cabo siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" en Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi *et al*., Eds., Pergamon Press, Nueva York, 1989, páginas 42-96.

Cuando se utiliza la administración *in vivo* de un polipéptido PRO842 o agonista o antagonista del mismo, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta 100 mg/kg de masa corporal de mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente 1 μg/kg/día hasta 10 mg/kg/día, dependiendo de la ruta de administración. Las guías de las dosis concretas y los procedimientos de liberación se proporcionan en la literatura; véase, por ejemplo, Patentes U.S. Nos. 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración que se dirige a un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar la liberación de una manera diferente a la de otro órgano o tejido.

Cuando se desea la administración por liberación controlada de un polipéptido PRO842 en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiere la administración del polipéptido PRO842, se contempla la microencapsulación del polipéptido PRO842. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación controlada se ha realizado satisfactoriamente con la hormona del crecimiento humano (rhGH), interferón- (rhIFN-), interleuquina-2, y MN rgp 120. Johnson *et al*., Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27:1221-1223 (1993); Hora *et al*., Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyactide Polyglycolide Microsphere Systems", en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell y Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), páginas 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; y Patente U.S. No. 5.654.010.

Las formulaciones de liberación controlada de estas proteínas se desarrollaron utilizando polímero de ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y amplio rango de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, se puede aclarar rápidamente en el interior del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar de meses a años dependiendo de su peso mole-

cular y la composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en: M. Chasin y R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990), páginas 1-41.

La presente invención comprende procedimientos de cribado de compuestos para identificar aquéllos que imitan el polipéptido PRO842 (agonistas) o prevenir el efecto del polipéptido PRO842 (antagonistas). Los ensayos de cribado para candidatos de fármacos antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o complejan con los polipéptidos PRO842 codificados por los genes identificados en la presente invención, o bien interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribar con un alto rendimiento bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar pequeñas moléculas como fármacos candidatos.

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

Todos los ensayos para antagonistas son comunes en que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido PRO842 codificado por un ácido nucleico identificado en la presente invención bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido PRO842 codificado por el gen identificado en la presente invención o el fármaco candidato se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo, una placa de microtítulos, mediante enlaces covalentes o no covalentes. La unión no covalente se realiza generalmente mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido PRO842 y el secado. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido PRO842 a inmovilizar, para anclarlo a la superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, que se puede detectar mediante una marca detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se extraen los componentes no reaccionados, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados a la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta una marca detectable, la detección de la marca inmovilizada en la superficie indica que tuvo lugar la complejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta una marca, se puede detectar la complejación, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interacciona con, pero no se une a un polipéptido PRO842 particular codificado por un gen identificado en la presente invención, su interacción con ese polipéptido se pueden ensayar mediante procedimiento conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, coinmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorizar mediante la utilización de sistemas genéticos basados en levaduras descritos por Fields y colaboradores (Fields y Song, Nature (London), 340:245-246 (1989); Chien *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9582 (1991)) tal y como se describe por Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno actuando como el dominio de unión a ADN, el otro actuando como el dominio de transcripción-activación. El sistema de expresión en las levaduras descrito en las publicaciones anteriores (referidas generalmente como "el sistema de dos híbridos") saca ventaja de esta propiedad e utiliza dos proteínas híbridas, una en la que se fusiona la proteína diana al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de la interacción de proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromatogénico para β-galactosidasa. En Clontech se encuentra disponible comercialmente un equipo completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Este sistema también se puede extender para mapear dominios de proteínas implicados en las interacciones de proteínas específicas, así como para precisar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido PRO842 identificado en la presente invención y otros componentes intra- o extracelulares se puede ensayar tal y como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular bajo condiciones y durante un tiempo que permite la interacción e unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se desarrolla en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para usar como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal y como se describe anteriormente en la presente invención. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

Para ensayar antagonistas, el polipéptido PRO842 se puede añadir a una célula junto con el compuesto a cribar para una actividad concreta y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido PRO842 indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO842. Alternativamente, los antagonistas se pueden detectar mediante la combinación del polipéptido PRO842 y un antagonista potencial con los receptores de polipéptido PRO842 unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido PRO842 se puede marcar, tal como mediante radiactividad, de manera que el número de moléculas de polipéptidos PRO842 unidas al receptor se puede utilizar para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor se puede identificar mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, "panning" de ligando y clasificación de FACS. Coligan *et al.* *Current Protocols in Immun*., 1(2): Capítulo 5 (1991). Preferiblemente, la clonación de la expresión se utiliza cuando el ARN poliadenilado se prepara a partir de una célula sensible al polipéptido PRO842 y se divide en grupos una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO842. Las células transfectadas que se desarrollan sobre portamuestras de vidrio se exponen a polipéptido PRO842 marcado. El polipéptido PRO842 se puede marcar mediante una variedad de medios que incluyen la yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Tras la fijación e incubación, los portamuestras se someten a análisis autoradiográfico. Los grupos positivos se identifican y los sub-grupos se preparan y se retransfectan utilizando un proceso de subagrupación y recribado interactivos, obteniendo finalmente un único clon que codifica el receptor putativo.

Como enfoque alternativo para la identificación del receptor, el polipéptido PRO842 marcado se puede unir por fotoafinidad con la membrana celular o preparaciones de extracto que expresan la molécula receptora. El material reticulado se resuelve mediante PAGE y se expone a la película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor se puede escindir, resolver en fragmentos de péptidos, y someter a la microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamíferos o una preparación de membrana que expresan el receptor se incubarían con polipéptido PRO842 marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto para aumentar o bloquear esta interacción.

Más ejemplos específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con polipéptido PRO842, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos y las versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido PRO842 que reconoce el receptor pero no transmite el efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido PRO842.

Otro antagonista de polipéptido PRO842 potencial es una construcción de ADN o ARN antisentido preparada utilizando tecnología antisentido, cuando, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN antisentido actúa para bloquear directamente la traducción del ARNm mediante la hibridación a ARNm marcado y evitando la traducción de la proteína. La tecnología antisentido se puede utilizar para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o ADN o ARN antisentido, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia del polinucleótido, que codifica los polipéptidos PRO842 maduros de la presente invención, se utiliza para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice - véase Lee *et al*., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney *et al*., Science, 241: 456 (1988); Dervan *et al*., Science, 251: 1360 (1991)), evitando así la transcripción y la producción del polipéptido PRO842. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida al ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido PRO842 (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también se pueden liberar a las células, de manera que el ARN o ADN antisentido se pueden expresar *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido PRO842. Cuando se utiliza ADN antisentido, se prefieren oligodesoxinucleótidos derivados del sitio de iniciación de traducción, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Entre los antagonistas potenciales se incluyen pequeñas moléculas que se unen al sitio activo, el sitio de unión al receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de unión pertinente del polipéptido PRO842, bloqueando de esta manera la actividad biológica normal del polipéptido PRO842. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, preferiblemente péptidos solubles y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

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

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

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

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

F. *Distribución de tejidos*

La localización de tejidos que expresan el PRO842 se puede identificar mediante la determinación de la expresión del ARNm en varios tejidos humanos. La localización de dichos genes proporciona información sobre qué tejidos están más probablemente afectados por las actividades estimuladoras e inhibidoras de los polipéptidos PRO842. La localización de un gen en un tejido específico también proporciona un tejido de muestra para los ensayos de bloqueo de actividad descritos a continuación.

Tal y como se ha indicado anteriormente, la expresión génica en varios tejidos se puede medir mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 77:5201-5205 [1980]), transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN y cadenas dobles de híbridos de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína.

Alternativamente, la expresión génica en varios tejidos se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o bien policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra una secuencia nativa de un polipéptido PRO842 o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN que codifican el polipéptido PRO842 o contra una secuencia exógena fusionada a un ADN que codifica un polipéptido PRO842 y que codifica un epítopo de anticuerpo específico. A continuación, se proporcionan técnicas generales para generar anticuerpos y protocolos especiales para la transferencia Northern e hibridación *in situ*.

G. *Estudios de unión a anticuerpo*

La actividad de los polipéptidos PRO842 se puede verificar adicionalmente mediante estudios de unión a anticuerpo, en los que se prueba la capacidad de los anticuerpos anti-PRO842 para inhibir el efecto de los polipéptidos PRO842, respectivamente, en las células de los tejidos. Entre los ejemplos de anticuerpos se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describirá posteriormente en la presente invención.

Los estudios de unión a anticuerpo se pueden llevar a cabo en cualquiera de los procedimientos de ensayo conocidos, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* páginas 147-158 (CRC Press Inc. 1987).

Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito muestra de prueba por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos se insolubilizan preferiblemente antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar convenientemente del patrón y el analito que permanece sin unir.

Los ensayos sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítopo, de la proteína a detectar. En un ensayo sándwich, el analito muestra de prueba se une mediante un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido y, a continuación, un segundo anticuerpo se une al analito, formando de esta manera un complejo de tres partes insoluble. Ver, por ejemplo, la Patente USA No. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede marcarse a sí mismo con un grupo detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es una enzima.

Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser nueva o congelada o puede estar incrustada en parafina y fijada con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

H. *Ensayos basados en células*

Los ensayos basados en células y modelos animales para enfermedades relacionadas con el sistema inmune se pueden utilizar para entender con mayor detalle la relación entre los genes y los polipéptidos identificados en la presente invención y el desarrollo y patogénesis de la enfermedad relacionada con el sistema inmune.

En un enfoque diferente, las células de un tipo conocido de células que estarán implicadas en una enfermedad concreta relacionada con el sistema inmune se transfectan con los ADNcs descritos en la presente invención, y se analiza la capacidad de estos ADNcs para estimular o inhibir la función inmune. Las células adecuadas se pueden transfectar con el gen deseado y se monitoriza la actividad de la función inmune. Dichas líneas celulares transfectadas se pueden utilizar entonces para probar la capacidad de los anticuerpos poli- o monoclonales o composiciones de anticuerpos para inhibir o estimular la función inmune, por ejemplo, para modular la proliferación de células T o la infiltración de células inflamatorias. Las células transfectadas con las secuencias codificantes de los genes identificados en la presente invención se pueden utilizar adicionalmente para identificar candidatos de fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

Además, se pueden utilizar cultivos primarios derivados de animales transgénicos (tal y como se ha descrito a continuación) en los ensayos basados en células de la presente invención, aunque se prefieren líneas celulares estables. Las técnicas para derivar las líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos son conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Small *et al., Mol. Cell. Biol*. 5, 642-648 [1985]).

Un ensayo basado en células adecuado es la reacción de linfocitos mezclados (MLR). *Current Protocols in Immunology*, unidad 3.12; editada por J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober. National Institutes of Health, publicada por John Wiley and Sons, Inc. En este ensayo, se ensaya la capacidad de un compuesto de prueba para estimular o inhibir la proliferación de células T activadas. Se cultiva una suspensión de células T de respuesta con células estimuladoras alogénicas y se mide la proliferación de células T mediante la captación de timidina tritiada. Este ensayo es una medida general de la reactividad de células T. Dado que la mayoría de células responden a y producen IL-2 después de la activación, las diferencias de respuesta en este ensayo reflejan en parte las diferencias en la producción de IL-2 por las células de respuesta. Los resultados de MLR pueden verificarse mediante un ensayo de detección de linfoquinas (IL-2) estándar. *Current Protocols in Immunology, supra* 3.15, 6.3.

Una respuesta proliferativa de células T en un ensayo MLR puede ser debida a propiedades mitogénicas directas de una molécula ensayada o a la activación inducida por antígenos externos. La verificación adicional de la actividad estimuladora de células T de los polipéptidos PRO842 se puede obtener mediante un ensayo de coestimulación. La activación de células T requiere una señal específica de antígeno mediada a través del receptor de células T (TCR) y una señal coestimuladora mediada a través de una segunda interacción de unión a ligando, por ejemplo, la interacción de unión a B7(CDBO, CD86)/CD28. El entrecruzamiento con CD28 aumenta la secreción de linfoquinas por células T activadas. La activación de células T tiene controles tanto negativos como positivos a través de la unión de ligandos que tienen un efecto negativo o positivo. CD28 y CTLA-4 son glicoproteínas relacionadas en la superfamilia de Ig que se unen a B7. La unión de CD28 a B7 tiene un efecto de coestimulación positiva de la activación de células T; en cambio, la unión de CTLA-4 a B7 tiene un efecto negativo de desactivación de células T. Chambers, C. A. y Allison, J. P., *Curr. Opin. Immunol*. (1997) 9:396. Schwartz, R. H., *Cell* (1992) 71:1065; Linsey, P.S. y Ledbetter, J.A., *Annu. Rev. Immunol*., (1993) 11:191; June, C.H. *et al., Immunol. Today* (1994) 15:321; Jenkins, M.K., *Immunity* (1994) 1:405. En un ensayo de coestimulación, se ensayan los polipéptidos PRO842 por la actividad coestimuladora o inhibidora de las células T.

Los polipéptidos PRO842, así como otros compuestos que son estimuladores (coestimuladores) de la proliferación de células T y agonistas, por ejemplo anticuerpos agonistas, para los mismos, tal y como se han determinado mediante MLR y ensayos de coestimulación, por ejemplo, son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune caracterizadas por una función inmune escasa, subóptima o inadecuada. Estas enfermedades se tratan mediante la estimulación de la proliferación y activación de células T (e inmunidad mediada por células T) y el aumento de la respuesta inmune en un mamífero a través de la administración de un compuesto estimulador, tal como los polipéptidos PRO842 estimulantes. El polipéptido estimulante puede ser, por ejemplo, un polipéptido PRO842 o un anticuerpo agonista del mismo.

La utilización directa de un compuesto estimulador como el de la invención se ha confirmado en experimentos con glicoproteína 4-1BB, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, que se une a un ligando (4-1BBL) expresado en células T cebadas y señala la activación y crecimiento de células T. Alderson, M. E. *et al*., J. Immunol., 24:2219 (1994).

La utilización de un compuesto estimulador agonista también se ha confirmado experimentalmente. La activación de 4-1BB mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-4-1BB agonista aumenta la erradicación de tumores. Hellstrom, I. y Hellstrom, K. B. Crit. Rev. Immunol., 18:1 (1998). La terapia con inmunoadyuvantes para el tratamiento de tumores, descrito con más detalle a continuación, es otro ejemplo de la utilización de los compuestos estimuladores de la presente invencion.

Un efecto estimulador o potenciador inmune también se puede conseguir mediante la antagonización o el bloqueo de la actividad de un PRO842 que se ha observado que es inhibidor en el ensayo MLR. La anulación de la actividad

inhibidora del compuesto produce un efecto estimulador neto. Los compuestos antagonistas/bloqueadores adecuados son anticuerpos o fragmentos de los mismos que reconocen y se unen a la proteína inhibidora, bloqueando de este modo la interacción eficaz de la proteína con su receptor e inhibiendo la señalización a través del receptor. Este efecto se ha confirmado en experimentos que utilizan anticuerpos anti-CTLA-4 que aumentan la proliferación de células T, supuestamente mediante la eliminación de la señal inhibidora provocada por la unión a CTLA-4. Walunas, T.L. *et al*., Immunity 1:405 (1994).

Alternativamente, también se puede conseguir un efecto estimulador o potenciador inmune mediante la administración de un polipéptido PRO842 que tiene propiedades de aumento de la permeabilidad vascular. Una mayor permeabilidad vascular sería beneficiosa para trastornos que se pueden atenuar mediante la infiltración local de células inmunes (por ejemplo, monocitos, eosinófilos, PMNs) y la inflamación.

Por otro lado, los polipéptidos PRO842, así como otros compuestos que son inhibidores directos de la proliferación/activación de células T, secreción de linfoquinas y/o la permeabilidad vascular, se pueden utilizar directamente para suprimir la respuesta inmune. Estos compuestos son útiles para reducir el grado de la respuesta inmune y para tratar las enfermedades relacionadas con el sistema inmune caracterizadas por una respuesta hiperactiva, superóptima o autoinmune. Esta utilización de los compuestos de la presente invención se ha confirmado mediante los experimentos descritos anteriormente en los que la unión de CTLA-4 al receptor B7 desactiva las células T. Los compuestos inhibidores directos de la presente invención actúan de manera análoga. Se esperaría que la utilización del compuesto que suprime la permeabilidad vascular redujera la inflamación. Dichos usos serían beneficiosos en el tratamiento de condiciones asociadas con una inflamación excesiva.

Alternativamente, los compuestos, por ejemplo, anticuerpos, que se unen a los polipéptidos PRO842 estimulantes de la presente invención y bloquean el efecto estimulante de estas moléculas producen un efecto inhibidor neto y se pueden utilizar para suprimir la respuesta inmune mediada por células T mediante la inhibición de la proliferación/activación de células T y/o la secreción de linfoquinas. El bloqueo del efecto estimulante de los polipéptidos suprime la respuesta inmune del mamífero. Esta utilización se ha confirmado en experimentos que utilizan un anticuerpo anti-IL2. En estos experimentos, el anticuerpo se une a IL-2 y bloquea la unión de IL-2 a su receptor, consiguiendo de este modo un efecto inhibidor de células T.

I. *Modelos de animales*

Los resultados de los ensayos *in vitro* basados en células se pueden verificar adicionalmente utilizando modelos de animales *in vivo* y ensayos de la función de las células T. Se puede utilizar una serie de modelos de animales bien conocidos para entender adicionalmente el papel de los genes identificados en la presente invención en el desarrollo y la patogénesis de enfermedades relacionadas con el sistema inmune, y para ensayar la eficacia de agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos, y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo antagonistas de moléculas pequeñas. La naturaleza *in vivo* de dichos modelos los hace predictivos de las respuestas en pacientes humanos. Entre los modelos de animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmune se incluyen animales no recombinantes y recombinantes (transgénicos). Entre los modelos de animales no recombinantes se incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos de murinos. Dichos modelos se pueden generar mediante la introducción de células en ratones singeneicos utilizando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en vena de cola, implante de bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la cápsula renal, etc.

La enfermedad injerto contra huésped aparece cuando células inmunocompetentes se trasplantan en pacientes inmunosupresores o tolerantes. Las células donantes reconocen y responden a antígenos huésped. La respuesta puede variar desde inflamación aguda grave hasta casos suaves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos de enfermedad injerto contra huésped proporcionan un medio de valoración de la reactividad de células T contra antígenos de MHC y antígenos de transplantes menores. En *Current Protocols in Immunology, supra*, unidad 4.3 se describe con detalle un procedimiento adecuado.

Un modelo de animal para rechazo de aloinjerto de piel es un medio de valorar la capacidad de las células T para mediar en la destrucción de tejido *in vivo* y una medida de su papel en el rechazo de trasplantes. Los modelos más comunes y aceptados utilizan injertos de cola-piel murinos. Los experimentos repetidos han demostrado que el rechazo de aloinjerto de piel está mediado por células T, células T ayudantes y células T efectoras agresoras, y no anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. Y Sachs, D. H., *Fundamental Immunology*, 2ª Edición, W. E. Paul, ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. En *Current Protocols in Immunology, supra*, unidad 4.4 se describe con detalle un procedimiento adecuado. Otros modelos de rechazo del transplante que se pueden utilizar para ensayar los compuestos de la presente invención son los modelos de transplante alogeneico de corazón descritos por Tanabe, M *et al*. Transplantation (1994) 58:23 y Tinubu, S.A. *et al*. J. Immunol. 4330-4338 (1994).

Los modelos de animales para la hipersensibilidad de tipo retrasado también proporciona un ensayo de función inmune mediada por células. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasado son una respuesta inmune *in vivo* mediada por células T caracterizada por la inflamación que no alcanza un máximo hasta después de que haya pasado un periodo de tiempo después de la estimulación con un antígeno. Estas reacciones también aparecen en enfermedades autoinmunes específicas de tejido, tales como esclerosis múltiple (MS) y encefalomielitis autoinmune experimental (EAE, un modelo para MS). En *Current Protocols in Immunology, supra*, unidad 4.5 se describe con detalle un procedimiento adecuado.

EAE es una enfermedad autoinmune mediada por células T caracterizada por la inflamación de células T y células mononucleares y la posterior desmielinación de axones en el sistema nervioso central. EAE se considera generalmente un modelo animal relevante para MS en humanos. Bolton, C., Multiple Sclerosis (1995) 1:143. Se han desarrollado modelos agudos y de recaída-remisión. Se puede ensayar la actividad estimuladora o inhibidora de las de células T contra la enfermedad desmielinizante mediante por el sistema inmune para los compuestos de la presente invención utilizando el protocolo descrito en *Current Protocols in Immunology, supra*, unidades 15.1 y 15.2. Véase también los modelos para la enfermedad de mielina en la que oligodendrocitos o células de Schwann se injertan en el sistema nervioso central tal y como se ha descrito en Duncan I. D. *et al*., Molec. Med Today 554-561 (1997).

La hipersensibilidad por contacto es un ensayo *in vivo* de la función inmune mediada por células en la hipersensibilidad de tipo retrasado simple. En este procedimiento, la exposición cutánea a haptenos exógenos ocasiona una reacción de hipersensibilidad de tipo retrasado que se mide y cuantifica. La sensibilidad por contacto implica una fase de sensibilización inicial seguida de una fase de provocación. La fase de provocación aparece cuando los linfocitos T encuentran un antígeno con el que han tenido previamente contacto. Aparece el hinchamiento y la inflamación, haciendo de éste un modelo excelente de dermatitis por contacto alérgica humana. En Current Protocols in Immunology, Eds. J. E. cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc. unidad 4.2 (1994) se describe en detalle un procedimiento adecuado. También en Grabbe, S. y Schwarz, T.,Immun. Today, 19 (1): 37-44 (1998).

Un modelo animal para artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte características clínicas, histológicas e inmunológicas de la artritis reumatoide autoinmune humana y es un modelo aceptable para la artritis autoinmune humana. Los modelos de ratón y rata se caracterizan por sinovitis, erosión del cartílago y hueso subcondrial. Se puede ensayar la actividad contra la artritis autoinmune para los compuestos de la presente invención utilizando los protocolos descritos en *Current Protocols in Immunology, supra*, unidades 15.5. Véase también el modelo que utiliza un anticuerpo monoclonal para las integrinas CD18 y VLA-4 descritas en Issekutz, A. C. *et al*., Immunology 88:569 (1996).

Se ha descrito un modelo de asma en el que se inducen una hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por antígeno, eosinofilia e inflamación pulmonar mediante la sensibilización de un animal con ovoalbúmina y, a continuación, la estimulación del animal con la misma proteína suministrada mediante un aerosol. Varios modelos de animales (cobaya, rata, primate no humano) muestran síntomas similares al asma atópica en humanos tras el estímulo con antígenos del aerosol. Los modelos murinos tienen muchas de las características del asma humana. En Wolyniec, W. W. *et al*., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 18: 777 (1998) y las referencias citadas en la misma se describen procedimientos adecuados para ensayar la actividad y la efectividad en el tratamiento del asma para los compuestos de la presente invención.

Adicionalmente, se puede ensayar en modelos de animales la psoriasis como enfermedad para los compuestos de la presente invención. La evidencia sugiere una patogénesis de las células T para la psoriasis. Los compuestos de la presente invención se pueden ensayar en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. *et al*., Nat. Med. 3:183 (1997), en el que los ratones demuestran lesiones histopatológicas en la piel que se parecen a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera de piel humana/ratón scid preparada tal como se ha descrito por Nickoloff, B. J. *et al*., Am. J. Path. 146:580 (1995).

Los modelos de animales recombinantes (transgénicos) se pueden diseñar mediante la introducción de la parte codificante de los genes identificados en la presente invención en el genoma de los *animales* de interés, utilizando técnicas estándar para la producción de animales transgénicos. Entre los animales que pueden servir como diana para la manipulación transgénica se incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos, y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpanzés y monos. Entre las técnicas conocidas en el sector para introducir un transgén en dichos animales se incluyen la microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, Patente USA No. 4.873.191); transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-615 [1985]); marcaje de genes en células madre embrionarias (Thompson *et al*. Cell 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo. Mol. Cel., Biol. 3, 1803-1814 [1983]); transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano *et al*. Cell. 57, 717-73 [1989]). Para una revisión, véase, por ejemplo, la Patente USA No. 4.736.866.

Para el objetivo de la presente invención, entre los animales transgénicos se incluyen aquellos que portan el transgén sólo en parte de sus células ("animales mosaicos"). El transgén se puede integrar como un transgén individual o en concatámeros, por ejemplo, los tándems cabeza con cabeza o cabeza con cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula concreta también es posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 623-636 (1992).

La expresión del transgén en animales trasngénicos se puede monitorizar mediante técnicas estándar. Por ejemplo, el análisis con transferencia Southern o la amplificación por PCR se pueden utilizar para verificar la integración del transgén. A continuación, se puede analizar el nivel de expresión de ARNm utilizando técnicas, tales como la hibridación *in situ*, análisis con transferencia Northern, PCR o inmunocitoquímica.

En los animales se pueden examinar además los signos de patología de enfermedad inmune, por ejemplo, mediante un examen histológico para determinar la infiltración de células inmunes en tejidos específicos. También se pueden

llevar a cabo experimentos de bloqueo en los que los animales transgénicos son tratados con los compuestos de la presente invención para determinar la extensión de la estimulación o inhibición de la proliferación de las células T por parte de los compuestos de la presente invención. En estos experimentos, se administran al animal los anticuerpos de bloqueo que se unen al polipéptido PRO842, preparado tal y como se ha descrito anteriormente, y se determina el efecto en la función inmune.

Alternativamente, se pueden construir animales "knock out" que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en la presente invención, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y el ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica un polipéptido concreto se puede utilizar para clonar el ADN genómico que codifica ese polipéptido según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica un polipéptido concreto se puede eliminar o reemplazar por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, en el vector están incluidos varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3') [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*. 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li *et al*., Cell, 69: 915 (1992)]. A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimera de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson ed. (IRL. Oxford, 1987), páginas 113-152]. A continuación, los embriones quiméricos se pueden implantar en un animal criado hembra pseudoembarazada y el embrión se hace nacer para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y se utiliza para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knockout se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de las condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

J. *Terapia con inmunoadyuvantes*

En un ejemplo, los compuestos inmunoestimulantes se pueden utilizar en terapia con inmunoadyuvantes para el tratamiento de tumores (cáncer). Actualmente se sabe bien que las células T reconocen antígenos específicos de tumores humanos. Un grupo de antígenos de tumores, codificados por las familias de genes MAGE, BAGE y GAGE son silenciosos en todos los tejidos normales adultos, pero se expresan en cantidades significativas en tumores, tales como melanomas, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, y carcinomas de la vejiga. DeSmet C. *et al*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7149 (1996). Se ha observado que la coestimulación de células T induce la regresión tumoral y una respuesta antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo*. Melero, I. *et al*. Nature Medicine (1997) 3: 682; Kwon E. D. *et al*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1997) 94: 8099; Lynch D. H. *et al*. Nature Medicine 3:625 (1997); Finn. O. J. y Lotze M. T. J. Immnunol. 21:114 (1998). Los compuestos estimuladores se pueden administrar como adyuvantes, solos o junto con un agente regulador del crecimiento, un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico, para estimular la proliferación/activación de células T y una respuesta antitumoral a antígenos de tumores. El agente regulador del crecimiento, citotóxico o quimioterapéutico se puede administrar en cantidades convencionales utilizando pautas de administración conocidos. La activación inmunoestimuladora por los compuestos de la presente invención permite cantidades reducidas del agente regulador del crecimiento, citotóxico o quimioterapéutico, disminuyendo potencialmente de este modo la toxicidad al paciente.

K. *Ensayos de cribado para fármacos candidatos*

Los ensayos de cribado para fármacos candidatos se diseñan para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos codificados por los genes identificados en la presente invención, o un fragmento biológicamente activo de los mismos, o en cualquier caso interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de quimiotecas, siendo particularmente adecuados para identificar fármacos candidatos de moléculas pequeñas. Entre las moléculas pequeñas contempladas se incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos, incluyendo péptidos, preferiblemente péptidos solubles, fusiones (poli)péptido-inmunoglobulina y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Los ensayos se pueden realizar en una serie de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica. Todos los ensayos tienen en común que exigen el contacto del fármaco candidato con un polipéptido codificado por un ácido nucleico identificado en la presente invención en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos compuestos interaccionen.

En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado se puede aislar o detectar en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido codificado por el gen identificado en la presente invención o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, una placa de microtítulos, mediante enlaces covalentes o no covalentes. La unión no covalente se realiza generalmente mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido y el secado. Alternativamente, se puede utilizar un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido a inmovilizar, para anclarlo a una superficie

sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, que se puede marcar mediante un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando se completa la reacción, se extraen los componentes no reaccionados, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados a la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que tuvo lugar la formación del complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la formación de complejo, por ejemplo, utilizando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interacciona con, pero no se une a una proteína concreta codificada por un gen identificado en la presente invención, su interacción con esa proteína se puede ensayar mediante procedimientos conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, coinmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína se pueden monitorizar mediante la utilización de sistemas genéticos basados en levaduras descritos por [Fields y colaboradores (Fields y Song, Nature (London), 340:245-246 (1989); Chien *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 9578-9582 (1991)] tal como se describe por Chevray y Nathans [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991)]. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno actuando como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro actúa como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en las levaduras descrito en las publicaciones anteriores (referido generalmente como "el sistema de dos híbridos") saca ventaja de esta propiedad y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 a través de la interacción de proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromatogénico para β-galactosidasa. En Clontech se encuentra disponible comercialmente un equipo completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Este sistema también se puede extender para mapear dominios de proteínas implicados en las interacciones de proteínas específicas así como para precisar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Con el fin de hallar compuestos que interfieran con la interacción de un gen identificado en la presente invención y otros componentes intra o extracelulares, se prepara habitualmente una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y unión de los dos productos. Para ensayar la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para utilizar como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal como se ha descrito anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de prueba, indica que el compuesto de prueba interfiere con la interacción del compuesto de prueba y su compañero de reacción.

L. *Composiciones y Procedimientos para el Tratamiento de Enfermedades Relacionados con el Sistema Inmune*

Las composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune incluyen, sin limitación, proteínas, anticuerpos, moléculas orgánicas pequeñas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido y ribozimas, moléculas de triple hélice, etc. que inhiben o estimulan la función inmune, por ejemplo, proliferación/activación de células T, liberación de linfoquinas, o infiltración de células inmunes.

Por ejemplo, las moléculas de ADN y ARN antisentido actúan para bloquear directamente la traducción de ARNm hibridándose a ARNm marcado y evitando la traducción de proteínas. Cuando se utiliza ADN antisentido, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

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

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

Estas moléculas se pueden identificar mediante cualquier combinación de los ensayos de cribado descritos anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica conocida por los expertos en la materia.

M. *Anticuerpos anti-PRO842*

En la presente invención se describen anticuerpos anti-PRO842. La presente invención proporciona además anticuerpos anti-PRO842 antagonistas. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. *Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos anti-PRO842 pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido PRO842 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida para que sea inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, pero no se limitan a, hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin una gran experimentación.

2. *Anticuerpos monoclonales*

Los anticuerpos anti-PRO842 pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

El agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido PRO842 o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

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

A continuación, el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se pueden ensayar para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra PRO842. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

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

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

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

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

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

3. *Anticuerpos humanos y humanizados*

Los anticuerpos anti-PRO842 de la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al*., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al*., Nature, 332 : 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

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

Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector, incluyendo las bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks *et al*., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al*. y Boerner *et al*. están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al*., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, página 77 (1985) y Boerner *et al*., J. Inmunol., 147(1): 86-95 (1991). De forma similar, los anticuerpos humanos se pueden fabricar mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o completamente inactivados. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parecen estrechamente a los observados en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reajuste de genes, el ensamblaje, y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425;

5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al*., BioTechnology 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al*., Nature 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild *et al*., Nature Biotechnology 14, 845-51, (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13 65-93 (1995).

Los anticuerpos también se pueden madurar por afinidad utilizando procedimientos conocidos de selección y/o mutagénesis tal y como se han descrito anteriormente. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tienen una afinidad que es cinco veces, más preferiblemente 10 veces, incluso más preferiblemente 20 ó 30 veces mayor que el anticuerpo de partida (generalmente murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo maduro.

4. *Anticuerpos biespecíficos*

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión con por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el PRO842, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferiblemente para una proteína o receptor o subunidad del receptor de la superficie celular.

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

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

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

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

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

Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny *et al*., J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas

Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Ver Gruber *et al*., J. Immunol. 152:5368 (1994).

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

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes en una polipéptido PRO842 determinado de la presente invención. Alternativamente, un brazo de polipéptido anti-PRO842 se puede combinar con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG (FcgR), tales como FcgRI (CD64), FcgRII (CD32) y FcgRIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa la polipéptido PRO842 concreto. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos a células que expresan un polipéptido PRO842 concreto. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a PRO842 y un brazo que se une a un agente citotóxico o un radionúcleo quelante, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido PRO842 y además se une al factor tisular (TF).

5. *Anticuerpos heteroconjugados*

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

6. *Diseño de la función efectora*

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

7. *Inmunoconjugados*

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

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

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridiiditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), deriva-

dos bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuesto de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta *et al*., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionúcleos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

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

8. *Inmunoliposomas*

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

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

9. *Usos para anticuerpos anti-PRO842*

Los anticuerpos anti-PRO842 de la presente invención tienen varias utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PRO842 se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico para PRO842, por ejemplo, la detección de su expresión (y en algunos casos, la expresión diferencial) en células específicas, tejidos o suero. Se puede utilizar varias técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en el sector, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fase heterogénea u homogénea [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987), páginas 147-158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico se pueden marcar con un grupo detectable. El grupo detectable debería ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^{3}H, ^{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 utilizar cualquier procedimiento conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al grupo detectable, incluyendo aquellos procedimientos descritos por hunter *et al*., Nature, 144: 945 (1962); David *et al*., Biochemistry, 13: 1014 (1974); Pain *et al*., J. immunol. Meth., 40: 219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem, 30: 407 (1982).

Los anticuerpos anti-PRO842 también son útiles para purificación por afinidad de PRO842 a partir de cultivos de células recombinantes o fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos contra PRO842 se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como una resina o papel de filtro Sephadex, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el PRO842 a purificar y, posteriormente, se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el PRO842, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el PRO842 del anticuerpo.

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

Todas las referencias a patentes y otra literatura citadas en la presente invención se incorporan por la presente como referencia en toda su totalidad.

N. *Composiciones farmacéuticas*

Las moléculas PRO842 activas descritas en la presente invención (por ejemplo, polipéptidos PRO842, anticuerpos anti-PRO842 antagonistas de la presente invención, yo variantes de cada uno), así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos anteriormente, se pueden administrar para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune en forma de composiciones farmacéuticas. Las formulaciones terapéuticas de la molécula PRO842 activa, preferiblemente un polipéptido o anticuerpo antagonista de la presente invención, se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla de la molécula activa que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición,

Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los compuestos identificados mediante los ensayos de cribado descritos en la presente invención se pueden formular de manera análoga utilizando técnicas estándar bien conocidas en el sector.

Las lipofecciones o liposomas también se pueden utilizar para liberar la molécula PRO842 en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, las moléculas de péptidos se pueden diseñar de manera que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta en tratamiento, preferiblemente aquéllas con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, citoquinas o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo deseado.

Las moléculas PRO942 activas también se pueden introducir en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización por interfase, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, Osol, A. Bd. (1980).

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

Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada de las moléculas PRO842. Entre algunos ejemplos de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol), polilácticos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten la liberación de moléculas durante aproximadamente 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37ºC, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias razonables para la estabilización dependiendo de los mecanismos implicados. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede conseguir mediante la modificación de residuos sulfhidrilo, la liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización apropiada de aditivos, y el desarrollo de composiciones de matrices de polímero específicas.

O. *Procedimientos de tratamiento*

Los polipéptidos, y compuestos activos de anticuerpos antagonistas la presente invención se pueden utilizar en la preparación de medicamentos para tratar varias enfermedades y condiciones relacionadas con el sistema inmune, tales como enfermedades mediadas por células T, incluyendo aquellas caracterizadas por la infiltración de células inflamatorias en un tejido, estimulación de la proliferación de células T, inhibición de la proliferación de células T, aumento o descenso de la permeabilidad vascular o la inhibición de la misma.

Entre las enfermedades o condiciones a tratar con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos de la presente invención de ejemplo se incluyen, pero no se limitan a, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, osteoartritis, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas

(dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis limfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barre y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como las hepatitis infecciosas (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis crónica activa autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y conlangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune incluyendo las enfermedades bullosas de piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas de los ovarios, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes incluídas el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped.

En el lupus eritematoso sistémico, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuepos autoreactivos para propias proteínas/tejidos y la posterior generación de la inflamación mediada por el sistema inmune. Los anticuerpos median directa o indirectamente la lesión en el tejido. Aunque no se ha observado que los linfocitos T estén directamente implicados en el daño tisular, los linfocitos T son necesarios para el desarrollo de anticuerpos auto-reactivos. La génesis de la enfermedad es de este modo dependiente de los linfocitos T. Los órganos y sistemas múltiples están afectados clínicamente incluyendo el riñón, el pulmón, el sistema musculoesquelético, el sistema mucocutáneo, ojo, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula espinal y sangre.

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmune sistémica crónica que implica principalmente a la membrana sinovial de múltiples articulaciones con la lesión resultante en el cartílago articular. La patogénesis es dependiente de los linfocitos T y está asociada con la producción de factores reumatoides, auto-anticuerpos dirigidos contra las propias IgG, con la formación resultante de complejos inmunes que alcanzan niveles elevados en fluidos de la articulación y sangre. Estos complejos en la articulación pueden inducir el infiltrado marcado de linfocitos y monocitos en el sinovio y los posteriores cambios sinoviales marcados: el espacio/fluido de las articulaciones se infiltra mediante células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, frecuentemente en un patrón simétrico. Sin embargo, la enfermedad extraarticular también aparece en dos formas importantes. Una forma es el desarrollo de lesiones extra-articulares con la enfermedad articular progresiva presente y las lesiones típicas de la fibrosis pulmonar, vaculitis y úlceras cutáneas. La segunda forma de la enfermedad extra-articular es el denominado síndrome de Felty que aparece de forma tardía en la evolución de la enfermedad de RA, algunas veces después de que la enfermedad articular haya quedado inactiva, e implica la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede estar acompañado por vaculitis en múltiples órganos con formaciones de infartos, úlceras en la piel y gangrena. Los pacientes también desarrollan frecuentemente nódulos reumatoides en el tejido subcutáneo que recubre las articulaciones afectadas; la etapa tardía de los nódulos tienen centros necróticos rodeados por un infiltrado de células inflamatorias mezcladas. Otras manifestaciones que pueden aparecer en RA incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca y nódulos reumatoides.

La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que empieza frecuentemente con como mínimo 16 años de edad. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la RA; algunos pacientes que presentan un resultado positivo en el factor reumatoide se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se subclasifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser aguda y es habitualmente destructiva y conduce a la anquilosis de la articulación y el crecimiento retardado. Otras manifestaciones pueden incluir uveitis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto génico HLA-B27. Entre los trastornos se incluyen: esponilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada con la enfermedad del intestino inflamatoria, espondilitis asociada con psoriasis, espondiloartropatía de inicio juvenil y espondiloartropatía no diferenciada. Las características diferenciables incluyen la sacroleitis con o sin espondilitis; artritis inflamatoria asimétrica; asociación con HLA-B27 (un alelo definido serológicamente del locus HLA-B de MHC de clase I); inflamación ocular, y ausencia de autoanticuerpos asociados con otra enfermedad reumatoide. La célula más implicada como clave de la inducción de la enfermedqad es el linfocito T $CD8^+$, una célula que dirige un antígeno presentado por moléculas MHC de clase I. Las células T $CD8^+$ pueden reaccionar contra el alelo HLA-B27 de MHC de clase 1 como si fuera un péptido exógeno expresado por moléculas MHC de clase 1. Se ha realizado la hipótesis de que un epítopo de HLA-B27 puede mimetizar un epítopo antigénico bacteriano o microbiano y de este modo inducir una respuesta de células T $CD8^+$.

La esclerosis sistémica (escleroderma) tiene una etiología desconocida. Una característica de la enfermedad es el endurecimiento de la piel; probablemente inducido por un proceso inflamatorio activo. El escleroderma puede ser localizado o sistémico; las lesiones vasculares son habituales y la lesión de las células endoteliales en la microvasculatura en un suceso inicial e importante en el desarrollo de esclerosis sistémica; la lesión vascular puede estar mediada por el sistema inmune. Se supone una base inmunológica por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y la presencia de anticuerpos antinucleares en muchos pacientes. La ICAM-1 frecuentemente

favorece la expresión en la superficie celular de los fibroblastos en lesiones de piel sugiriendo que la interacción de las células T con estas células puede tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. Entre otros órganos implicados se incluyen: el tracto gastrointestinal: la atrofía del músculo liso y la fibrosis que da lugar a una peristalsis/motilidad anormal; riñón: la proliferación concéntrica de íntima subendotelial que afecta las arterias arqueadas pequeñas e interlobulares con un menor flujo sanguíneo cortical renal resultante, da lugar a proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis en banda de contracción, cicatrización/fibrosis.

Las miopatías inflamatorias idiopáticas incluyendo la dermatomiositis, polimiositis y otros son trastornos de la inflamación muscular crónica de etiología desconocida que dan lugar a una debilidad del músculo. La lesión/inflamación muscular es frecuentemente simétrica y progresiva. Los autoanticuerpos se asocian con la mayoría de las formas. Estos autoanticuerpos específicos de la miositis están dirigidos contra e inhiben la función de los componentes, proteínas y ARNms implicados en la síntesis de proteínas.

El síndrome de Sjögren es debido a una inflamación mediada por el sistema inmune y la posterior destrucción funcional de las glándulas lacrimales y las glándulas salivares. La enfermedad puede estar asociada con o acompañada por enfermedades del tejido conectivo inflamatorio. La enfermedad está asociada con la producción de autoanticuerpos contra los antígenos Ro y La, los cuales son complejos ARN-proteína pequeños. Las lesiones dan lugar a queratoconjuntivitis seca, xerostomía, con otras manifestaciones o asociaciones que incluyen cirrosis biliar, neuropatía periférica o sensorial y púrpura palpable.

La vaculitis sistémica son enfermedades en las que la lesión principal es la inflamación y en algunos casos existe un daño posterior en los vasos sanguíneo que da lugar a una isquemia/necrosis/degeneración en tejidos a los que llegan los vasos sanguíneos afectados y la posible disfunción final del órgano. La vasculitis también puede aparecer como una lesión secundaria o secuela de otras enfermeaddes mediadas por el sistema inmune-inflamatorio, tales como artritis reumatoide, esclerosis sistémica, etc., particularmente en enfermedades también asociadas con la formación de complejos inmunes. Entre las enfermedades del grupo de vasculitis sistémica primaria se incluyen: vasculitis necrotizante sistémica, poliarteritis nodosa, angiitis alérgica y granulomatosis, poliangiitis; granulomatosis de Wegener; granulomatosis linfomatoide; y arteritis de células gigantes. Entre las vasculitis diversas se incluyen: síndrome del nódulo linfático mucocutáneo (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis del SNC aislada, enfermedad de Behet, tromboangiitis obliterante (enfermedad de Buerger) y venulitis necrotizante cutánea. El mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis enumeradas se cree que son principalmente debidas a la deposición de complejos de inmunoglobulinas en la pared del vaso sanguíneo y la posterior inducción de una respuesta inflamatoria vía ADCC, complejo de activación o ambos.

La sarcoidosis es una enfermedad de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epitelioides en casi cualquier tejido del cuerpo; la implicación del pulmón es lo más habitual. La patogénesis implica la persistencia de macrófagos activados y células linfoides en sitios de la enfermedad con las posteriores secuelas crónicas resultantes de la liberación de productos locales y sistémicamente activos liberados por estos tipos de células.

La anemia hemolítica autoinmune que incluye la anemia hemolítica autoinmune, la pancitopenia inmune, y la hemoglobinuria paroxismal nocturna es un resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados en la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos otras células sanguíneas incluyendo plaquetas también) y es un reflejo de la eliminación de estas células recubiertas de anticuerpo a través de la lisis mediada por complemento y/o mecanismos mediados por receptor ADCC/Fc.

En la trombocitopenia autoinmune que incluye púrpura trombocitopénica y trombocitopenia mediada por el sistema inmune en otros escenarios clínicos, la destrucción/eliminación de plaquetas aparece como resultado de la unión de anticuerpos o complementos a plaquetas y la posterior eliminación mediante lisis de complemento, mecanismos mediados por receptor ADCC/Fc.

La tiroiditis que incluye la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto, la tiroiditis linfocítica juvenil, y la tiroiditis atrófica son el resultado de una respuesta autoinmune contra los antígenos de la tiroides con la producción de anticuerpos que reaccionan con proteínas presentes en y frecuentemente específicas para la glándula tiroidal. Los modelos experimentales existentes incluyen modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepa de pollos obesos); modelos inducibles: inmunización de *animales* con tiroglobulina, antígeno microsómico de tiroides (tiroide peroxidasa).

La diabetes mellitus tipo I o diabetes dependiente de insulina es la destrucción autoinmune de células β de las isletas pancreáticas; esta destrucción está mediada por auto-anticuerpos y células T autorreactivas. Los anticuerpos para insulina o el receptor de insulina también pueden producir el fenotipo de la no respuesta a insulina.

Las enfermedades renales mediadas por el sistema inmune, incluyendo glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de la lesión mediada por anticuerpos o linfocitos T en el tejido renal directamente como resultado de la producción de anticuerpos autorreactivos o células T contra antígenos renales, o bien, indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o complejos inmunes en el riñón que son reactivos contra otros antígenos no renales. De este modo, otras enfermedades mediadas por el sistema inmune que dan lugar a la formación de complejos inmunes también pueden inducir enfermedades renales mediadas por el sistema inmune como una secuela

indirecta. Ambos mecanismos inmunes directo e indirecto dan lugar a una respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de lesiones en los tejidos renales con una alteración funcional orgánica resultante y en algunos casos la progresión para la insuficiencia renal. Ambos mecanismos inmunes humorales y celulares pueden estar implicados en la patogénesis de las lesiones.

Las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo esclerosis múltiple; polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barre; y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, se cree que tienen una base autoinmune y dan lugar a una desmielinización nerviosa como resultado del daño causado a los oligodendrocitos o a la mielina directamente. En la MS existen evidencias para sugerir que la inducción y progresión de la enfermedad son dependientes de los linfocitos T. La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante que es dependiente de los linfocitos T y tiene una evolución de recaída-remisión o una evolución progresiva crónica. La etiología es desconocida; sin embargo, las infecciones virales, la predisposición genética, el medio, y la autoinmunidad contribuyen. Las lesiones contienen infiltrados de predominantemente células microgliales mediadas por linfocitos T y macrófagos de infiltración; los linfocitos T $CD4^+$ son el tipo de célula predominante en las lesiones. El mecanismo de la muerte celular por oligodendrocitos y la posterior desmielinización no son conocidos pero es probable que estén dirigidos por linfocitos T.

La enfermedad de pulmón inflamatoria y fibrótica, incluyendo la neumonía eosinofílico; la fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, pueden implicar una respuesta inmuno-inflamatoria desregulada. La inhibición de esa respuesta tendría un efecto terapéutico.

La enfermedad de la piel autoinmune o mediada por el sistema inmune incluyendo enfermedades bullosas de la piel, eritema multiforme y dermatitis por contacto están mediadas por auto-anticuerpos, la génesis de los cuales es dependiente de los linfocitos T.

La psoriasis es un enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células que procesan antígenos y algunos neutrófilos.

Las enfermedades alérgicas, incluyendo asma; rinitis alérgica; dermatitis atópica; hipersensibilidad a los alimentos; y la urticaria son dependientes de los linfocitos T. Estas enfermedades están mediadas predominantemente por la inflamación inducida por linfocitos T, la inflamación mediada por IgE o una combinación de ambas.

Las enfermedades asociadas a trasplantes, incluyendo el rechazo de injerto y la enfermedad de injerto contra huésped (GHVD) son dependientes de los linfocitos T; la inhibición de la función de los linfocitos T es mejorable.

Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmuno y/o inflamatoria tiene ventajas son las enfermedades infecciosas incluyendo, pero sin limitarse a, la infección viral (incluyendo, pero sin limitarse a, SIDA, hepatitis A, B, C, D, E y herpes), infección bacteriana, infecciones micóticas, e infecciones por protozoos y parásitos (moléculas (o derivados/agonistas) que estimulan la MLR se pueden utilizar terapeúticamente para aumentar la respuesta inmune en agentes infecciosos), enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas) que estimulan la MLR se pueden utilizar terapeúticamente para aumentar la respuesta inmune para enfermedades de inmunodeficiencia heredada, adquirida, inducida infecciosa (como en la infección por VIH) o iatrogénica (es decir, proviniente de la quimioterapia) y la neoplasia.

Se ha demostrado que algunos pacientes humanos de cáncer desarrollan una respuesta de anticuerpo y/o linfocitos T a antígenos en células neoplásicas. También se ha observado en modelos de animales de neoplasia que el aumento de la respuesta inmune puede dar lugar al rechazo o regresión de ese neoplamsa concreto. Las moléculas que aumentan la respuestas de los linfocitos T en la MLR tienen utilidad *in vivo* en el aumento de la respuesta inmune contra la neoplasia. Las moléculas que aumentan la respuesta proliferativa de los linfocitos T en la MLR (o agonistas de moléculas pequeñas o anticuerpos que afectaban al mismo receptor de un modo agonístico) se pueden utilizar terapéuticamente para tratar el cáncer. Las moléculas que inhiben la respuesta de los linfocitos en la MLR también funcionan *in vivo* durante la neoplasia para suprimir la respuesta inmune a un neoplasma; dichas moléculas se pueden expresar mediante las propias células neoplásicas o su expresión se puede inducir por el neoplasma en otras células. El antagonismo de dichas moléculas inhibidoras (o con anticuerpo, antagonistas de moléculas pequeñas u otros medios) aumenta el rechazo al tumor mediado por el sistema inmune.

Adicionalmente, la inhibición de moléculas con propiedades proinflamatorias puede tener una ventaja terapéutica en la lesión por reperfusión; apoplejía; infarto de miocardio; aterosclerosis; lesión pulmonar aguda; choque hemorrágico; quemaduras; sepsis/choque séptico; necrosis tubular aguda; endometriosis; enfermedad de las articulaciones degenerativa y pancreatitis. Los compuestos de la presente invención, por ejemplo, polipéptidos o anticuerpos, se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación (intranasal, intrapulmonar). Se prefiere la administración intravenosa o por inhalación de los polipéptidos y anticuerpos.

En la terapia con inmunoadyuvants, se pueden combinar otras pautas terapéuticas, tales como la administración de un agente anticancerígeno, con la administración de las proteínas, anticuerpos o compuestos de la presente invención. Por ejemplo, el paciente a tratar con los inmunoadyuvanetes de la presente invención también pueden recibir un agente

anticancerígeno (agente quimioterapéutico) o terapia con radiación. La preparación y los programas de dosificación para dichos agentes quimitoerapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante o según se determina empíricamente por el profesional. La preparación y los programas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en *Chemotherapy Service* Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder o seguir a la administración del inmunoadyuvante o se puede administrar simultáneamente con el mismo. Adicionalmente, un compuesto anti-oestrógeno, tal como tamoxifeno, o una anti-progesterona, tal como onapristona (ver, EP 616812) se pueden administrar en dosis conocidas para dichas moléculas.

Se puede desear también administrar anticuerpos contra otros antígenos asociadaso a una enfermedad inmune o asociados a un tumor, tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o además, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o a dos o más antígenos diferentes descritos en la presente invención. Algunas veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización, los polipéptidos PRO842 se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar en primer lugar, seguido de un polipéptido PRO842. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración en primer lugar. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas que se utilizan actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el polipéptido PRO842.

Para el tratamiento o la reducción de la gravedad de la enfermedad relacionada con el sistema inmune, la dosis apropiada de un compuesto de la presente invención dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal y como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente se administra con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al compuesto, y la discreción del profesional que atiende al paciente. El compuesto se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos.

Por ejemplo, dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 mg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de polipéptido o anticuerpo es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar entre aproximadamente 1 mg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o a más tiempo, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

P. *Artículos de fabricación*

Se describe un artículo de fabricación que contiene materiales (por ejemplo, que comprende una molécula de PRO842) útiles para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y unas indicaciones. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es habitualmente un polipéptido o un anticuerpo de la presente invención. Las indicaciones o etiqueta en el recipiente o asociado con el mismo indican que la composición se utiliza para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Pueden incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

Q. *Diagnóstico y pronóstico de enfermedades relacionas con el sistema inmune*

Las proteínas de la superficie celular, tales como proteínas que se sobreexpresan en ciertas enfermedades relacionadas con el sistema inmune, son excelentes dianas para los fármacos candidatos o el tratamiento de la enfermedad. Las mismas proteínas junto con proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en los estados de la enfermedad relacionada con el sistema inmune son útiles adicionalmente en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra las proteínas producto de los genes amplificados en la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, trastorno inflamatorio del intestino u otra enfermedad relacionada con el sistema inmune, se pueden utilizar como diagnóstico o pronóstico.

Por ejemplo, los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, se pueden utilizar para detectar cualitativa o cuantitativamente la expresión de proteínas codificadas por los genes amplificados o sobreexpresados ("productos génicos marcadores"). El anticuerpo está preferiblemente equipado con un marcador detectable, por ejemplo marcador fluorescente, y la unión se puede monitorizar mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en el sector. Estas técnicas son particularmente adecuadas, si el gen sobreexpresado codifica una proteína de la superficie celular. Dichos ensayos de unión se realizan esencialmente tal y como se han descrito anteriormente.

La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos génicos marcadores se puede realizar, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopia inmunoelectrónica. Con este objetivo, se extrae una muestra histológica del paciente, y se aplica un anticuerpo marcado a la misma, preferiblemente mediante el recubrimiento del anticuerpo sobre la muestra biológica. Este procedimiento también permite la determinación de la distribución del producto génico marcador en el tejido examinado. Será evidente para los expertos en la materia que existen una gran variedad de procedimientos histológicos fácilmente disponibles para la detección *in situ*.

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

Ejemplos

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

Ejemplo 1

Aislamiento de los clones del ADNc que codifican PRO842 humano

Se identificaron secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos PRO842 mediante la aplicación de un algoritmo patentado que halla una secuencia señal desarrollado por Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) sobre ESTs así como fragmentos de EST agrupados y ensamblados de las bases de datos públicas (por ejemplo, Banco de Genes) y/o privadas (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA). El algoritmo de la secuencia señal calcula una puntuación de la señal de secreción basada en el carácter de los nucleótidos del ADN que rodean al primer codón de metionina (ATG), y de manera opcional al segundo, en el extremo 5' de la secuencia o el fragmento de secuencia en consideración. Los nucleótidos que siguen al primer ATG deben codificar por lo menos 35 aminoácidos inequívocos sin ningún codón de parada. Si el primer ATG tiene los aminoácidos requeridos, el segundo no se examina. Si ninguno reúne los requisitos, la secuencia candidata no se contabiliza. Con el fin de determinar si la secuencia EST contiene una secuencia señal auténtica, el ADN y las correspondientes secuencias de aminoácidos que rodean el codón ATG son contabilizadas utilizando un dispositivo de siete sensores (parámetros de evaluación) que se sabe que se asocian con las señales de secreción. El uso de este algoritmo dio lugar a la identificación de una única secuencia en grupo de EST de Incyte designada en la presente invención como secuencia en grupo EST de Incyte no. 69572. Esta secuencia en grupo EST se comparó a continuación con una serie de bases de datos de etiqueta de secuencia expresada (EST) que incluían bases de datos públicas de EST (por ejemplo, GenBank) y una base de datos de ADN de EST privada (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) para identificar homologías existentes. La búsqueda de homologías se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST2 (Altshul *et al*., Methods in Enzymology 266: 460-480 (1996)). Las comparaciones que dieron lugar a una valoración en BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o superior que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y ensamblaron en una secuencia de ADN de consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). La secuencia de consenso obntenida del mismo se designa en la presente invención como DNA54230.

En virtud de la homología de secuencias observada entre la secuencia de consenso y una secuencia EST comprendida en el clon de EST de Merck no. AA477092, se adquirió el clon de EST de Merck AA477092 y se obtuvo el inserto de ADNc y se secuenció. Se observó que este inserto codificaba una proteína de longitud completa. La secuencia de este inserto de ADNc se muestra en la figura 98 y se designa en la presente invención como DNA56855-1447.

El clon de longitud completa mostrado en la figura 98 contenía un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación de la traducción claro en los nucleótidos de posiciones 153-155 y de finalización en el codón de parada hallado en las posiciones de nucleótidos 510-512 (figura 98; SEC ID No: 164). El precursor del polipéptido previsto (figura 99, SEC ID No: 165) tiene 119 aminoácidos de largo. El PRO842 tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 13.819 Daltons y un pI estimado de aproximadamente 11,16. Entre otras características de PRO842 se incluyen un péptido señal en aproximadamente los aminoácidos 1-22, un potencial sitio de fosforilación de proteína quinasa C en aproximadamente los aminoácidos 39-41 y dos potenciales sitios de N-miristoilación en aproximadamente los aminoácidos 27-32 y aproximadamente los aminoácidos 46-51.

Un análisis de la base de datos Dayhoff (versión 35.45 SwissProt 35), que utiliza un análisis de alineación de secuencias WU-BLAST2 de la secuencia de longitud completa mostrada en la figura 98 (SEC ID No: 164), mostró cierta homología entre la secuencia de aminoácidos de PRO842 y las siguientes secuencias de Dayhoff: CEZK131_11, P_R80843, RAT5HT2X_1, S81882_1, A60912, MCU60315_137MC137L, U93422_1, p_P91996, U93462_1 Y ZN18_HUMAN.

Ejemplo 2

Expresión de PRO842 en E. coli

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de polipéptidos PRO842 mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica un polipéptido PRO842 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar *et. al*., Gene, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se defosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor trp, una secuencia líder de poliHis (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poliHis, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante del polipéptido PRO842, el finalizador transcripcional lambda, y un gen argU.

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

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

Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y el polipéptido PRO842 solubilizado se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte del polipéptido.

Los polipéptidos PRO842 pueden expresarse en *E. coli* en forma de etiqueta de poli-His, utilizando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica un polipéptido PRO842 se amplifica inicialmente utilizando cebadores del PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios para las enzimas de restricción que se corresponden con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan una iniciación de la traducción eficaz y fiable, una purificación rápida en una columna quelante metálica, y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas de poli-His amplificadas por PCR se unen a continuación en un vector de expresión que se utiliza para transformar un *E. coli* huésped basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) Ion galE rpoHts(htpRts) clpP(laclq). Los transformantes se cultivan en primer lugar en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30ºC con agitación hasta alcanzar una D.O. 600 de 3-5. Los cultivos se diluyen a continuación 50-100 veces en un medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,71 g de citrato de sodio·$2H_2O$, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, además de 110 mM de MPOS, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y 7 mM de $MgSO_4$) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30ºC con agitación. Las muestras se extraen para verificar la expresión mediante un análisis SDS-PAGE, y el volumen del cultivo se centrifuga hasta que las células son residuos de centrifugación. Los residuos de centrifugación de las células se congelan hasta la purificación y el repliegue.

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

Las proteínas se repliegan mediante la dilución lenta de la muestra en tampón de repliegue preparado nuevo consistente en: 20 mM de Tris, pH 8,6, 0,3 M de NaCl, 2,5 M de urea, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina y 1 mM de EDTA. Los volúmenes de repliegues se escogen de manera que la concentración final de proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de repliegue se agita suavemente a 4ºC durante 12-36 horas. La reacción de repliegue se detiene mediante la adición de TFA hasta una concentración final del 0,4% (pH aproximadamente de 3). Antes de otra purificación de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micras y se añade acetonitrilo hasta una concentración final del 2-10%. La proteína replegada se somete a una columna de cromatografía de fase inversa Poros

R1/H utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Las alícuotas de fracciones con una absorbancia A280 se analizan en geles de SDS poliacrilamida y las fracciones que contienen proteína replegada homogénea se agrupan. Generalmente, las especies replegadas correctamente de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetronitrilo, ya que esas especies son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de solucionar las formas desplegadas de proteínas de la manera deseada, la etapa de la fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

Las fracciones que contienen el polipéptido PRO842 plegado deseado se agrupan y se elimina el acetonitrilo utilizando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en 20 mM Hepes, pH 6,8 con 0,14 M de cloruro sódico y manitol al 4% por diálisis o por filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas estériles.

Los polipéptidos PRO84 se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 3

Expresión de PRO842 en células de mamíferos

Este ejemplo ilustra la preparación de formas potencialmente glicosiladas de polipéptidos PRO842 mediante la expresión recombinante en células de *mamíferos*.

El vector pRK5 (véase EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de PRO842 está ligado en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO842 utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook *et. al., supra*. El vector resultante se denomina pRK5-PRO842.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se desarrollan para unirse en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 μg de ADN de pRK5-PRO842 se mezcla con aproximadamente 1 μg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmappaya *et. al*., Cell, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 μl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de $CaCl_2$. A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 μl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de $NaPO_4$, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25ºC. El precipitado se suspende y se añade a células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37ºC. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio nuevo y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 μCi/ml de ^{35}S-cisteína y 200 μCi/ml ^{35}S- metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de giro y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido PRO842. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, se puede introducir PRO842 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et. al*., Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un matraz centrifugador y se añaden 700 μg de ADN de pRK5-PRO842. En primer lugar, las células se concentran en el matraz centrifugador mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado en el residuo de células durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el matraz centrifugador que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 μg/ml de insulina bovina y 0,1 μg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los debris. A continuación, la muestra que contiene el polipéptido PRO842 expresado se puede concentrar y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, los polipéptidos PRO842 pueden expresarse en células CHO. El pRK5-PRO842 puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como $CaPO_4$ o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio remplazarse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como la ^{35}S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido PRO842, el medio de cultivo puede remplazarse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio acondicionado. A continuación, el medio que contiene el polipéptido PRO842 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

El PRO842 etiquetado con epítopo puede expresarse también en células CHO huésped. El PRO842 puede subclonarse fuera del vector pRK5. La inserción del subclón puede experimentar PCR para fusionarse en el marco con una epítopo etiqueta concreto, tal como una etiqueta de poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. La inserción de PRO842 etiquetado con poli-his puede subclonarse a continuación en un vector conductor SV40 que contiene un

marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal y como se ha descrito anteriormente) con el vector conductor SV40. El marcaje puede realizarse, tal y como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el polipéptido PRO842 etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelante-Ni^{2+}.

Los polipéptidos PRO842 también pueden expresarse en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

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

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

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

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

Para las construcciones etiquetadas de poli-His, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni^{2+}-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni^{2+}-NTA equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4ºC. Tras cargarse, la columna se lava con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con el tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guarda a -80ºC.

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

Los polipéptidos PRO842 también se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 4

Expresión de PRO842 en levadura

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de polipéptidos PRO842 en levadura.

En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de PRO842 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO842 y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular del polipéptido PRO842. Para la secreción, el ADN que codifica PRO842 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de PRO842 nativo u otro péptido señal de *mamífero*, o, por ejemplo, la secuencia señal/líder secretora del factor alfa o invertasa de la levadura, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de PRO842.

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

Los polipéptidos PRO842 recombinantes pueden aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene el polipéptido PRO842 puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna concretas.

Ejemplo 5

Expresión de PRO842 en células de insectos infectadas de Baculovirus

El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de polipéptidos PRO842 en células de insectos infectadas de Baculovirus.

La secuencia que codifica para PRO842 se fusiona en dirección 5' a una etiqueta epítopo contenida en un vector de expresión de Baculovirus. Dichas etiquetas epítopo incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica para PRO842 o la parte deseada de la secuencia codificante para PRO842, 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 mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

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

A continuación, el PRO842 etiquetado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni^{2+}-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert *et. al*., Nature, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de $MgCl_2$; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonican dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se aclaran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm. Se prepara una columna de agarosa Ni^{2+}-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A_{280} con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato: 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye las proteínas unidas no específicamente. Después de alcanzar la línea base a A_{280} de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni^{2+}-NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen PRO842 etiquetado con His_{10} eluído se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

Alternativamente, la purificación del PRO842 etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

Los polipéptidos PRO842 se expresaron de forma satisfactoria tal y como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 6

Preparación de anticuerpos que se unen a PRO245

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a PRO842.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen polipéptidos PRO842 purificados, proteínas de fusión que contienen polipéptidos PRO842, y células que expresan polipéptidos PRO842 recombinantes en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse por el técnico en la materia sin una gran experimentación.

Los ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de PRO842 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se estimulan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante varias semanas, los ratones también se pueden estimular con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-PRO842.

Después de detectar un título de anticuerpos adecuado, a los animales "positivos" para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de PRO842. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA para la reactividad contra PRO842. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO842 está dentro de la técnica.

Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar intraperitonialmente en ratones singeneicos Balb/c para producir ascitos que contienen los anticuerpos monoclonales anti-PRO842. Alternativamente, las células de hibridoma pueden desarrollarse en matraces o botellas en rodillo de cultivos de tejidos. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los ascitos se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

Ejemplo 7

Purificación de polipéptidos PRO842 utilizando anticuerpos específicos

Los polipéptidos PRO842 nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en las técnicas de purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifica el polipéptido pro-PRO842, el polipéptido PRO842 maduro, o el polipéptido pre-PRO842 mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO842 de interés. En general, una columna de inmunoafinidad se construye mediante el acoplamiento covalente del anticuerpo anti-polipéptido PRO842 a una resina cromatográfica activada.

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

Dicha columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido PRO842 mediante la preparación de una fracción a partir de células que contienen polipéptido PRO842 en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de toda la célula o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por adición de detergente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido PRO842 soluble que contiene una secuencia señal puede secretarse en una cantidad útil en el medio en el que crecen las células.

Una preparación que contiene polipéptido PRO842 soluble se pasa por la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorbancia preferencial del polipéptido PRO842 (por ejemplo, tampones de fuerza iónica elevada en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que rompen la unión anticuerpo-polipéptido PRO842 (por ejemplo, un tampón de pH bajo, tal como aproximadamente un pH de 2-3, o una alta concentración de caótropo, tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido PRO842.

Ejemplo 8

Cribado de fármacos

La presente invención es particularmente útil para cribar compuestos mediante la utilización de polipéptidos PRO842 o fragmentos de unión de los mismos en cualquier variedad de técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido o fragmento de PRO842 utilizado en dicha prueba puede estar libre en solución, fijado a un soporte sólido, adsorbido en una superficie celular o situado intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármacos utiliza células huésped eucariotas o procariotas, las cuales se transforman de forma estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO842 o un fragmento. Los fármacos se criban contra dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, tanto en forma viable como fija, se pueden utilizar para ensayos de unión estándar. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido PRO842 o un fragmento y el agente que se está probando. Alternativamente, se puede examinar la disminución en la formación del complejo entre el polipéptido PRO842 y su célula diana o receptores diana causada por el agente que se está probando.

De este modo, la presente invención proporciona procedimientos de cribado para fármacos o cualquier otro agente que puede afectar a una enfermedad o un trastorno asociados al polipéptido PRO842. Estos procedimientos comprenden el contacto de dicho agente con un polipéptido PRO842 o fragmento del mismo y el ensayo (I) para la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO842 o un fragmento, o (II) para la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO842 o un fragmento y la célula, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En dichos ensayos de unión competitiva, el polipéptido PRO842 o un fragmento está normalmente marcado. Después de una incubación adecuada, el polipéptido PRO8422 o un fragmento libres se separan de la forma unida, y la cantidad de marca libre o no complejada es una medida de la capacidad del agente concreto para unirse al polipéptido PRO842 o para interferir con el complejo polipéptido PRO842/célula.

Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona un alto rendimiento cribando compuestos que tienen una afinidad de unión adecuada a un polipéptido y se describe en detalle en WO 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. Brevemente se afirma que una gran cantidad de compuestos de diferentes péptidos pequeños de prueba se sintetizan en un sustrato sólido, tal como agujas de plástico o alguna otra superficie. Tal y como se aplica a un polipéptido PRO842, los compuestos de péptidos de prueba se hacen reaccionar con el polipéptido PRO842 y se lavan. Se detecta el polipéptido PRO842 unido mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. El polipéptido PRO842 purificado también puede recubrirse directamente en placas para utilizar en las técnicas de cribado de fármacos mencionadas anteriormente. Además, se pueden utilizar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo en el soporte sólido.

La presente invención también contempla la utilización de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los cuales los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse a polipéptidos PRO842 compiten específicamente con un compuesto de prueba para unirse al polipéptido PRO842 o fragmentos del mismo. De esta manera, pueden utilizarse los anticuerpos para detectar la presencia de cualquier péptido que comparte uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO842.

Ejemplo 9

Diseño racional de fármacos

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos de interés (es decir, un polipéptido PRO842) o de pequeñas moléculas con las cuales interactúan, por ejemplo, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se puede utilizar para fármacos de moda que son formas más activas o estables del polipéptido PRO842 o que potencian o interfieren con la función del polipéptido PRO842 *in vivo* (c.f. Hodgson, *Bio/Technology*, 9: 19-21 (1991)).

En un enfoque, la estructura tridimensional del polipéptido PRO842, o de un complejo polipéptido PRO842-inhibidor, se determina mediante cristalografía de rayos X, mediante modelación por ordenador o, más habitualmente, mediante una combinación de los dos enfoques. Deben comprobarse la forma y las cargas del PRO842 para elucidar la estructura y para determinar el sitio o sitios activos de la molécula. Con menor frecuencia, podría obtenerse la información útil con respecto a la estructura del polipéptido PRO842 mediante la modelación basada en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural pertinente se utiliza para diseñar moléculas análogas de tipo polipéptido PRO842 o para identificar inhibidores eficaces. Entre los ejemplos útiles de diseño racional de fármacos se pueden incluir moléculas que han mejorado la actividad o la estabilidad, tal como se muestra por Braxton y Wells, Biochemistry, 31: 7796-7801 (1992) o que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de péptidos nativos tal y como se muestra por Athauda *et. al.*, J. Biochem., 113: 742-746 (1993).

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

En virtud de la presente invención, se pueden fabricar cantidades suficientes del polipéptido PRO842 para realizar dichos estudios analíticos, tales como en cristalografía de rayos-X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO842 proporcionada en la presente invención proporcionará una guía para los usuarios de técnicas de modelación por ordenador en lugar de o adicionalmente a la cristalografía de rayos-X.

Ejemplo 10

Análisis por "microarray" para detectar la sobreexpresión de polipéptidos PRO842 en tumores cancerosos

Los "microarrays" de ácidos nucleicos, que contienen frecuentemente miles de secuencias de genes, son útiles para identificar genes expresados diferencialmente en tejidos deseados en comparación con sus homólogos normales. Utilizando "microarrays" de ácidos nucleicos, las muestras de ARNm de prueba y control de las muestras de tejido de prueba y control se transcriben de forma inversa y se marcan para generar sondas de ADNc. A continuación, las sondas de ADNc se hibridan a un "array" de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. El "array" se configura se manera que la secuencia y la posición de cada miembro del "array" es conocido. Por ejemplo, se puede disponer en un soporte sólido una selección de genes conocidos por expresarse en ciertos estados de la enfermedad. La hibridación de una sonda marcada con un miembro concreto del "array" indica que la muestra de la que deriva la sonda expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda de una muestra de prueba (tejido enfermo) es mayor que la señal de hibridación de una sonda de una muestra de control (tejido normal), se identifican el gen o genes sobreexpresados en el tejido enfermo. La implicación de este resultado es que una proteína sobreexpresada en un tejido enfermo es útil no sólo como un marcador de diagnóstico para la presencia de la condición de la enfermedad, pero también como una diana terapéutica para el tratamiento de la condición de la enfermedad.

La metodología de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología de microarrays es bien conocida en la técnica. En el presente ejemplo, la preparación específica de ácidos nucleicos para la hibridación y las sondas, portaobjetos y condiciones de hibridación están todas detalladas en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos de No. de Serie 60/193,767 presentada el 31 de marzo del 2000 y que se incorporar en la presente invención por referencia.

En el presente ejemplo, se estudiaron tumores cancerosos derivados de varios tejidos humanos para la expresión de genes que codifican el polipéptido PRO842 en relación con tejido humano no canceroso en un intento por identificar los polipéptidos PRO842 que se sobreexpresan en tumores cancerosos. Se generaron dos grupos de datos experimentales. En un grupo, se obtuvieron tejido canceroso de tumor de colon humano y tejido no canceroso de tumor de colon humano emparejado del mismo paciente ("control de colon emparejado") y se analizaron para la expresión del polipéptido PRO842 utilizando la tecnología de microarray descrita anteriormente. En el segundo grupo de datos, se obtuvo tejido canceroso de tumor humano de cualquier variedad de tumores humanos diferentes y se comparó con una muestra de control epitelial "universal" que se preparó agrupando tejidos humanos no cancerosos de origen epitelial, incluyendo hígado, riñón y pulmón. El ARNm aislado de los tejidos agrupados representa una mezcla de productos génicos expresados de estos tejidos diferentes. Los experimentos de hibridación por microarray utilizando las muestras de control agrupadas generaron una representación lineal en un análisis de dos colores. La pendiente de la línea generada en un análisis de dos colores se utilizó entonces para normalizar las proporciones de detección prueba:control en cada experimento. A continuación, se compararon las proporciones normalizadas de varios experimentos y se utilizaron para identificar agrupaciones de la expresión génica. De este modo, la muestra de "control universal" agrupada no sólo permitió las determinaciones de la expresión génica relativa efectiva en una comparación simple de 2 muestras, también permitió las comparaciones entre múltiples muestras a través de varios experimentos.

En los presentes experimentos, las sondas de ácidos nucleicos derivados de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido PRO842 descrito en la presente invención se utilizaron en la creación del microarray y el ARN de los tejidos tumorales indicados anteriormente se utilizó para la hibridación al mismo. Se designó un valor basado en la proporción normalizada: proporción experimental como una "proporción de corte". Sólo los valores que estaban por encima de esta proporción de corte se determinaron como significativos. La Tabla 7 siguiente muestra los resultados de estos experimentos, demostrando que varios polipéptidos PRO842 de la presente invención se sobreexpresan significativamente en varios tejidos tumorales humanos en comparación con un tejido no canceroso humano de control. Tal y como se ha descrito anteriormente, estos datos demuestran que los polipéptidos PRO842 de la presente invención son útiles no sólo como marcadores diagnósticos para la presencia de uno o más tumores cancerosos, sino también sirve como dianas terapéuticas para el tratamiento de estos tumores.

TABLA 7

Molécula	se sobreexpresa en:	en comparación con:
PRO842	Tumor de colon	Control normal universal
PRO842	Tumor de pulmón	Control normal universal
PRO842	Tumor de mama	Control normal universal

Ejemplo 11

Hibridación in situ

La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para la detección y localización de secuencias de ácidos nucleicos en preparaciones de células o tejido. Puede ser útil, por ejemplo, para identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución en el tejido de la transcripción, identificar y localizar la infección viral, seguir los cambios en la síntesis de ARNm específico y ayudar en el mapeo de los cromosomas.

La hibridación *in situ* se llevó a cabo siguiendo una versión optimizada del protocolo por Lu y Gillett, Cell Vision 1: 169-176 (1994)), utilizando ribosondas marcadas con ^{33}P generadas por PCR. Brevemente, se seccionaron tejidos humanos bañados en parafina y fijados a formalina, se desparafinaron, se desproteinaron en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37ºC, y se procesaron posteriormente para una hibridación *in situ* tal y como se describe por Lu y Gillett, *supra*. Se generó una ribosonda antisentido marcada con [^{33}-P] UTP a partir de un producto de PCR y se hibridó a 55ºC durante toda la noche. Los portaobjetos se sumergieron en una emulsión nuclear Kodak NTB2 y se expuso durante 4 semanas.

Síntesis de ribosondas con ^{33}P

Se secaronn con Speed-Vac 6,0 μl (125 mCi) de ^{33}P-UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mol). A cada tubo que contenía ^{33}P-UTP secado, se añadieron los siguientes ingredientes:

2,0 μl 5x de tampón de transcripción

1,0 μl de DTT (100 mM)

2,0 μl de mezcla de NTP (2,5 mM: 10 μl; cada uno de 10 mM de GTP, CTP y ATP + 10 μl de H_2O)

1,0 μl de UTP (50 μM)

1,0 μl Rnasina

1,0 μl de plantilla de ADN (1 μg)

1,0 μl de H_2O

1,0 μl de ARN polimerasa (para productos de PCR T3 = AS, T7 = S, normalmente).

Los tubos se incubaron a 37ºC durante una hora. Se añadieron 1,0 μl de RQ1 ADNasa, seguido de incubación a 37ºC durante 15 minutos. Se añadieron 90 μl de TE (Tris 10 mM pH 7,6/ 1 mM EDTA pH 8,0), y la mezcla se pipeteó sobre papel DE81. La solución remanente se cargó en una unidad de ultrafiltración MICROCON-50™, y se centrifugó utilizando el programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió sobre un segundo tubo y se centrifugó utilizando el programa 2 (3 minutos). Después del giro final de recuperación, se añadieron 100 μl de TE. A continuación, se pipeteó 1 μl del producto final sobre papel DE81 y se contó en 6 ml de BIOFLUOR II.

La sonda se extiendió sobre un gel de TBE/urea. Se añadieron 1-3 μl de la sonda o 5 μl de ARN MrkII a 3 μl de solución tampón de carga. Después de calentar sobre un bloque de calor a 95ºC durante 3 minutos, el gel se colocó inmediatamente sobre hielo. Los pocillos del gel se nivelaron, se cargó la muestra y se operó a 180-245 voltios durante 45 minutos. El gel se envolvió en un envoltorio de plástico y se expuso a una película XAR con una pantalla intensificadora en un congelador a -70ºC desde una hora hasta toda la noche.

Hibridación de ^{33}-P

A. *Pretratamiento de las secciones congeladas*

Los portaobjetos se extrajeron del congelador, se colocaron sobre bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocaron en una incubadora a 55ºC durante cinco minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% sobre hielo en la campana de extracción, y se lavaron en 0,5 x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente (25 ml 20 x SSC + 975 ml SQ H_2O). Después de la desproteinación en 0,5 μg/ml de proteinasa K durante 10 minutos a 37ºC (12,5 μl de 10 mg/ml de reserva en 250 ml de tampón de ARNasa sin ARNasa precalentado), las secciones se lavaron en 0,5 x SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en etanol al 70%, 95%, 100% durante 2 minutos cada una.

B. *Pretratamiento de las secciones bañadas en parafina*

Los portaobjetos se desparafinaron, se colocaron en SQ H_2O, y se enjuagaron dos veces en 2 x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos casa vez. Las secciones se desproteinaron en 20 μg/ml de proteinasa K (500 μl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa sin ARNasa; 37ºC, 15 minutos) para tejido de embrión humano, u 8 x proteinasa K (100 μl en 250 ml de tampón de ARNasa, 37ºC, 30 minutos) para tejidos en formalina. El posterior enjuague en 0,5 x SSC y deshidratación se llevaron a cabo tal y como se ha descrito anteriormente.

C. *Prehibridación*

Los portaobjetos se dispusieron en una caja de plástico recubierta por papel de filtro saturado con tampón de Caja (4 x SSC, formamida al 50%). El tejido se recubrió con 50 μl de tampón de hibridación (3,75 g de sulfato de dextrano + 6 ml de SQ H_2O), se centrifugó y se calentó en el microondas durante 2 minutos con la tapa aflojada. Después de enfriar sobre hielo, se añadieron 18,75 ml de formamida, 3,75 ml de 20 x SSC y 9 ml de SQ H_2O, y el tejido se centrifugó bien y se incubó a 42ºC durante 1-4 horas.

D. *Hibridación*

Se calentaron a 95ºC durante 3 minutos 1,0 x 10^6 cpm de sonda y 1,0 μl de ARNt (50 mg/ml reserva) por portaobjetos. Los portaobjetos se enfriaron sobre hielo, y se añadieron 48 μl de tampón de hibridación por portaobjeto. Después de centrifugar, se añadieron 50 μl de una mezcla de ^{33}P a 50 μl de prehibridación en el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante toda la noche a 55ºC.

E. *Lavados*

El lavado se realiza durante 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA 0,25 M, V_f=4 L), seguido de un tratamiento con ARNasaA a 37ºC durante 30 minutos (500 μl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa = 20 μg/ml). Los portaobjetos se lavaron 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de lavado de astringencia fueron las siguientes: 2 horas a 55ºC, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V_f=4 L).

F. *Oligonucleótidos*

Se realizó un análisis *in situ* sobre DNA59294-1381 descrito en la presente invención. Los oligonucleótidos empleados para este análisis se derivaron de las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención y varían generalmente desde aproximadamente 40 a 55 nucleótidos de longitud.

G. *Resultados*

Se realizó un análisis *in situ* sobre DNA59294-1381 descrito en la presente invención. Los resultados de este análisis son tal como se indica a continuación.

Expresión de DNA56855 en la imagen de tejido: pulmón y ovarios adultos inflamados

Las secciones muestran una señal intensa asociada con el epitelio bronquial en pulmones adultos normales e inflamados, incluyendo bloques de asma y neumonitis intersticial. El multibloque de tumor pulmonar tiene una señal intensa sobre las células epiteliales que cubren las estructuras glandulares que comprenden el neoplasma. El pulmón fetal mostró resultados negativos. En una sección de ovario, el epitelio tubal adyacente al estroma ovárico es positivo.

Ejemplo 12

Análisis por filamentos ("threading") de PRO842 (CK27) sugiere homología estructural con la interleuquina-8

Los métodos por filamentos han demostrado una sensbilidad elevada en la predicción de la estructura de secuencias nuevas. Estas técnicas son capaces de detectar si una secuencia de proteínas se parece a estructuras conocidas sin depender de la comparación de las secuencias, siendo capaz de este modo de identificar las relaciones entre proteínas incluso si la similitud de secuencias entre ellas es baja. El presente estudio demostró que las técnicas de filamentos pueden detectar una similitud de secuencias más baja que los métodos de similitud de secuencias estándar, en particular para una quimioquina nueva PRO842 (designada como CK27) codificada por DNA56855-1447.

Se utilizó el programa de reconocimiento de pliegues ProCeryon para este análisis (ProCeryon Biosciences, Inc.). La biblioteca de pliegues utilizada consistía en 4.749 estructuras 3D conocidas filtradas en una identidad de secuencia al 95% del Banco de Datos de Proteínas. Se utilizaron dos potenciales de fuerza promedio que describen las fuerzas energéticas entre los residuos de un pliegue y las fuerzas energéticas entre los residuos del pliegue y el disolvente circundante para calcular el ajuste secuencia-estructura (Domingues *et al*., Proteins, 37: 112-120 (1999); Sippl, M. J., J. Comput Aided Mol. Des., 7: 473-501 (1993); y Sippl., M. J. Curr Opin Struct Biol, 5: 229-235 (1995)). Se utilizaron restricciones de espacios para controlar el número, tamaño y situación de las deleciones e inserciones en la secuencia en cuestión y las entradas de las bibliotecas de pliegues: pliegue y penalización de deleción de secuencia, 300; pliegue y penalización de secuencia, 15; y pliegue y longitud de espacio máximo de secuencia, 30. La información del pliegue se utilizó como limitantes de espacios: los espacios no se dejaron colocar en elementos de la estructura secundaria y en en núcleo del pliegue. Un espacio entre residuos adyacentes en la secuencia sólo era aceptada si la distancia entre ellos en la estructura es inferior a 7 Å. Para suprimir la fragmentación en la alineación de secuencia-estructura, se utilizó un tamaño de fragmento mínimo de 3 residuos entre dos espacios adyacentes. Se utilizó la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM40 para la comparación de secuencias y la valoración (Henrikoff, S. y Henrikoff., J. G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 10915-10919 (1995)).

Se utilizó una combinación de cuatro estrategias de valoración diferentes para la valoración y clasificación final: i) una valoración combinada de energía derivada de interacciones residuo-residuo y residuo-disolvente (*pair/ surf*); ii) una valoración de similitud de secuencias (*seq*); iii) una combinación normalizada de ambos, pair/surf y seq (índice de filamentos; *Th Idx.)*; y iv) la proporción entre la longitud del pliegue (*foldlength*) y el número de residuos alineados que toman parte en la alineación de secuencia-estructura (*pathtlength*).

Los modelos 3D generados para picos de valoración elevados y sus alineaciones secuencia-estructura respectivas se analizaron gráficamente mediante la utilización del módulo Peep en ProCeryon (ProCeryon Biosciences, Inc.). Se utilizaron esquemas de clasificación estructural SCOP (Murzin *et al*., J. Mol. Biol., 247: 536-540 (1995)) y CATH (Orengo *et al*., Structure, 5: 1093-1108 (1997)) para encontrar todos los miembros de un pliegue y buscar la valoración de éstos en la salida ProFit. Se comprobaron estructuras similares de un pliegue en los picos máximos de clasificación con el fin de confirmar una anotación de pliegue y para generar la hipótesis de la función de la proteína basada en la estructura.

Utilizando el análisis de filamentos descrito anteriormente, el PRO842 (CK27) codificado por DNA56855-1447 sugirió una homología estructural con la quimioquina interleuquina-8 (IL-8). La identidad de la secuencia de aminoácidos entre las dos proteínas es baja, aunque ambos tienen un motivo CXC que clasifica IL-8 como miembro de la familia de quimioquinas de CXC.

Ejemplo 13

La citoquina nueva PRO842 (CK27) juega un papel en la respuesta inflamatoria

A. *Patrones de expresión de DNA56855 (CK27)*

El patrón de expresión de CK27 se investigó en múltiples tejidos humanos y ratones. Las figuras 3 y 4 muestran el patrón de expresión de CK27 demostrado mediante la hibridación a un "array" de expresión de múltiples tejidos humanos. La CK27 se expresó de manera elevada en pulmón, estómago y la tráquea. En el ovario, próstata, colon y pulmón fetal se detectó una expresión débil de CK27. Un análisis *in situ* confirmó una expresión elevada de CK27 en pulmón normal y mostró expresión en muestras de tejido de pacientes con los pulmones inflamados y asma. El patrón de expresión de DNA56855 murino (CK27) se muestra en la figura 5. En el ratón, se observaron niveles significativos de expresión en el pulmón, la tiroides, glándula submaxilar y el útero.

B. *PRO842 atrae químicamente monocitos y células dendríticas*

(1) *Métodos*

El análisis de filamentos de PRO842 (designado en la presente invención como CK27) sugirió un papel funcional de esta nueva quimioquina similar a IL-8. La interleuquina-8 se ha caracterizado desde hace tiempo como una citoquina proinflamatoria y un atractor químico para neutrófilos. Por consiguiente, se realizaron los ensayos de migración "transwell" para demostrar el papel de PRO842 (CK27) como una quimioquina potencial. Se aislaron células mono-

nucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre humana periférica mediante centrifugación por densidad Hypaque-Ficoll. La migración de PMBC hacia PRO842 (CK27) se ensayó en placas de migración Transwell de 24 pocillos que contienen filtros con poros de 5 μm. Se utilizaron 10^6 PBMC por pocillo. Después de una incubación a 37ºC durante 2,5 horas y 5% de CO_2, se analizaron el número de células y las poblaciones celulares migradas mediante citometría de flujo.

Es interesante indicar que el análisis de filamentos de PRO842 (CK27) demostró la posesión de un motivo CXC, sugiriendo que CK27 pertenece a la familia de las quimioquinas CXC (ver Ejemplo 13). También se encontró homología estructural con DNA39523, que se ha publicado como una quimioquina nueva (denominada MIP2-γ) que también atrae células dendríticas (Cao *et al*., Journal of Immunology 165: 2588-2595 (2000). Además de la quimioquina PRO842 (CK27) identificada en la presente invención, la MIP2-γ y otra quimioquina relacionada conocida como SDF-α son las únicas quimioquinas que atraen células dendríticas.

(2) *Resultados*

Tal y como se ha descrito anteriormente, el análisis de filamentos de CK27 provocó la investigación de las propiedades de atracción química de PRO842 (CK27). Los resultados de los ensayos de migración "transwell" se muestras en las figuras 6 a 8. Estos estudios demuestran que PRO842 (CK27) atraen químicamente de forma específica monocitos y células dendríticas (ver figura 6). Diferentes grupos de CK27 muestran una actividad de atracción química similar (figura 7). El tratamiento térmico reduce la atracción química de CD11c* (células dendríticas) y $CD14^+$ (monocitos) (figura 8). Estos datos muestran que CK27 atrae específicamente monocitos y células dendríticas. Sin embargo, no se observó una atracción similar de células T, células B o neutrófilos. Ambos tipos de células (monocitos y células dendríticas) juegan un papel importante en la iniciación de una respuesta inmune. Los monocitos y las células dendríticas tienen la capacidad de fagocitar antígenos, presentando antígenos en su superficie celular y activando células T mediante interacciones directas célula-célula y secreción de citoquinas. Los presentes estudios demuestran que la nueva quimioquina PRO842 (CK27) identificada en la presente invención juega un papel importante en el tráfico de leucocitos y también puede funcionar en la regulación de respuestas inflamatorias. Además, CK27 puede jugar un papel similar a la interleuquina-8 en una serie de procesos homeostáticos y de enfermedades, incluyendo el desarrollo, hematopoyesis, alergias, angiogénesis y oncogénesis. Tal y como se describe a continuación, los estudios que implican ratones transgénicos con DNA56855 humano sugieren que CK27 juega un papel importante en el desarrollo de la patología quística de ovario.

C. *El modelo de ratón transgénico con DNA56855 (CK27) desarrolla ovarios quísticos*

Se unió en 3' el ADNc de 56855 humano al sitio "splice" dador/aceptor de pRK que estaba precedido por la cadena ligera de miosina utilizando el protocolo descrito por Shani, M., Nature, 314: 283-286 (1985).Al ADNc de 56855 también le siguió sitios "splice" dadores/aceptores presentes entre el cuarto y el quinto exón del gen de la hormona del crecimiento humano (Stewart, T. A. *et al*., Endocrinology, 130: 405-14 (1992))- El fragmento de expresión completa se purificó libre de secuencias de vector contaminante y se inyectó en óvulos de ratón de una célula derivados apareamientos FVB x FVB. Los ratones transgénicos CK27 se identificaron mediante análisis por PCR del ADN extraído de biopsias de cola. La expresión se determinó mediante RT-PCR a tiempo real (TaqMan®; Perkin Elmer) sobre el ARN total de biopsias de músculo esquelético.

Los ratones que expresaban DNA56855 (CK27) humano como un transgén bajo el control del promotor MLCH desarrollaron ovarios quísticos a las 12 semanas de edad (ver la figura 9). Aunque el análisis *in situ* mostró una expresión relativamente específica en el epitelio bronquial del pulmón (ver Ejemplo 12), los ratones transgénicos CK27 tenían pulmones histológicamente normales. Además, se ha observado *in situ* la expresión en epitelio tubular adyacente al ovario (tejido humano), que puede ser relevante para los cambios observados en ratones transgénicos CK27.

Depósito de material

Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Material	ATCC Dep. No	Fecha del depósito
DNA56855-144	203004	23 de junio de 1998

Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea

primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alquien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFER § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

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

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

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante se muestra únicamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de Patente Europea. Aunque se ha tenido una gran precaución a la hora de recopilar las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la Oficina Europea de Patentes declina cualquier responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5536637 A [0006]
- EP 404097 A [0106]
- WO 9311161 A [0106]
- US 4275149 A [0110]
- US 4675187 A [0121]
- US 5364934 A [0128]
- WO 8705330 A [0140]
- US 4640835 A [0142]
- US 4496689 A [0142]
- US 4301144 A [0142]
- US 4670417 A [0142]
- US 4791192 A [0142]
- US 4179337 A [0142]
- US 5428130 A [0145]
- WO 9410308 A [0146]
- WO 8905859 A [0154]
- US 4399216 A [0154]
- DD 266710 [0155]
- US 4946783 A [0155]
- EP 139383 A [0156]
- US 4943529 A [0156]

- EP 402226 A [0156]
- EP 183070 A [0156]
- EP 244234 A [0156]
- EP 394538 A [0156]
- WO 9100357 A [0156]
- US 5010182 A [0159]
- EP 362179 A [0159]
- WO 9013646 A [0159]
- EP 36776 A [0163]
- EP 73657 A [0165]
- GB 2211504 A [0166]
- EP 117060 A [0169]
- EP 117058 A [0169]
- WO 9106629 A [0178]
- WO 9010048 A [0179]
- WO 9013641 A [0180]
- WO 9104753 A [0181]
- WO 9010448 A [0182]
- US 4736866 A [0187] [0245]
- US 4870009 A [0187]
- US 4657760 A [0199]
- US 5206344 A [0199]
- US 5225212 A [0199]
- WO 9703692 A [0200]
- WO 9640072 A [0200]
- WO 9607399 A [0200]
- US 5654010 A [0200]
- WO 9733551 A [0214] [0215] [0257] [0258]
- US 4376110 A [0224]
- US 4873191 A [0245]
- US 4816567 A [0268] [0268] [0272]
- US 5545807 A [0273]
- US 5545806 A [0273]
- US 5569825 A [0273]

- US 5625126 A [0273]
- US 5633425 A [0273]
- US 5661016 A [0273]
- WO 9308829 A [0276]
- WO 9627011 A [0278]
- US 4676980 A [0284] [0284]
- WO 9100360 A [0284]
- WO 92200373 A [0284]
- EP 03089 A [0284]
- WO 9411026 A [0288]
- US 4485045 A [0290]
- US 4544545 A [0290]
- US 5013556 A [0290]
- US 3773919 A [0302]
- EP 616812 A [0328]
- EP 307247 A [0352]
- US 5122469 A [0362]
- WO 8403564 A [0388]
- US 193767 P [0395]
- US 0148060 W [0426]
- US 0106520 W [0426]
- US 09941992 B [0426]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- **KLEIN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci*., 1996, vol. 93, 108-7113 [0006]
- **MUKAIDA**, N. *International Journal of Hematology*, 2000, vol. 72 (4), 391-398 [0012]
- **ATTA-UR-RAHMAN** *et al. Current Pharmaceutical Design*, 1999, vol. 5 (4), 241-253 [0012]
- **XU**, L.; **FIDLER**, I. *J. Oncology Research*, 2000, vol. 12 (2), 97-106 [0012]
- **KURDOWSKA**, A. *et al. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 2001, vol. 163 (2), 463-468 [0012]
- **BROXMEYER**, H. E. *et al. J. Exp. Med*., 1989, vol. 170, 1583 [0013]
- **CAO**, Y. *et al. J. Exp. Med*., 1995, vol. 182, 2069 [0013]
- **STRIETER**, R. M. *et al. J. Biol. Chem*., 1995, vol. 270, 27348 [0013]
- **WANG**, J. M. *et al. J. Immunol. Methods*, 1998, vol. 220, 1-17 [0013]
- **BAGGIOLINI**, M. *Annu. Rev. Immunol*., 1997, vol. 15, 675-705 [0013]
- **GALE**, L. M.; **MCCOLL**, S. R. *Bioessays*, 1999, vol. 21, 17-28 [0013]

- **COCCHI**, F. *et al. Science*, 1995, vol. 270, 1811 [0013]
- **BAZAN**, J. F. *et al. Nature*, 1997, vol. 385, 640 [0014]
- **PAN**, Y. *et al. Nature*, 1997, vol. 387, 611 [0014]
- **KELNER**, G. S. *et al. Science*, 1994, vol. 266, 1395 [0014]
- **KENNEDY**, J. G. *et al. J. Immunol*., 1995, vol. 155, 203 [0014]
- **BANCHEREAU**, J.; **STEINMAN**, R. M. *Nature*, 1998, vol. 392, 245 [0015]
- Immunology. W.H. Freeman and Company publishers, 1994, 363-364 [0016]
- **NIELSEN** *et al. Prot. Eng*., 1997, vol. 10, 1-6 [0068]
- VON **HEINJE** *et al. Nucl. Acids. Res*., 1986, vol. 14, 4683-4690 [0068]
- **ALTSCHUL** *et al. Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0072] [0079]
- **ALTSCHUL** *et al. Nucleic Acids Res*., 1997, vol. 25, 3389-3402 [0073] [0080]
- **AUSUBEL** *et al. Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience Publishers, 1995 [0088]
- **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0090]
- **ZAPATA** *et al. Protein Eng*., 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0099]
- **PLUCKTHUN**. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. Springer-Verlag, 1994, vol. 113, 269-315 [0105]
- **HOLLINGER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0106]
- Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs. **MURAKAMI** *et al. The Molecular Basis of Cancer*. 1995, 13 [0122]
- **CARTER** *et al. Nucl. Acids Res*., 1986, vol. 13, 4331 [0134]
- **ZOLLER** *et al. Nucl. Acids Res*., 1987, vol. 10, 6487 [0134]
- **WELLS** *et al. Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0134]
- **WELLS** *et al*. Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 1986, vol. 317, 415 [0134]
- **CUNNINGHAM; WELLS**. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0135]
- **CREIGHTON**. *The Proteins*. W.H. Freeman & Co, [0135]
- **CHOTHIA**. J. *Mol. Biol*., 1976, vol. 150, 1 [0135]
- T.E. **CREIGHTON**. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W.H. Freeman & Co, 1983, 79-86 [0137]
- **APLIN; WRISTON**. CRC *Crit, Rev. Biochem*., 1981, 259-306 [0140]
- **HAKIMUDDIN** *et al. Arch. Biochem, Biophys*., 1987, vol. 259, 52 [0141]
- **EDGE** *et al. Anal. Biochem*., 1981, vol. 118, 131 [0141]
- **THOTAKURA** *et al. Meth, Enzymol*., 1987, vol. 138, 350 [0141]
- **FIELD** *et al. Mol. Cell Biol*., 1988, vol. 8, 2159-2165 [0144]
- **EVAN** *et al. Molecular and Cellular Biology*., 1985, vol. 5, 3610-3616 [0144]
- **PABORSKY** *et al. Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0144]
- **HOPP** *et al. BioTechnology*, 1998, vol. 6, 1204-1210 [0144]
- **MARTIN** *et al. Science*, 1992, vol. 255, 192-194 [0144]

- **SKINNER** *et al. J. Biol. Chem*., 1991, vol. 266, 15163-15166 [0144]
- **LUTZ-FREYERMUTH** *et al. Proc, Natl. Acad. Sci, USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0144]
- **LANDSCHULZ** *et al. Science*, 1988, vol. 240, 1759 [0146]
- **HOPPE** *et al. FEES Letters*, 1994, vol. 344, 1991 [0146]
- **MANIATIS** *et al. Nature* [0146]
- **STEWART** *et al. Solid-Phase Peptide Synthesis*. W.H. Freeman Co, 1969 [0147]
- **MERRIFIELD**. *J. Am. Chem. Soc*., 1963, vol. 85, 2149-2154 [0147]
- **SAMBROOK** et al. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0149]
- **DIEFFENBACH** *et al*. PCR Primer: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1995 [0149]
- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. *IRL Press*, 1991 [0153]
- **SHAW** *et al. Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0154]
- Virology, 1978, vol. 52, 456-457 [0154]
- VAN **SOLINGEN** *et al. J. Bact*., 1977, vol. 130, 946 [0154]
- **HSIAO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci*. (USA), 1979, vol. 76, 3829 [0154]
- **KEOWN** *et al. Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0154]
- **MANSOUR** *et al. Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0154]
- **BEACH; NURSE**. *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0156]
- **FLEER** *et al. Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0156]
- **LOUVENCOURT** *et al. J. Bacteriol*., 1983, vol. 154 (2), 737-742 [0156]
- VAN **DEN BERG** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0156]
- **SREEKRISHNA** *et al. J. Basic Microbiol*., 1988, vol. 28, 265-278 [0156]
- **CASE** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0156]
- **BALLANCE** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun*., 1983, vol. 112, 284-289 [0156]
- **TILBURN** *et al. Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0156]
- **YELTON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0156]
- **KELLY; HYNES**. *EMBO J*., 1985, vol. 4, 475-479 [0156]
- C. **ANTHONY**. *The Biochemistry of Methylotrophs*, 1982, vol. 269 [0156]
- **GRAHAM** *et al. J. Gen Virol*., 1977, vol. 36, 59 [0157]
- **URLAUB; CHASIN**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0157]
- **MATHER**. *Biol. Reprod*., 1980, vol. 23, 243-251 [0157]
- **URLAUB** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1980, vol. 77, 4216 [0162]
- **STINCHCOMB** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0162]
- **KINGSMAN** *et al. Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0162]
- **TSCHEMPER** *et al. Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0162]

- **JONES**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0162]
- **CHANG** *et al. Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0163]
- **GOEDDEL** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0163]
- **GOEDDEL**. *Nucleic Acids Res*., 1980, vol. 8, 4057 [0163]
- **DEBOER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1983, vol. 80, 21-25 [0163]
- **HITZEMAN** *et al. J. Biol. Chem*., 1980, vol. 255, 2073 [0164]
- **HESS** *et al. J. Adv. Enzyme Reg*., 1968, vol. 7, 149 [0164]
- **HOLLAND**. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0164]
- **GETHING** *et al. Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0169]
- **MANTEI** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0169]
- **THOMAS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0170] [0219]
- *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 182 [0173]
- **SCOPES**. Protein Purification: Principles and Practice. *Springer-Verlag*, 1982 [0173]
- **STEIN; COHEN**. *Cancer Res*., 1988, vol. 48, 2659 [0177]
- **KROL** *et al. BioTechniques*, 1988, vol. 6, 958 [0177]
- **THOMAS; CAPECCHI**. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0188]
- **LI** *et al. Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0188] [0249]
- **BRADLEY**. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, 1987, 113-152 [0188]
- **ZAMECNIK** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1986, vol. 83, 4143-4146 [0189]
- **DZAU** *et al. Trends in Biotechnology*, 1993, vol. 11, 205-210 [0190]
- **WU** *et al. J. Biol. Chem*., 1987, vol. 262, 4429-4432 [0190]
- **WAGNER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 3410-3414 [0190]
- **ANDERSON** *et al. Science*, 1992, vol. 256, 808-813 [0190]
- Remington's Pharmaceutical Sciences. 1980 [0194]
- The use of interspecies scaling in toxicokinetics. **MORDENTI**, J.; **CHAPPELL**, W. *et al*. Toxicokinetics and New Drug Development. *Pergamon Press*, 1989, 42-96 [0198]
- **JOHNSON** *et al. Nat. Med*., 1996, vol. 2, 795-799 [0200]
- **YASUDA**. *Biomed. Ther*., 1993, vol. 27, 1221-1223 [0200]
- **HORA** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 755-758 [0200]
- Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems. **CLELAND**. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach. *Plenum Press*, 1995, 439-462 [0200]
- Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. **LEWIS**. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. *Marcel Dekker*, 1990, 1-41 [0201]
- **FIELDS**; SONG. *Nature*, 1989, vol. 340, 245-246 [0206] [0253]
- **CHIEN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 9578-9582 [0206]
- **CHEVRAY; NATHANS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1991, vol. 89, 5789-5793 [0206] [0253]

- **LEE** *et al. Nucl. Acids Res*., 1979, vol. 6, 3073 [0212]
- **COONEY** *et al. Science*, 1988, vol. 241, 456 [0212]
- **DERVAN** *et al. Science*, 1991, vol. 251, 1360 [0212]
- **OKANO**. *Neurochem*., 1991, vol. 56, 560 [0212]
- Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression. *CRC Press*, 1988 [0212]
- **ROSSI**. *Current Biology*, 1994, vol. 4, 469-471 [0214] [0257]
- **ZOLA**. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. *CRC Press, Inc*, 1987, 147-158 [0222] [0292]
- **SMALL** *et al. Mol, Cell. Biol*., 1985, vol. 5, 642-648 [0227]
- Current Protocols in Immunology. *John Wiley & Sons, Inc* [0228]
- **CHAMBERS**. C. A.; **ALLISON**, J. P. *Curr. Opin-Immunol*., 1997, vol. 9, 396 [0229]
- **SCHWARTZ**, R. H. *Cell*, 1992, vol. 71, 1065 [0229]
- **LINSLEY**, P. S.; **LEDBETTER**, J. A. *Annu. Rev. Immunol*., 1993, vol. 11, 191 [0229]
- **JUNE**, C. H. *et al. Immunol. Today*, 1994, vol. 15, 321 [0229]
- **JENKINS**, M. K. *Immunity*, 1994, vol. 1, 405 [0229]
- **ALDERSON**, M. E. *et al. J. Immunol*., 1994, vol. 24, 2219 [0231]
- **HELLSTROM**, I.; **HELLSTROM**, K. B. *Crit. Rev. Immunol*., 1998, vol. 18, 1 [0232]
- **WALUNAS**. T. L. *et al. Immunity*, 1994, vol. 1, 405 [0232]
- **AUCHINCLOSS**, H. JR.; **SACHS**, D. H. Fundamental Immunology. *Raven Press*, 1989, 889-992 [0238]
- **TANABE**, M. *et al. Transplantation*, 1994, vol. 58, 23 [0238]
- **TINUBU**, S. A. *et al. J. Immunol*., 1994, 4330-4338 [0238]
- **BOLTON**, C. *Multiple Sclerosis*., 1995, vol. 1, 143 [0240]
- **DUNCAN**, I. D. *et al. Molec. Med. Today*., 1997, 554-561 [0240]
- Current Protocols in Immunology. *John Wiley & Sons, Inc*, 1994 [0241]
- **GRABBE**, S.; **SCHWARZ**, T. *Immun. Today*, 1998, vol. 19 ((1)), 37-44 [0241]
- **ISSEKUTZ**, A.C. *et al. Immunology*, 1996, vol. 88, 569 [0242]
- **WOLYNIEC**, W. W. *et al. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*., 1998, vol. 18, 777 [0243]
- **SCHON**, M. P. *et al. Nat. Med*., 1997, vol. 3, 183 [0244]
- **NICKOLOFF**, B. J. *et al. Am. J. Path*., 1995, vol. 146, 580 [0244]
- VAN DER **PUTTEN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 6148-615 [0245]
- **THOMPSON** *et al. Cell*, 1989, vol. 56, 313-321 [0245]
- **LO**. *Mol. Cel. Biol*., 1983, vol. 3, 1803-1814 [0245]
- **LAVITRANO** *et al. Cell*, 1989, vol. 57, 717-73 [0245]
- **LASKO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1992, vol. 89, 6232-636 [0246]
- **BRADLEY**. Teratocarcinomas and Embryonic Stern Cells: A Practical Approach. *IRL*, 1987, 113-152 [0249]

- **DESMET**, C. *et al. Proc. Natl. Acad, Sci. USA*, 1996, vol. 93, 7149 [0250]
- **MELERO**, I. *et al. Nature Medecine*, 1997, vol. 3, 682 [0250]
- **KWON**, E. D. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, vol. 94, 8099 [0250]
- **LYNCH**, D. H. *et al. Nature Medicine*, 1997, vol. 3, 625 [0250]
- **FINN**, O. J.; **LOTZE**, M. T. *J. Immumol*., 1998, vol. 21, 114 [0250]
- **CHIEN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1991, vol. 88, 9578-9582 [0253]
- **GODING**. Monoclonal Antibodies: Principales and Practice. *Academic Press*, 1986, 59-103 [0263]
- **KOZBOR**. *J. Immunol*., 1984, vol. 133, 3001 [0264]
- **BRODEUR** *et al. Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 1987, 51-63 [0264]
- **MUNSON; POLLARD**. *Anal. Biochem*., 1980, vol. 107, 220 [0265]
- **JONES** *et al. Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0271] [0272]
- **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-329 [0271]
- **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol*., 1992, vol. 2, 593-596 [0271]
- **RIECHMANN** *et al. Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0272]
- **VERHOEYEN** *et al. Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0272]
- **HOOGENBOOM; WINTER**. *J. Mol. Biol*., 1991, vol. 227, 381 [0273]
- **MARKS** *et al. J. Mol. Biol*., 1991, vol. 222, 581 [0273]
- **COLE** *et al*. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 1985, 77 [0273]
- **BOERNER** *et al. J. Immunol*., 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0273]
- **MARKS** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 779-783 [0273]
- **LONBERG** *et al. Nature*, 1994, vol. 368, 856-859 [0273]
- **MORRISON**. *Nature*, 1994, vol. 368, 812-13 [0273]
- **FISHWILD** *et al. Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 845-51 [0273]
- **NEUBERGER**. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 826 [0273]
- **LONBERG; HUSZAR**. *Intern. Rev. Immunol*., 1995, vol. 13, 65-93 [0273]
- **MILSTEIN; CUELLO**. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0276]
- **TRAUNECKER** *et al. EMBO J*., 1991, vol. 10, 3655-3659 [0276]
- **SURESH** *et al. Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0277]
- **BRENNAN** *et al. Science*, 1985, vol. 229, 81 [0279]
- **SHALABY** *et al. J. Exp. Med*., 1992, vol. 175, 217-225 [0280]
- **KOSTELNY** *et al. J. Immunol*., 1992, vol. 148 (5), 1547-1553 [0281]
- **HOLLINGER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*., 1993, vol. 90, 6444-6448 [0281]
- **GRUBER** *et al. J. Immunol*., 1994, vol. 152, 5368 [0281]
- **TUTT** *et al. J. Immunol*., 1991, vol. 147, 60 [0282]

- **CARON** *et al. J. Exp Med*., 1992, vol. 176, 1191-1195 [0285]
- **SHOPES**. *J. Immunol*., 1992, vol. 148, 2918-2922 [0285]
- **WOLFF** *et al. Cancer Research*, 1993, vol. 53, 2560-2565 [0285]
- **STEVENSON** *et al. Anti-Cancer Drug Design*, 1989, vol. 3, 219-230 [0285]
- **VITETTA** *et al Science*, 1987, vol. 23, 1098 [0288]
- **EPSTEIN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 3688 [0290]
- **HWANG** *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4030 [0290]
- **MARTIN** *et al. J. Biol. Chem*., 1982, vol. 257, 286-288 [0291]
- **GABIZON** *et al. J. National Cancer Inst*., 1989, vol. 81 (19), 1484 [0291]
- **HUNTER** *et al. Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0292]
- **DAVID** *et al. Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014 [0292]
- **PAIN** *et al. J. Immunol. Meth*., 1981, vol. 40, 219 [0292]
- **NYGREN**. *J. Histochem. and Cytochem*, 1982, vol. 30, 407 [0292]
- **MARASCO** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 7889-7893 [0298]
- **ALTSHUL** *et al. Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0337]
- **BOLIVAR** *et al. Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0342]
- **THIMMAPPAYA** *et al. Cell*, 1982, vol. 31, 543 [0353]
- **SOMPARYRAC** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci*., 1981, vol. 12, 7575 [0355]
- **AUSUBEL** *et al*. Current Protocols of Molecular Biology. *John Wiley and Sons*, 1997 [0360]
- **LUCAS** *et al. Nucl. Acids Res*., 1996, vol. 24 (9), 1774-1779 [0360]
- **O'REILLEY** *et al*. Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual. *Oxford University Press*, 1994
- **RUPERT** *et al. Nature*, 1993, vol. 362, 175-179 [0373]
- **BRAXTON; WELLS**. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 7796-7801 [0391]
- **ATHAUDA** *et al. J. Biochem*., 1993, vol. 113, 742-746 [0391]
- **LU; GILLETT**. *Cell Vision*, 1994, vol. 1, 169-176 [0399]
- **DOMINGUES** *et al. Proteins*, 1999, vol. 37, 112-120 [0412]
- **SIPPL**, M. J. *J. Comput Aided Mol. Des*, 1993, vol. 7, 473-501 [0412]
- **SIPPL**, M. J. *Curr Opin Struct Biol*, 1995, vol. 5, 229-235 [0412]
- **HENRIKOFF**, S.; **HENRIKOFF**, J. G. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1995, vol. 89, 10915-10919 [0412]
- **MURZIN** *et al. J. Mol. Biol*., 1995, vol. 247, 536-540 [0414]
- **ORENGO** *et al. Structure*, 1997, vol. 5, 1093-1108 [0414]
- **CAO** *et al. Journal of Immunology*, 2000, vol. 165, 2588-2595 [0418]
- **SHANI**, M. *Nature*, 1985, vol. 314, 283-286 [0420]
- **STEWART**, T. A. *et al. Endocrinology*, 1992, vol. 130, 405-14 [0420]

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo antagonista aislado que se une específicamente a un polipéptido PRO842 que comprende:

(i) la secuencia de aminoácidos del polipéptido mostrado en la figura 2 (SEC ID No: 2);

(ii) la secuencia de aminoácidos del polipéptido mostrado en la figura 2 (SEC ID No: 2), que carece se su péptido señal asociado;

(iii) la secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2 (SEC ID No: 2), con su péptido señal asociado;

(iv) la secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado en la figura 2 (SEC ID No: 2), que carece de su péptido señal asociado; o

(v) la secuencia de aminoácidos codificada por el ADNc de proteína humana depositado con la ATCC bajo el número de acceso de la ATCC 203004;

e inhibe la migración de monocitos y células dendríticas hacia el polipéptido PRO842 en un ensayo de migración "transwell".

2. Anticuerpo según la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena única.

3. Anticuerpo según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal tiene residuos de una región determinante de complementariedad no humana (CDR) y residuos de una región armazón (FR) humana.

4. Composición que comprende el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 combinado con un portador.

5. Composición según la reivindicación 4, en la que el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

6. Procedimiento de identificación de un compuesto que inhibe la actividad de un polipéptido PRO842 según se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento (i) poner en contacto las células y un compuesto de prueba a cribar en presencia de un polipéptido PRO842 bajo condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular inducida normalmente por un polipéptido PRO842; y (ii) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si dicho compuesto de prueba es un antagonista eficaz, donde la respuesta celular es la migración de monocitos y células dendríticas hacia el polipéptido PRO842 en un ensayo de migración "transwell".

7. Procedimiento de identificación de un compuesto que que es un agonista de un polipéptido PRO842 según se define en la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento (a) poner en contacto las células y un compuesto de prueba a cribar bajo condiciones adecuadas para la inducción de una respuesta celular inducida normalmente por un polipéptido PRO842; y (ii) determinar la inducción de dicha respuesta celular para determinar si el compuesto de prueba es un agonista eficaz, donde la inducción de dicha respuesta celular es indicativa de que dicho compuesto de prueba es un agonista eficaz, donde la respuesta celular es la migración de monocitos y células dendríticas hacia el polipéptido PRO842 en un ensayo de migración "transwell".

8. Procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, en el que el antagonista o agonista es un anticuerpo antagonista o agonista.

FIGURA 1

CTCGCCCTCAAATGGGAACGCTGGCCTGGGACTAAAGCATAGACCACCAGGCTGAGTATCCT
GACCTGAGTCATCCCCAGGGATCAGGAGCCTCCAGCAGGGAACCTTCCATTATATTCTTCAA
GCAACTTACAGCTGCACCGACAGTTGCGATGAAAGTTCTAATCTCTTCCCTCCTCCTGTTGC
TGCCACTAATGCTGATGTCCATGGTCTCTAGCAGCCTGAATCCAGGGGTCGCCAGAGGCCAC
AGGGACCGAGGCCAGGCTTCTAGGAGATGGCTCCAGGAAGGCGGCCAAGAATGTGAGTGCAA
AGATTGGTTCCTGAGAGCCCCGAGAAGAAAATTCATGACAGTGTCTGGGCTGCCAAAGAAGC
AGTGCCCCTGTGATCATTTCAAGGGCAATGTGAAGAAAACAAGACACCAAAGGCACCACAGA
AAGCCAAACAAGCATTCCAGAGCCTGCCAGCAATTTCTCAAACAATGTCAGCTAAGAAGCTT
TGCTCTGCCTTTGTAGGAGCTCTGAGCGCCCACTCTTCCAATTAAACATTCTCAGCCAAGAA
GACAGTGAGCACACCTACCAGACACTCTTCTTCTCCCACCTCACTCTCCCACTGTACCCACC
CCTAAATCATTCCAGTGCTCTCAAAAAGCATGTTTTTCAAGATCATTTTGTTTGTTGCTCTC
TCTAGTGTCTTCTTCTCTCGTCAGTCTTAGCCTGTGCCCTCCCCTTACCCAGGCTTAGGCTT
AATTACCTGAAAGATTCCAGGAAACTGTAGCTTCCTAGCTAGTGTCATTTAACCTTAAATGC
AATCAGGAAAGTAGCAAACAGAAGTCAATAAATATTTTTAAATGTCAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURA 2

MKVLISSLLLLLPLMLMSMVSSSLNPGVARGHRDRGQASRRWLQEGGQECECKDWFLRAPRR
KFMTVSGLPKKQCPCDHFKGNVKKTRHQRHHRKPNKHSRACQQFLKQCQLRSFALPL

Patrón de expresión de CK27 demostrado mediante la hibridación de un "array" de expresión de múltiples tejidos humanos.

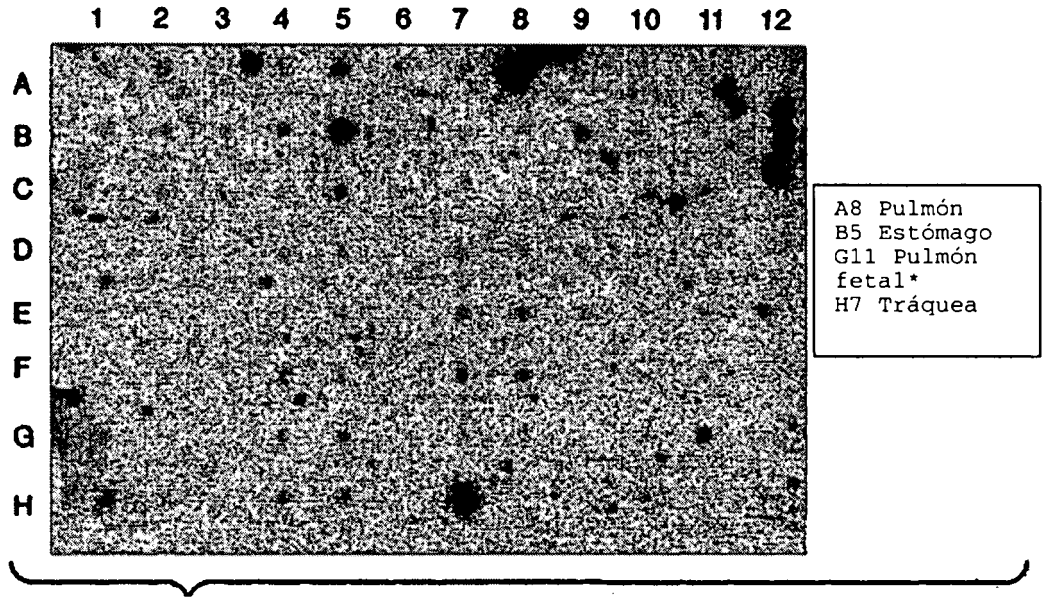


FIGURA 3

Patrón de expresión de CK27 mostrado mediante la hibridación de una sonda de 150 pb a una transferencia Northern de múltiples tejidos humanos.

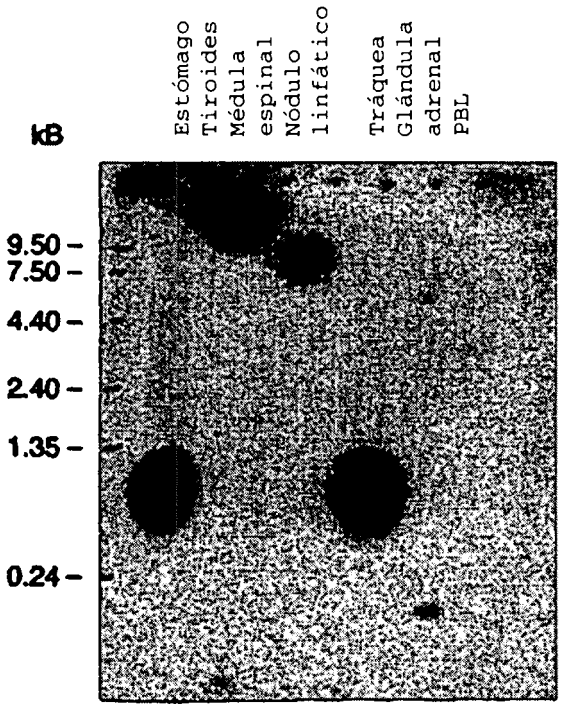


FIGURA 4

Patrón de expresión de CK27 de ratón en una transferencia de ARN de ratón

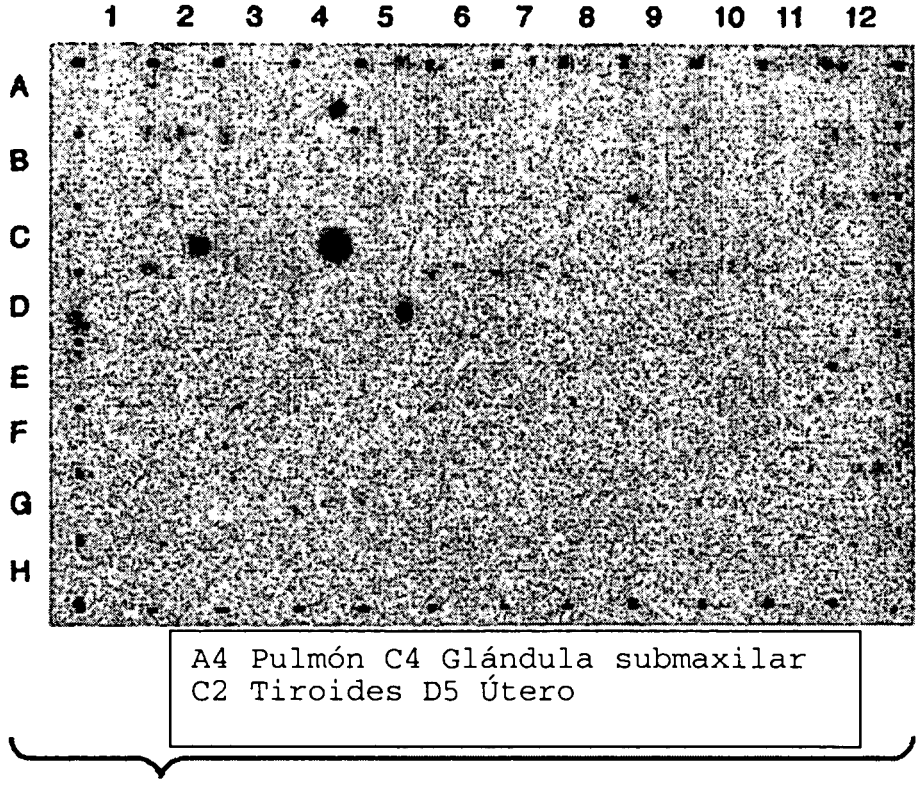


FIGURA 5

Diferentes grupos de CK27 muestran una actividad de atracción química similar

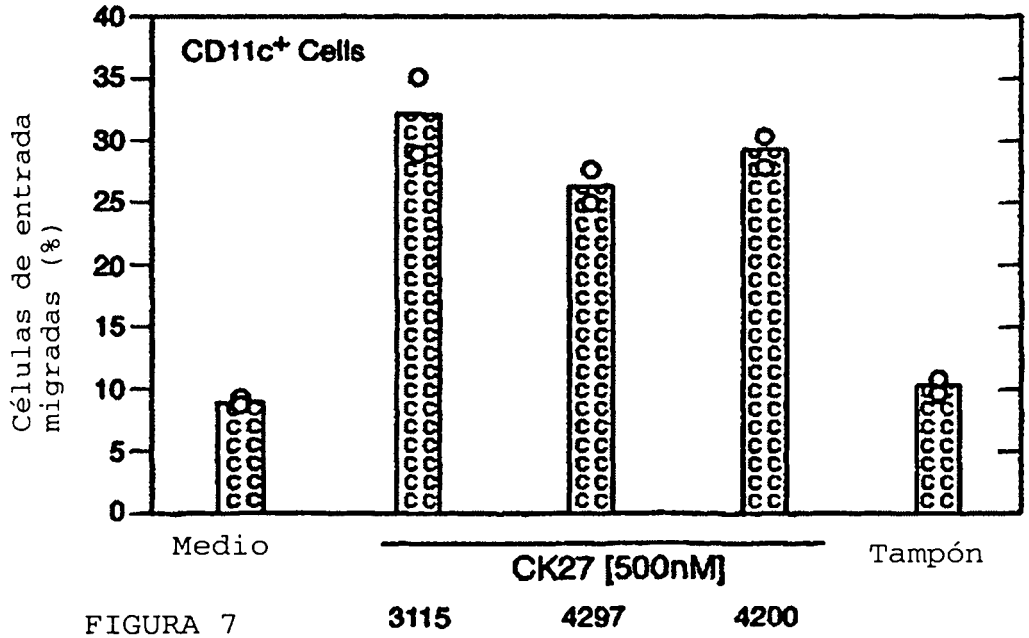


FIGURA 7

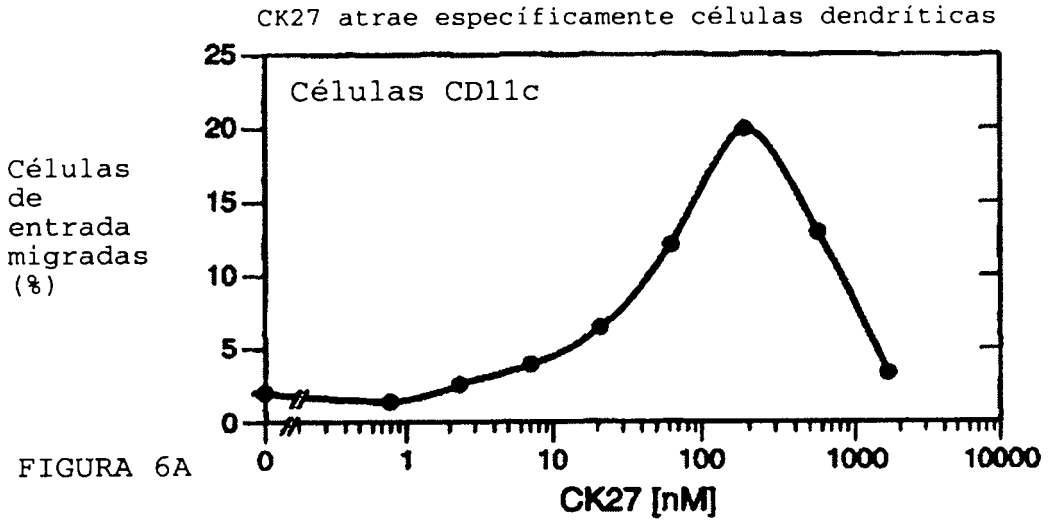


FIGURA 6A

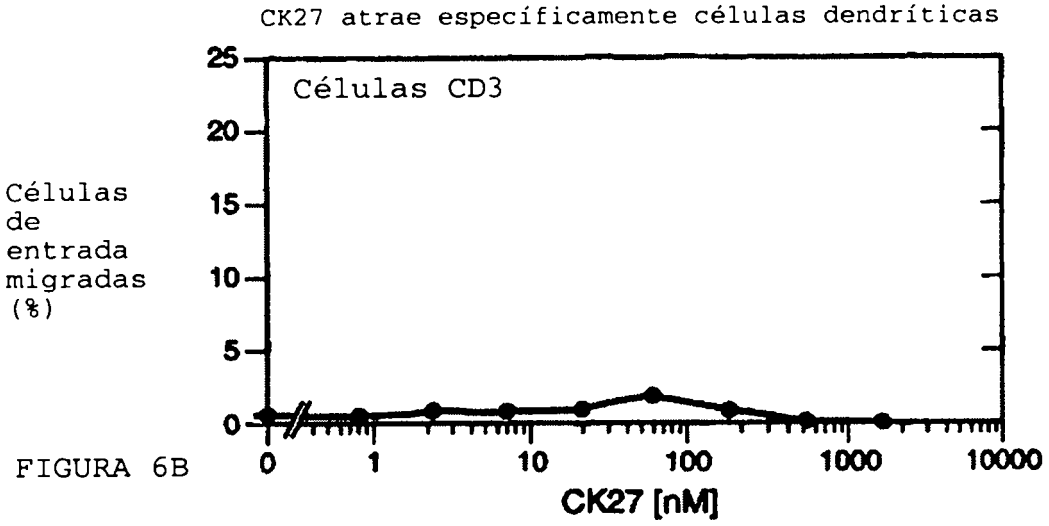


FIGURA 6B

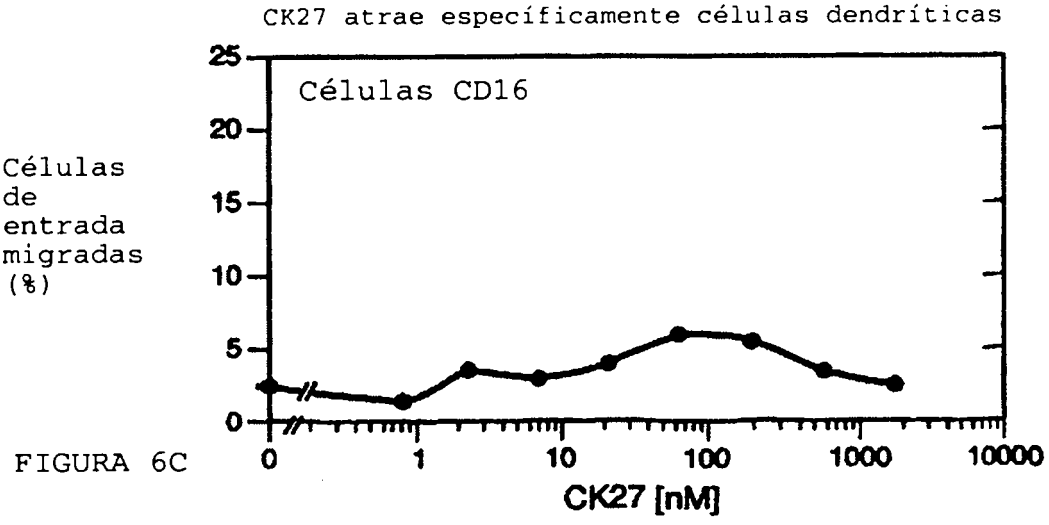


FIGURA 6C

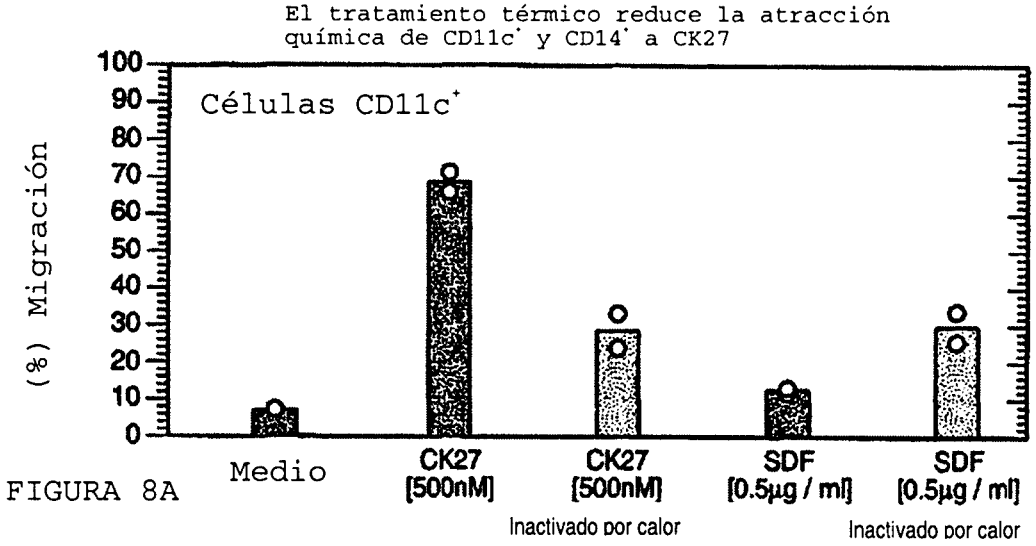


FIGURA 8A

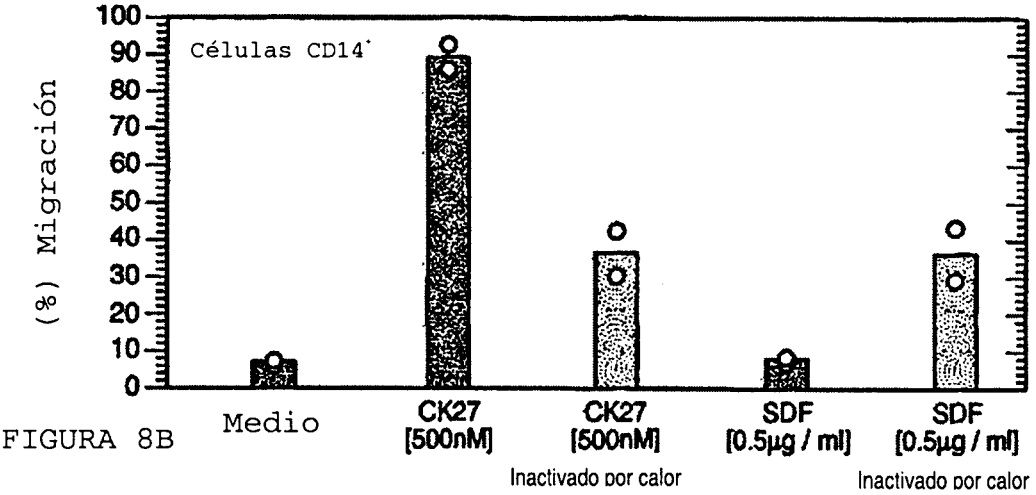


FIGURA 8B

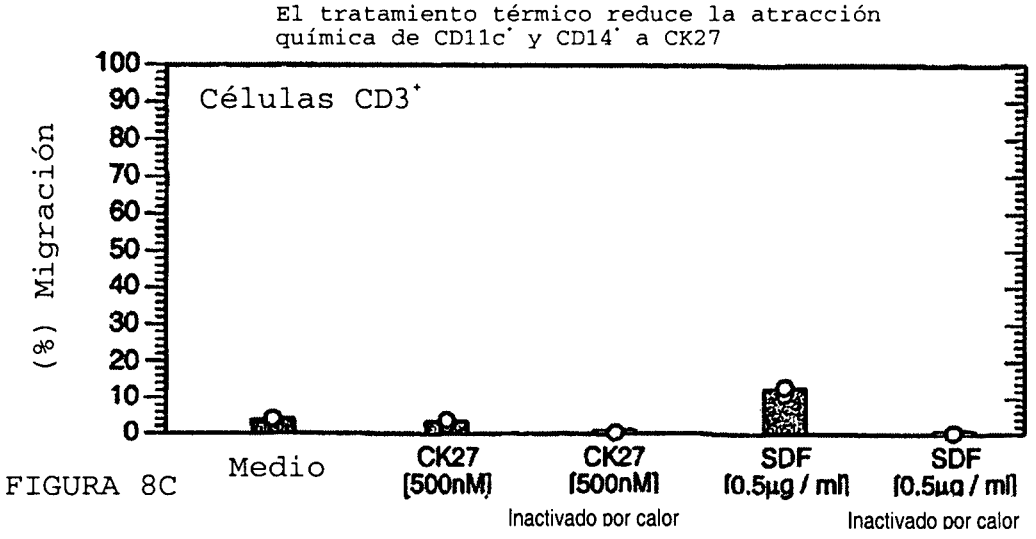


FIGURA 8C

FIGURA 9A

Ovario normal de control

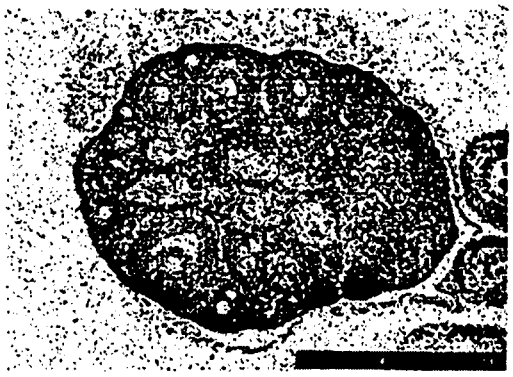
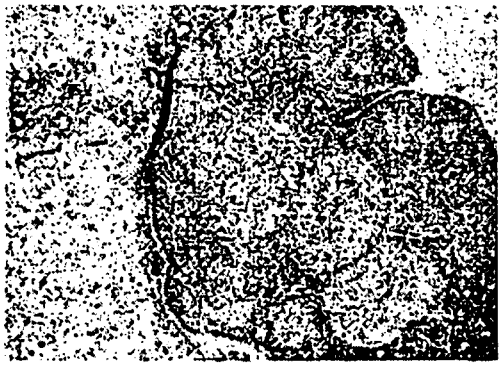


FIGURA 9B

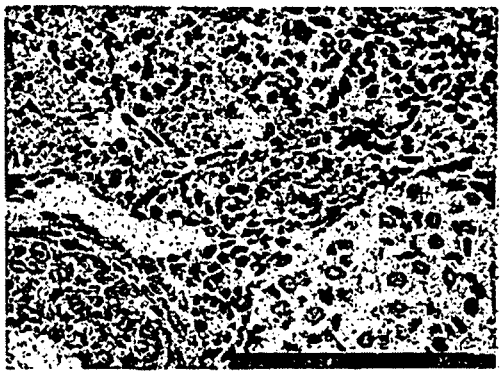
Ovario con cambios de hemosiderina. Extensión al tejido adiposo adyacente





Degeneración quística y hemosiderina

FIGURA 9C



Alta resolución de macrófagos cargados de pigmento

FIGURA 9D

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Eaton, Dan
French, Dorothy
Grimaldi, J. Christopher
Hillan, Kenneth
Pisabarro, Maria
Schmidt, Kerstin
Smith, Victoria
Tumas, Daniel
Vandlen, Richard
Watanabe, Colin
Williams, P. Mickey
Wood, William

<120> POLIPÉPTIDOS HOMÓLOGOS DE LA INTERLEUQUINA-8 Y USOS TERAPÉUTICOS DE LOS MISMOS

<130> P1447R1 (PCT)

<140> PCT/US01/48060

<141> 2001-12-07

<150> PCT/US01/06520
<151> 2001-02-28

<150> US 09/941,992
<151> 2001-08-28

<160> 2

<210> 1
<211> 870
<212> ADN

<400> 1

ctcgccctca aatgggaacg ctggcctggg actaaagcat agaccaccag 50

gctgagtatc ctgacctgag tcatccccag ggatcaggag cctccagcag 100

ggaaccttcc attatattct tcaagcaact tacagctgca ccgacagttg 150

cgatgaaagt tctaatctct tccctcctcc tgttgctgcc actaatgctg 200

atgtccatgg tctctagcag cctgaatcca ggggtcgcca gaggccacag 250

ggaccgaggc caggcttcta ggagatggct ccaggaaggc ggccaagaat 300

gtgagtgcaa agattggttc ctgagagccc cgagaagaaa attcatgaca 350

gtgtctgggc tgccaaagaa gcagtgcccc tgtgatcatt tcaagggcaa 400

tgtgaagaaa acaagacacc aaaggcacca cagaaagcca aacaagcatt 450

ccagagcctg ccagcaattt ctcaaacaat gtcagctaag aagctttgct 500

ctgcctttgt aggagctctg agcgcccact cttccaatta aacattctca 550

gccaagaaga cagtgagcac acctaccaga cactcttctt ctcccacctc 600

actctcccac tgtacccacc cctaaatcat tccagtgctc tcaaaaagca 650

tgtttttcaa gatcattttg tttgttgctc tctctagtgt cttcttctct 700

cgtcagtctt agcctgtgcc ctccccttac ccaggcttag gcttaattac 750

ctgaaagatt ccaggaaact gtagcttcct agctagtgtc atttaacctt 800

aaatgcaatc aggaaagtag caaacagaag tcaataaata tttttaaatg 850

tcaaaaaaaa aaaaaaaaaa 870

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> *Homo Sapien*

<400> 2

Met Lys Val Leu Ile Ser Ser Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Met
1 5 10 15

Leu Met Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Asn Pro Gly Val Ala Arg
20 25 30

Gly His Arg Asp Arg Gly Gln Ala Ser Arg Arg Trp Leu Gln Glu
35 40 45

Gly Gly Gln Glu Cys Glu Cys Lys Asp Trp Phe Leu Arg Ala Pro
50 55 60

Arg Arg Lys Phe Met Thr Val Ser Gly Leu Pro Lys Lys Gln Cys
65 70 75

Pro Cys Asp His Phe Lys Gly Asn Val Lys Lys Thr Arg His Gln
80 85 90

Arg His His Arg Lys Pro Asn Lys His Ser Arg Ala Cys Gln Gln
95 100 105

Phe Leu Lys Gln Cys Gln Leu Arg Ser Phe Ala Leu Pro Leu
110 115