

19

OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 080 809**

51 Int. Cl.<sup>6</sup>: C12N 15/12

C12P 21/02

C12P 21/08

G01N 33/86

12

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **90309875.4**

86 Fecha de presentación : **10.09.90**

87 Número de publicación de la solicitud: **0 418 014**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **20.03.91**

54 Título: **Receptores de factor de necrosis tumoral alfa y beta.**

30 Prioridad: **11.09.89 US 405370**  
**13.10.89 US 421417**  
**10.05.90 US 523635**

45 Fecha de la publicación de la mención BOPI:  
**16.02.96**

45 Fecha de la publicación del folleto de patente:  
**16.02.96**

73 Titular/es: **Immunex Corporation**  
**51 University Street**  
**Seattle**  
**Washington 98101, US**

72 Inventor/es: **Smith, Craig A.;**  
**Goodwin, Raymond G. y**  
**Beckmann, Patricia M.**

74 Agente: **Gómez-Acebo Pombo, J. Miguel**

ES 2 080 809 T3

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

## DESCRIPCION

Receptores de factor de necrosis tumoral alfa y beta.

5 **Antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere en general a receptores de citoquinas y, más específicamente, a receptores de factores de necrosis tumoral.

10 El factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ , también conocido como caquectina) y el factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF $\beta$ , también conocido como linfotoxina) son proteínas secretoras endógenas homólogas de mamífero capaces de inducir una amplia variedad de efectos sobre un gran número de tipos de células. Las grandes similitudes en las características estructurales y funcionales de estas dos citoquinas han dado como resultado su descripción colectiva como "TNF". Se han aislado clones de cDNA complementario que codifican TNF $\alpha$  (Pennica y otros, Nature 312:724, 1984) y TNF $\beta$  (Gray y otros, Nature 312:721, 15 1984), permitiendo mayor caracterización estructural y biológica del TNF.

Las proteínas de TNF inician su efecto biológico sobre las células uniéndose a proteínas receptoras de TNF (TNF-R) específicas expresadas sobre la membrana plasmática de una célula sensible a TNF. Se observó en primer lugar que el TNF $\alpha$  y el TNF $\beta$  se unían a un receptor común en la línea de células de carcinoma cervical humano ME-180 (Aggarwal y otros, Nature 318:665, 1985). Las estimaciones del tamaño de los TNF-R determinadas por estudios de marcaje por afinidad variaban de 54 a 175 kDa (Creasey y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3293, 1987; Stauber y otros, J. Biol. Chem. 263:19098, 1988; Hohmann y otros, J. Biol. Chem. 264:14927, 1989). Aunque la relación entre estos TNF-Rs de masa molecular diferente no está clara, Hohmann y otros (J. Biol. Chem. 264:14927, 1989) daban 20 cuenta de que al menos existen dos receptores de la superficie celular diferentes para TNF sobre tipos de células diferentes. Estos receptores tienen una masa molecular aparente de aproximadamente 80 kDa y de aproximadamente 55-60 kDa, respectivamente. Ninguna de las publicaciones anteriores, sin embargo, daba cuenta de la purificación hasta homogeneidad de receptores de TNF de la superficie celular.

Además de los receptores de la superficie celular para TNF, también se han identificado proteínas solubles de orina humana capaces de unirse a TNF (Peetre y otros, Eur. J. Haematol. 41:414, 1988; Seckinger y otros, J. Exp. Med. 167:1511, 1988; Seckinger y otros, J. Biol. Chem. 264:11966, 1989; Solicitud de Patente del Reino Unido, Publicación N° 2 218 101 A de Seckinger y otros; Engelmann y otros, J. Biol. Chem. 264:11974, 1989). La proteína urinaria soluble que se une a TNF descrita por 30 UK 2 218 101 A tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal parcial de Asp-Ser-Val-Cys-Pro-, que corresponde a la secuencia parcial descrita más tarde por Engelmann y otros (1989). La relación de las anteriores proteínas urinarias solubles de unión se elucidó adicionalmente después de que se presentara la solicitud principal original (N° de Serie de EE.UU: 403.241) de la presente solicitud, cuando Engelmann y otros dieron cuenta de la identificación y purificación de una segunda proteína urinaria soluble que se 40 une a unión a TNF distinta que tenía una secuencia de aminoácidos N-terminal de Val-Ala-Phe-Thr-Pro- (J. Biol. Chem. 265:1531, 1990). Las dos proteínas urinarias descritas en UK 2 218 101 A y en las publicaciones de Engelmann y otros se mostraban inmunoquímicamente afines a dos proteínas de la superficie celular aparentemente distintas por la capacidad del antisuero contra las proteínas de unión para inhibir la unión de TNF a ciertas células.

Más recientemente, dos grupos separados daban cuenta de la clonación y expresión moleculares de un TNF-R humano de 55 kDa (Loetscher y otros, Cell 61:351, 1990; Schall y otros, Cell 61:361, 1990). El TNF-R de ambos grupos tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal que corresponde a la secuencia de aminoácidos parcial de la proteína urinaria de unión descrita por UK 2 218 101 A, Engelmann y otros 50 (1989) y Engelmann y otros (1990).

Para elucidar la relación de las múltiples formas de TNF-R y las proteínas urinarias solubles de unión a TNF, o para estudiar las características estructurales y biológicas de los TNF-Rs y el papel jugado por los TNF-Rs en las respuestas de diversas poblaciones de células a TNF o a otra estimulación por citoquinas, o para usar los TNF-Rs eficazmente en terapia, diagnóstico o ensayo, son necesarias composiciones purificadas de TNF-R. Tales composiciones, sin embargo, son obtenibles en rendimientos prácticos solamente clonando y expresando genes que codifican los receptores usando tecnología de DNA recombinante. Los esfuerzos para purificar la molécula de TNF-R para usar en análisis bioquímico o para clonar y expresar genes de mamífero que codifican TNF-R, sin embargo, han sido impedidos por la falta de una fuente adecuada de proteína o mRNA del receptor. Antes de la presente invención, no se conocían líneas de células para expresar niveles altos de TNF-R constitutivamente y continuamente, lo que impedía la purificación del receptor para la secuenciación o la construcción de bibliotecas genéticas para la clonación

de cDNA.

**Sumario de la invención**

5 En una primera modalidad, la invención proporciona una secuencia de DNA aislada que codifica una proteína de receptor de TNF (TNF-R) de mamífero biológicamente activa seleccionada de:

(a) los aminoácidos 1-x de la Figura 2A, en donde x se selecciona de los aminoácidos 163-235; y

10 (b) los aminoácidos 1-233 de la Figura 3A.

Una segunda modalidad proporciona una secuencia de DNA aislada que codifica una proteína receptora de TNF (TNF-R) de mamífero biológicamente activa seleccionada de:

15 (a) secuencias de DNA seleccionadas de la región de codificación del gen de TNF-R natural de mamífero de la Fig. 2A-2B o la Fig. 3A-3B;

(b) secuencias de DNA capaces de hibridarse hasta las secuencias de (a) bajo condiciones moderadamente rigurosas, esto es a 50°C en 2xSSC;

20 (c) secuencias de DNA que están degeneradas como resultado del código genético hasta la secuencia de (a) - (b).

En particular, la presente invención proporciona secuencias de DNA que codifican receptores de TNF solubles.

La presente invención también proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden las secuencias de DNA definidas anteriormente, moléculas de TNF-R recombinantes producidas usando los vectores de expresión recombinantes, y procesos para producir las moléculas de TNF-R recombinantes usando los vectores de expresión.

La presente invención también proporciona composiciones de proteína aislada o purificada que comprenden TNF-R, y, en particular, formas solubles de TNF-R.

35 La presente invención también proporciona composiciones para uso en terapia, diagnóstico, ensayo de TNF-R, o para originar anticuerpos para TNF-R, que comprenden cantidades efectivas de proteínas receptoras solubles naturales o recombinantes preparadas de acuerdo con los procesos precedentes.

40 Debido a la capacidad del TNF para unirse específicamente a receptores de TNF (TNF-Rs), las composiciones de TNF-R purificado serán útiles en ensayos de diagnóstico para TNF, así como para producir anticuerpos para el receptor de TNF para usar en diagnóstico y terapia. Además, las composiciones de receptores de TNF purificados pueden usarse directamente en terapia para unirse a o eliminar TNF, proporcionando de ese modo un medio para regular las actividades inmunitarias de esta citoquina.

45 Estos y otros aspectos de la presente invención serán evidentes en referencia a la siguiente descripción detallada.

**Breve descripción de los dibujos**

50 La Figura 1 es una representación esquemática de la región de codificación de diversos cDNAs que codifican TNF-Rs humanos y de ratón. La secuencia conductora es rayada y la región de transmembrana es sólida.

55 La Figura 2A-2B representa la secuencia de cDNA parcial y la secuencia de aminoácidos derivada del clon 1 de TNF-R humano. Los nucleótidos se enumeran desde el principio de la región no traducida 5'. Los aminoácidos se enumeran desde el principio de la secuencia del péptido de señal. La secuencia del péptido de señal putativa está representada por los aminoácidos -22 a -1. La leucina N-terminal de la proteína de TNF-R madura está subrayada en la posición 1. La región de transmembrana predicha desde los aminoácidos 236 a 265 también está subrayada. Los términos C de diversos TNF-Rs solubles están marcados con una flecha (↓).

La Figura 3A-3C representa la secuencia de cDNA y la secuencia de aminoácidos derivada del clon

11 de TNF-R de ratón. La secuencia del péptido de señal putativa está representada por los aminoácidos -22 a -1. La valina N-terminal de la proteína de TNF-R madura está subrayada en la posición 1. La región de transmembrana predicha desde los aminoácidos 234 a 265 también está subrayada.

## 5 Descripción detallada de la invención

### *Definiciones*

Según se usa aquí, los términos “receptor de TNF” y “TNFR” se refieren a proteínas que tienen frecuencias de aminoácidos que son substancialmente similares a las secuencias de aminoácidos del receptor de TNF natural de mamífero, y que son biológicamente activas, según se define debajo, ya que son capaces de unirse a moléculas de TNF o transducir una señal biológica iniciada por una molécula de TNF que se une a una célula, o reaccionar de forma cruzada con anticuerpos anti-TNFR producidos contra TNF-R de fuentes naturales (es decir, no recombinantes). El TNF-R humano maduro de longitud total es una glicoproteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kilodaltons (kDa). Según se usa a lo largo de la memoria descriptiva, el término “maduro” significa una proteína expresada en una forma que carece de una secuencia conductora como puede estar presente en transcritos de longitud total de un gen natural. Los experimentos que usaban células COS transfectadas con un cDNA que codifica TNF-R humano de longitud total mostraban que el TNF-R se unía a  $^{125}\text{I}$ -TNF $\alpha$  con una  $K_a$  aparente de aproximadamente  $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ , y que el TNF-R se unía a  $^{125}\text{I}$ -TNF $\beta$  con una  $K_a$  aparente de aproximadamente  $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ . Los términos “receptor de TNF” o “TNF-R” incluyen, pero no se limitan a, análogos o subunidades de proteínas naturales que tienen al menos 20 aminoácidos y que exhiben al menos alguna actividad biológica en común con el TNF-R, por ejemplo, construcciones de TNF-R soluble que están desprovistas de una región de transmembrana (y se secretan de la célula) pero retienen la capacidad para unirse a TNF. Diversos análogos de proteínas y aminoácidos bioequivalentes se describen con detalle debajo.

La nomenclatura para análogos de TNF-R, según se usa aquí, sigue la convención de nombrar la proteína (por ejemplo, TNF-R) precedida por hu (para humanos) o mu (para ratón) y seguido por una  $\Delta$  (para designar una delección) y el número de aminoácido C-terminal. Por ejemplo, huTNF-R $\Delta$ 235 se refiere a TNF-R que tiene Asp<sup>235</sup> como aminoácido C-terminal (es decir, un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos 1-235 de la Figura 2A). En ausencia de cualquier denominación de especie humana o de ratón, TNF-R se refiere genéricamente a TNF-R de mamífero. De forma similar, en ausencia de ninguna denominación específica para mutantes de delección, el término TNF-R significa todas las formas de TNF-R, incluyendo mutantes y análogos que poseen actividad biológica de TNF-R.

“TNF-R soluble” o “sTNF-R”, según se usan en el contexto de la presente invención, se refieren a proteínas, o análogos substancialmente equivalentes, que tienen una secuencia de aminoácidos correspondiente a toda, o parte de, la región extracelular de un TNF-R natural, por ejemplo, huTNF-R $\Delta$ 235, huTNF-R $\Delta$ 185 y huTNF-R $\Delta$ 163, o secuencias de aminoácidos substancialmente similares a las secuencias de aminoácidos 1163, aminoácidos 1-185, o aminoácidos 1-235 de la Figura 2A, y que son biológicamente activas ya que se unen a un ligando de TNF. TNF-Rs solubles equivalentes incluyen polipéptidos que varían de estas secuencias en una o más substituciones, delecciones o adiciones, y que retienen la capacidad para unirse a TNF o para inhibir la actividad de transducción de señal de TNF a través de proteínas receptoras de TNF unidas a la superficie celular, por ejemplo hu TNF-R $\Delta$ x, en donde x se selecciona del grupo que consiste en uno cualquiera de los aminoácidos 163-235 de la Figura 2A. Delecciones análogas pueden hacerse en muTNF-R. La inhibición de la actividad de transducción de la señal de TNF puede determinarse transfectando células con DNAs de TNF-R recombinantes para obtener expresión de receptores recombinantes. Las células se ponen en contacto a continuación con TNF y se examinan los efectos metabólicos resultantes. Si resulta un efecto que es atribuible a la acción de ligando, entonces el receptor recombinante tiene actividad de transducción de la señal. Procedimientos ejemplares para determinar si un polipéptido tiene actividad de transducción de la señal son descritos por Idzerda y otros, *J. Exp. Med.* 171:861 (1990); Curtis y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:3045 (1989); Prywes y otros, *EMBO J.* 5:2179 (1986) y Chou y otros, *J. Biol. Chem.* 262:1842 (1987). Alternativamente, también podrían utilizarse células primarias o líneas de células que expresan un receptor de TNF endógeno y tienen una respuesta biológica detectable a TNF.

El término “aislado” o “purificado”, según se usa en el contexto de esta memoria descriptiva para definir la pureza de la proteína o las composiciones de proteína de TNF-R, significa que la proteína a la composición de proteína está substancialmente libre de otras proteínas de origen natural o endógeno y contiene menos de aproximadamente un 1% en masa de contaminantes de proteína residuales de los procesos de producción. Tales composiciones, sin embargo, pueden contener otras proteínas añadidas

como estabilizadores, vehículos, excipientes o agentes co-terapéuticos. El TNF-R se aísla si es detectable como una sola banda de proteína en un gel de poliacrilamida tiñendo con plata.

El término “substancialmente similares”, cuando se usa para definir secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos, significa que una secuencia particular, por ejemplo, una secuencia mutante, varía con respecto a una secuencia de referencia en una o más substituciones, deleciones o adiciones, cuyo efecto neto es retener la actividad biológica de la proteína de TNF-R según puede determinarse, por ejemplo, en uno de los ensayos de unión a TNF-R indicados en el Ejemplo 1 debajo. Alternativamente, subunidades y análogos de ácidos nucleicos son “substancialmente similares” a las secuencias de DNA específicas descritas aquí si: (a) la secuencia de DNA deriva de la región de codificación de un gen de TNF-R de mamífero natural; (b) la secuencia de DNA es capaz de hibridación hasta secuencias de DNA de (a) bajo condiciones moderadamente rigurosas (50°C, 2 x SSC) y que codifican moléculas de TNF-R biológicamente activas; o secuencias de DNA que se degeneran como resultado del código genético hasta las secuencias de DNA definidas en (a) o (b) y que codifican moléculas de TNF-R biológicamente activas.

“Recombinante”, según se usa aquí, significa una proteína que deriva de sistemas de expresión recombinantes (por ejemplo, microbianos o de mamíferos). “Microbianos” se refiere a proteínas recombinantes elaboradas en sistemas de expresión bacterianos o fúngicos (por ejemplo, de levadura). Como un producto, “microbiano recombinante” define una proteína producida en un sistema de expresión microbiano que está esencialmente libre de sustancias endógenas naturales. La proteína expresada en la mayoría de los cultivos bacterianos, por ejemplo, *E. coli*, estará libre de glicano. La proteína expresada en levadura puede tener un patrón de glicosilación diferente de aquella expresada en células de mamífero.

“Biológicamente activo”, según se usa a lo largo de la memoria descriptiva como una característica de los receptores de TNF, significa que una molécula particular comparte suficiente similitud de la secuencia de aminoácidos con las secuencias específicas de la presente invención descritas aquí para ser capaces de unirse a cantidades detectables de TNF, transmitir un estímulo de TNF a una célula, por ejemplo, como un componente de una construcción de receptor híbrido, o reaccionar de forma cruzada con anticuerpos anti-TNF-R producidos contra TNF-R de fuentes naturales (es decir, no recombinantes). Preferiblemente, los receptores de TNF biológicamente activos dentro del alcance de la presente invención son capaces de unirse a más de 0,1 nmoles de TNF por nmol de receptor y, más preferiblemente, más de 0,5 nmoles de TNF por nmol de receptor en ensayos de unión estándar (véase debajo).

“Secuencia de DNA aislada” se refiere a un polímero de DNA, en forma de un fragmento separado o como un componente de una construcción de DNA más grande, que deriva de DNA aislado al menos una vez en forma substancialmente pura, es decir, libre de materiales endógenos contaminantes y en una cantidad o concentración que permite la identificación, manipulación y recuperación de la secuencia y sus secuencias de nucleótidos componentes mediante métodos bioquímicos estándar, por ejemplo, usando un vector de clonación. Tales secuencias se proporcionan preferiblemente en forma de un cuadro de lectura abierto no interrumpido por secuencias no traducidas internas, o intrones, y están típicamente presentes en genes eucarióticos. El DNA genómico que contiene las secuencias relevantes también podría usarse como una fuente de secuencias de codificación. Las secuencias de DNA no traducido pueden estar presentes 5' ó 3' a partir del cuadro de lectura abierto, donde las mismas no interfieren con la manipulación o la expresión de las regiones de codificación.

“Secuencia de nucleótidos” se refiere a un heteropolímero de desoxirribonucleótidos. Las secuencias de DNA que codifican las proteínas proporcionadas por esta invención pueden montarse a partir de fragmentos de cDNA y enlazadores de oligonucleótidos cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, para proporcionar un gen sintético que es capaz de expresarse en una unidad de transcripción recombinante.

#### *Aislamiento de cDNAs que Codifican TNF-R*

La secuencia de codificación de TNF-R se obtiene aislando una secuencia de DNA complementario (cDNA) que codifica TNF-R de una biblioteca de cDNA recombinante o DNA genómico. Una biblioteca de cDNA se construye preferiblemente obteniendo mRNA poliadenilado a partir de una línea de células particular que expresa un TNF-R de mamífero, por ejemplo, la línea de células fibroblásticas humanas WI-26 VA4 (ARCC CCL 95,1) y usando el mRNA como una plantilla para sintetizar cDNA de doble filamento. El cDNA de doble filamento se empaqueta a continuación en un vector recombinante, que se introduce en una cepa de *E. coli* apropiada y se propaga. También pueden usarse líneas de células de ratón u otros mamíferos que expresan TNF-R. Las secuencias de TNF-R contenidas en la biblioteca de cDNA pueden identificarse fácilmente seleccionando la biblioteca con una prueba de ácido nucleico apropiada que es capaz de hibridarse con cDNA de TNF-R. Alternativamente, DNAs que codifican proteínas

de TNF-R pueden montarse mediante ligación de subunidades de oligonucleótidos sintéticos correspondientes a toda, o a parte de, la secuencia de las Figuras 2A-2B o 3A-3C para proporcionar una secuencia de codificación completa.

5 Los cDNAs de receptores de TNF humanos de la presente invención se aislaron mediante el método de clonación por expresión directa. Se construyó una biblioteca de cDNA aislando en primer lugar mRNA citoplásmico de la línea de células fibroblásticas humanas WI-26 VA4. Se aisló RNA poliadenilado y se usó para preparar cDNA de doble filamento. Fragmentos de cDNA purificado se ligaron a continuación en DNA de vector pCAV/NOT, que usa secuencias reguladoras derivadas de pD201 (un derivado de pMLSV, previamente descrito por Cosman y otros, Nature 312:768, 1984), SV40 DNA de citomegalovirus, descrito con detalle debajo en el Ejemplo 2. pCAV/NOT se ha depositado en the American Type Culture Collection bajo el N° de registro ATCC 68014. Los vectores pCAV/NOT que contienen los fragmentos de cDNA WI26-VA4 se transformaron en cepa de E. coli DH5 $\alpha$ . Los transformantes se cultivaron en placas para proporcionar aproximadamente 800 colonias por placa. Las colonias resultantes se recogieron y cada combinación se usó para preparar DNA de plásmido para transfección en células COS-7, esencialmente según se describe por Cosman y otros, (Nature 312:768, 1984) y Luthman y otros (Nucl. Acid Res. 11:1295, 1983). Los transformantes que expresan receptores de TNF superficiales de células biológicamente activas se identificaron por selección para su capacidad para unirse a <sup>125</sup>I-TNF. En este método de selección, células COS-7 transfectadas se incubaron con medio que contenía <sup>125</sup>I-TNF, las células se lavaron para eliminar TNF marcado no unido, y las monocapas de células se pusieron en contacto con película de rayos X para detectar las concentraciones de unión a TNF, según se describe por Sims y otros, Science 241:585 (1988). Los transfectantes detectados de esta manera aparecen como focos oscuros frente a un fondo relativamente claro.

25 Usando este método, aproximadamente 240.000 cDNAs se seleccionaron en combinaciones de aproximadamente 800 cDNAs hasta que el ensayo de un grupo de transfectantes indicaba focos positivos para unión a TNF. Un material congelado de bacterias de este grupo positivo se hizo crecer en cultivo y se cultivó en placas para proporcionar colonias individuales, que se seleccionaron hasta que se identificaba un solo clon (clon 11) que era capaz de dirigir la síntesis de una proteína superficial con actividad de unión a TNF detectable. La secuencia del clon 11 de cDNA aislado mediante el método de arriba se representa en las Figuras 3A-3C.

35 Clones de cDNA adicionales pueden aislarse a partir de bibliotecas de cDNA y otras especies de mamíferos mediante hibridación de especies cruzadas. Para usar en hibridación, el DNA que codifica TNF-R puede marcarse covalentemente con una sustancia detectable tal como un grupo fluorescente, un átomo radiactivo o un grupo quimioluminiscente mediante métodos bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales pruebas también pueden usarse para diagnóstico *in vitro* de condiciones particulares.

40 Como la mayoría de los genes de mamíferos, los receptores de TNF de mamíferos son codificados presumiblemente por genes de varios exones. Se considera que las construcciones de mRNA alternativas que pueden atribuirse a diferentes casos de empalme ("splicing") de mRNA después de la transcripción, y que comparten grandes regiones de identidad o similitud con los cDNAs reivindicados aquí, están dentro del alcance de la presente invención.

45 Otros cDNAs de TNF-R de mamífero se aíslan usando una secuencia de DNA de TNF-R humano apropiado como una prueba para seleccionar una biblioteca de cDNA de mamífero particular mediante hibridación de especies cruzadas.

## 50 *Proteínas y Análogos*

La presente invención proporciona polipéptidos de TNF-R recombinantes aislados humanos y de ratón. Los polipéptidos de TNF-R aislados de esta invención están substancialmente libres de otros materiales contaminantes de origen natural o endógeno y contienen menos de aproximadamente un 1% en masa de proteína en contaminantes residuales de los procesos de producción. Las moléculas de TNF-R humano naturales se recuperan de lisados de células como glicoproteínas que tienen un peso molecular aparente mediante SDS-PAGE de aproximadamente 80 kilodaltons (kDa). Los polipéptidos de TNF-R de esta invención están opcionalmente sin glicosilación de patrón natural asociada.

60 El TNF-R de mamífero de la presente invención incluye TNFR humano y de ratón. Los TNF-Rs de mamífero pueden obtenerse mediante hibridación de especies cruzadas, usando un cDNA de un solo filamento derivado de la secuencia de DNA de TNF-R humano como prueba de hibridación para aislar

cDNAs de TNF-R de bibliotecas de cDNA de mamífero.

Los derivados de TNF-R dentro del alcance de la invención también incluyen diversas formas estructurales de la proteína primaria que retienen actividad biológica. Debido a la presencia de grupos amino y carboxilo ionizables, por ejemplo, una proteína de TNF-R puede estar en forma de sales ácidas o básicas, o puede estar en forma neutra. Los residuos de aminoácidos individuales también pueden modificarse mediante oxidación o reducción.

La estructura de aminoácidos primaria puede modificarse formando conjugados covalentes o agregativos con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, grupos fosfato, acetilo y similares, o creando mutantes de secuencias de aminoácidos. Los derivados covalentes se preparan enlazando grupos funcionales particulares a cadenas laterales de aminoácidos de TNF-R o a los términos N o C. Otros derivados de TNF-R dentro del alcance de esta invención incluyen conjugados covalentes o agregativos de TNF-R o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tales como mediante síntesis en cultivo recombinante como fusiones N-terminales o C-terminales. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser una secuencia de polipéptido de señal (o conductora) en la región N-terminal de la proteína que dirige cotranslacionalmente o postranslacionalmente la transferencia de la proteína de su sitio de síntesis a su sitio de función dentro o fuera de la membrana o pared celular (por ejemplo, el conductor de factor  $\alpha$  de levaduras). Las fusiones de proteínas de TNF-R pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de TNF-R (por ejemplo, poli-His). La secuencia de aminoácidos del receptor de TNF también puede enlazarse al péptido Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (Hopp y otros, *Bio/Technology* 6:1204, 1988). La última secuencia es altamente antigénica y proporciona un epítipo unido reversiblemente mediante un anticuerpo monoclonal específico, que permite el ensayo rápido y la purificación fácil de proteína recombinante expresada. Esta secuencia también se disocia específicamente mediante enteroquinasa mucosa bovina en el residuo inmediatamente siguiente al apareamiento Asp-Lys. Las proteínas de fusión protegidas con este péptido también pueden ser resistentes a degradación intracelular en *E. coli*.

Los derivados de TNF-R también pueden usarse como inmunógenos, reactivos en inmunoensayos basados en receptores, o como agentes de unión para procedimientos de purificación por afinidad de TNF u otros ligandos de unión. Los derivados de TNF-R también pueden obtenerse mediante agentes de reticulación, tales como éster de M-maleimidobenzoil-succinimida y Nhidroxisuccinimida, en residuos de cisteína y lisina. Las proteínas de TNF-R también pueden unirse covalentemente a través de grupos laterales reactivos a diversos sustratos insolubles, tales como estructuras de agarosa activadas con bromuro de cianógeno, activadas con bisoxirano, activadas con carbonildiimidazol o activadas con tosilo, o adsorbiendo a superficies de poliolefina (con o sin reticulación de glutaraldehído). Una vez unido a un sustrato, el TNF-R puede usarse para unirse selectivamente (para propósitos de ensayo o purificación) a anticuerpos anti-TNF-R o a TNF.

La presente invención también incluye TNF-R con o sin glicosilación de patrón natural asociada. El TNF-R expresado en sistemas de expresión de levadura o de mamífero, por ejemplo, células COS-7, puede ser similar o ligeramente diferente en peso molecular y patrón de glicosilación a las moléculas naturales, dependiendo de los sistemas de expresión. La expresión de DNAs de TNF-R en bacterias tales como *E. coli* proporciona moléculas no glicosiladas. Análogos mutantes funcionales de TNF-R de mamífero que tiene sitios de N-glicosilación inactivados pueden producirse mediante síntesis y ligación de oligonucleótidos o mediante técnicas de mutagénesis específicas para el sitio. Estas proteínas análogas pueden producirse en una forma homogénea de carbohidrato reducido con buen rendimiento usando sistemas de expresión de levadura. Los sitios de N-glicosilación en proteínas eucarióticas se caracterizan por el triplete de aminoácidos Asn-A<sub>1</sub>-Z, donde A<sub>1</sub> es cualquier aminoácido excepto Pro, y Z es Ser o Thr. En esta secuencia, la asparagina proporciona un grupo amino de cadena lateral para ligazón covalente de carbohidrato. Tal sitio puede eliminarse substituyendo Asn o el residuo Z por otro aminoácido, suprimiendo Asn o Z, o insertando un aminoácido que no es Z entre A<sub>1</sub> y Z, o un aminoácido distinto a Asn entre Asn y A<sub>1</sub>.

Los derivados de TNF-R también pueden obtenerse mediante mutaciones de TNF-R o sus subunidades. Un mutante de TNF-R, según se denomina aquí, es un polipéptido homólogo a TNF-R pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente al TNF-R natural debido a una delección, inserción o substitución.

Análogos bioequivalentes de proteínas de TNF-R pueden construirse, por ejemplo, haciendo diversas substituciones de residuos o secuencias o suprimiendo residuos o secuencias terminales o internos no necesarios para la actividad biológica. Por ejemplo, los residuos de cisteína pueden suprimirse (por

ejemplo, Cys<sup>178</sup>) o reemplazarse con otros aminoácidos para evitar la formación de puentes disulfuro intramoleculares innecesarios o incorrectos durante la renaturalización. Otros procedimientos para la mutagénesis implican modificación de residuos de aminoácido dibásicos adyacentes para mejorar la expresión en sistemas de levadura en los que está presente actividad de proteasa de KEX2. Generalmente, las substituciones deben hacerse conservativamente; es decir, los aminoácidos substitutos más preferidos son aquéllos que tienen características fisicoquímicas que se asemejan a aquéllas del residuo que va a reemplazarse. De forma similar, cuando se adopta una estrategia de delección o inserción, debe considerarse el efecto potencial de la delección o la inserción sobre la actividad biológica. Las secuencias polipeptídicas substancialmente similares, según se define anteriormente, comprenden generalmente un número similar de secuencias de aminoácidos, aunque los truncamientos C-terminales para el propósito de construir TNF-Rs solubles contarán con menos secuencias de aminoácidos. Para preservar la actividad biológica de los TNFRs, las delecciones y las substituciones darán como resultado, preferiblemente, secuencias homólogas o substituidas conservativamente, lo que significa que un residuo dado es reemplazado por un residuo biológicamente similar. Ejemplos de substituciones conservativas incluyen substitución de un residuo alifático por otro, tales como Ile, Val, Leu, o Ala por otro, o substituciones de un residuo polar por otro, tales como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Otras substituciones conservativas tales, por ejemplo, substituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobia similares, son bien conocidas. Por otra parte, las diferencias de aminoácidos particulares entre TNF-Rs humano, de ratón y de otros mamíferos sugieren substituciones conservativas adicionales que pueden hacerse sin alterar las características biológicas esenciales del TNF-R.

Las subunidades de TNF-R pueden construirse suprimiendo residuos o secuencias terminales o internas. Secuencias particularmente preferidas incluyen aquéllas en las que la región de transmembrana y el dominio intracelular de TNF-R se suprimen o se substituyen por residuos hidrófilos para facilitar la secreción del receptor en el medio de cultivo celular. La proteína resultante se denomina molécula de TNF-R soluble que retiene su capacidad para unirse a TNF. Una construcción de TNF-R soluble particularmente preferida es TNFR $\Delta$ 235 (la secuencia de aminoácidos 1-235 de la Figura 2A), que comprende la región extracelular entera de TNF-R, terminando con Asp<sup>235</sup> inmediatamente adyacente a la región de transmembrana. Aminoácidos adicionales pueden suprimirse de la región de transmembrana mientras que se retiene la actividad de unión a TNF. Por ejemplo, huTNF-R $\Delta$ 183 que comprende la secuencia de aminoácidos 1-183 de la Figura 2A, y TNF-R $\Delta$ 163 que comprende la secuencia de aminoácidos 1-163 de la Figura 2A, retienen la capacidad para unirse al ligando de TNF según se determina usando los ensayos de unión descritos debajo en el Ejemplo 1. TNF-R $\Delta$ 142, sin embargo, no retiene la capacidad de unirse al ligando de TNF. Esto sugiere que se requieren una o ambas de Cys<sup>157</sup> y Cys<sup>163</sup> para la formación de un puente de disulfuro intramolecular para el pliegue apropiado de TNF-R. Cys<sup>178</sup>, que se suprimió sin ningún efecto adverso aparente sobre la capacidad del TNF-R soluble para unirse a TNF, no parece ser esencial para el pliegue apropiado de TNF-R. Así, se esperaría que cualquier substitución C-terminal para Cys<sup>163</sup> resultara en un TNF-R soluble biológicamente activo. La presente invención completa tales construcciones de TNF-R soluble correspondientes a toda, o parte de, la región extracelular de TNF-R que termina con cualquier aminoácido después de Cys<sup>163</sup>. Otras delecciones C-terminales, tales como TNF-F $\Delta$ 157, pueden hacerse por comodidad cortando cDNA de TNF-R con enzimas de restricción apropiadas y, si es necesario, reconstruyendo secuencias específicas con enlazadores de oligonucleótidos sintéticos. Las construcciones de TNF-R resultantes se insertan a continuación y se expresan en vectores de expresión apropiados y se ensaya su capacidad para unirse a TNF, según se describe en el Ejemplo 1. Los TNF-Rs solubles biológicamente activos que resultan de tales construcciones también se contemplan para estar dentro del alcance de la presente invención.

Las mutaciones en secuencias de nucleótidos construidas para expresión de TNF-R análogo deben, por supuesto, preservar la fase de cuadro de lectura de las secuencias de codificación y, preferiblemente, no crearán regiones complementarias que pudieran hibridarse para producir estructuras de mRNA secundarias tales como bucles u horquillas que afectarían adversamente a la traducción del mRNA receptor. Aunque puede predeterminarse un sitio de mutación, no es necesario que la naturaleza de la mutación de por sí se predetermine. Por ejemplo, para seleccionar las características óptimas de los mutantes en un sitio dado, la mutagénesis al azar puede efectuarse en el codón diana y los mutantes de TNF-R expresados seleccionarse para la actividad deseada.

No todas las mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica TNF-R se expresarán en el producto final, por ejemplo, pueden hacerse substituciones de nucleótidos para mejorar la expresión, principalmente para evitar bucles de estructura secundaria en el mRNA transcrito (véase EPA 75.444A, incorporada aquí mediante referencia), o para proporcionar codones que son traducidos más fácilmente por el huésped seleccionado, por ejemplo, los codones de preferencia de *E. coli* bien conocidos para la expresión de *E. coli*.



Pueden introducirse mutaciones en lugares particulares sintetizando oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten la ligación a fragmentos de la secuencia natural. Después de la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o delección de aminoácidos deseada.

Alternativamente, pueden emplearse procedimientos de mutagénesis específica para el sitio dirigida a oligonucleótidos para proporcionar un gen alterado que tiene codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, delección o inserción requerida. Métodos ejemplares para hacer las alteraciones indicadas anteriormente son descritos por Walder y otros (Gene 42:133, 1986); Bauer y otros (Gene 37:73, 1985); Craik (BioTechniques, Enero de 1985, 12-19); Smith y otros (Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press, 1981); y las Patentes de EE.UU. N° 4.518.584 y 4.737.462 describen técnicas adecuadas, y se incorporan aquí mediante referencia.

Tanto las formas monovalentes como las formas polivalentes de TNF-R son útiles en las composiciones y los métodos de esta invención. Las formas polivalentes poseen sitios de unión a TNF-R múltiples para el ligando de TNF. Por ejemplo, un TNF-R soluble divalente puede consistir en dos repeticiones en tándem de los aminoácidos 1-235 de la Figura 2A, separadas por una región enlazadora. También pueden construirse formas polivalentes alternas, por ejemplo, acoplando químicamente TNF-R a cualquier molécula portadora clínicamente aceptable, a un polímero seleccionado del grupo que consiste en Ficoll, polietilenglicol o dextrano usando técnicas de acoplamiento convencionales. Alternativamente, el TNF-R puede acoplarse químicamente a biotina, y dejar a continuación que el conjugado de biotina-TNF-R se una a avidina, dando como resultado moléculas de avidina/biotina/TNF-R tetravalentes. El TNF-R también puede acoplarse covalentemente a dinitrofenol (DNP) o trinitrofenol (TNP) y el conjugado resultante precipitarse con anti-DNP o anti-TNP-IgM, para formar conjugados decámeros con una valencia de 10 para los sitios de unión a TNF-R.

También puede producirse una molécula de anticuerpo quimérico recombinante que tiene secuencias de TNF-R que substituyen los dominios variables de cualquiera o ambas de las cadenas pesada y ligera de la molécula de inmunoglobulina y que tienen dominios de región constantes no modificados. Por ejemplo, puede producirse TNF-R/IgG<sub>1</sub> quimérico a partir de dos genes quiméricos - una quimera de TNF-R/cadena ligera  $\kappa$  humana (TNF-R/C $\kappa$ ) y la quimera de TNF-R/cadena pesada  $\gamma$ 1 humana (TNF-R/C $\gamma$ -1). Después de la transcripción y la traducción de los dos genes quiméricos, los productos genéticos se montan en una sola molécula de anticuerpo quimérico que tiene TNF-R desplegado bivalentemente. Tales formas polivalentes de TNF-R pueden tener afinidad de unión mejorada para ligando de TNF. Detalles adicionales que se refieren a la construcción de tales moléculas de anticuerpo quimérico se describen en WO 89/09622 y EP 315062.

#### *Expresión de TNF-R Recombinante*

La presente invención proporciona vectores de expresión recombinantes para ampliar o expresar DNA que codifica TNF-R. Los vectores de expresión recombinantes son construcciones de DNA replicable que tienen fragmentos de DNA sintéticos o derivados de cDNA que codifican TNF-R de mamífero o análogos bioequivalentes unidos operablemente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción adecuados derivados de genes de mamífero, microbio, virus o insecto. Una unidad de transcripción comprende generalmente un montaje de (1) un elemento o elementos genéticos que tienen un papel regulador en la expresión genética, por ejemplo, promotores o mejoradores de la transcripción, (2) una secuencia estructural o de codificación que se transcribe en mRNA y se traduce en una proteína, y (3) secuencias de iniciación y terminación de la transcripción y la traducción apropiadas, según se describe con detalle debajo. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión ribosómicos de mRNA adecuados. La capacidad para replicarse en un huésped, habitualmente concebida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes pueden incorporarse adicionalmente. Las regiones de DNA se enlazan operablemente cuando son funcionalmente afines entre sí. Por ejemplo, DNA para un péptido de señal (conductor secretor) se enlaza operablemente a DNA para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor se enlaza operablemente a una secuencia de codificación si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas se enlaza operablemente a una secuencia de codificación si está situado a fin de permitir la traducción. Generalmente, unido operablemente significa contiguo y, en el caso de conductores secretores, contiguo y en cuadro de lectura. Los elementos estructurales destinados a usar en sistemas de expresión de levaduras incluyen preferiblemente una secuencia conductora que permite la secreción extracelular de proteína traducida por una célula huésped. Alternativamente, cuando la proteína recombinante se expresa sin una

secuencia conductora o de transporte, puede incluir un residuo de metionina N-terminal. Este residuo puede disociarse posteriormente de forma opcional de la proteína recombinante expresada para proporcionar un producto final.

5 Las secuencias de DNA que codifican receptores de TNF de mamífero que van a expresarse en un microorganismo no contendrán, preferiblemente, intrones que pudieran terminar prematuramente la transcripción de DNA en mRNA; sin embargo, la terminación prematura de la transcripción puede ser deseable, por ejemplo, cuando dará como resultado mutantes que tienen truncamientos C-terminales ventajosos, por ejemplo, delección de una región de transmembrana para dar un receptor soluble no unido a la membrana celular. Debido a la degeneración del código, puede haber variación considerable en secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Otras modalidades incluyen secuencias capaces de hibridarse en las secuencias de cDNA proporcionadas bajo condiciones moderadamente rigurosas (50°C, 2 x SSC) y otras secuencias que se hibridan o degeneran hasta aquéllas que codifican polipéptidos receptores de TNF biológicamente activos.

15 El DNA de TNF-R recombinante se expresa o amplia en un sistema de expresión recombinante que comprende un monocultivo substancialmente homogéneo de microorganismos huéspedes adecuados, por ejemplo, bacterias tales como *E. coli* o levadura tal como *S. cerevisiae*, que tienen integrado establemente (mediante transformación o transfección) una unidad de transcripción recombinante en DNA cromosómico o tienen la unidad de transcripción recombinante como un componente de un plásmido residente. Generalmente, las células que constituyen el sistema son la progenie de un solo transformante ancestral. Los sistemas de expresión recombinantes que se definen aquí expresarán proteína heteróloga durante la inducción de los elementos reguladores enlazados a la secuencia de DNA o al gen sintético que va a expresarse.

25 Las células huésped transformadas son células que se han transformado o transfectado con vectores de TNF-R contruidos usando técnicas de DNA recombinante. Las células huésped transformadas expresan ordinariamente TNF-R, pero las células huésped transformadas con propósitos de clonación o ampliación de DNA de TNF-R no necesitan expresar TNF-R. El TNF-R expresado se depositará en la membrana celular o se secretará en el sobrenadante de cultivo, dependiendo del DNA de TNF-R seleccionado. Células huésped adecuadas para expresión de TNF-R de mamífero incluye procariotas, levadura o células eucarióticas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *E. coli* o bacilos. Las células eucarióticas superiores incluyen líneas de células estabilizadas de origen mamífero según se describe debajo. Los sistemas de traducción libres de células también se emplearían para producir TNF-R de mamífero usando RNAs derivados de las construcciones de DNA de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión apropiados para usar con huéspedes celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamíferos son descritos por Pouwels y otros (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, Nueva York, 1985), cuya descripción revelante se incorpora aquí mediante referencia.

40 Los huéspedes de expresión procarióticos pueden usarse para expresión de TNF-R que no requiere procesamiento proteolítico y de disulfuro intensivo. Los vectores de expresión procarióticos comprenden generalmente uno o más marcadores seleccionables fenotípicos, por ejemplo, un gen que codifica proteínas que confieren resistencia a los antibióticos o que suministran un requerimiento autotrófico, y un origen de replicación reconocido por el huésped para asegurar la ampliación dentro del huésped. Huéspedes procarióticos adecuados para transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque también pueden emplearse otros como un asunto de elección.

50 Vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen bacteriano de replicación derivado de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EE.UU.). Estas secciones de "esqueleto" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural que va a expresarse. *E. coli* se transforma típicamente usando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (Bolivar y otros, *Gene* 2:95, 1977). pBR322 contiene genes para resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina y proporciona así medios simples para identificar células transformadas.

60 Los promotores usados comúnmente en vectores de expresión microbianos recombinantes incluyen el sistema promotor de  $\beta$ lactamasa (penicilinas) y el sistema promotor de lactosa (Chang y otros, *Nature* 275:615, 1978; y Goeddel y otros, *Nature* 281:544, 1979), el sistema promotor de triptófano (*trp*) (Go-

eddel y otros, Nucl. Acids Res. 8:4057, 1980; y EPA 36.776) y promotor de tac (Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). Un sistema de expresión bacteriano particularmente útil emplea el promotor  $P_L$  de fago  $\lambda$  y el represor termolábil cI857ts. Los vectores de plásmidos disponibles de the American Type Culture Collection que incorporan derivados del promotor  $P_L$  de  $\lambda$  incluyen plásmido pHUB2, residente en cepa de E. coli JMB9 (ATCC 37092) y pPLc28, residente en RR1 de E. coli (ATCC 53082).

Las proteínas de TNF-R recombinante también pueden expresarse en huéspedes de levadura, preferiblemente de la especie *Saccharomyces*, tales como *S. cerevisiae*. También puede emplearse levadura de otros géneros, tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura contendrán generalmente un origen de replicación del plásmido de levadura  $2\mu$  o una secuencia que se replica autónomamente (ARS), un promotor, DNA que codifica TNF-R, secuencias para la terminación de la poliadenilación y la transcripción y un gen de selección. Preferiblemente, los vectores de levadura incluirán un origen de replicación y un marcador seleccionable que permite la transformación de levadura y E. coli, por ejemplo, el gen de resistencia a la ampicilina de E. coli y *S. cerevisiae* TRP1 o el gen URA3, que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para desarrollarse en triptófano, y un promotor derivado de un gen de levadura altamente expresado para inducir la transcripción de una secuencia estructural aguas abajo. La presencia de la lesión de TRP-1 o URA3 en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano o uracilo.

Secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato-quinasa (Hitzeman y otros, J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess y otros, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; y Holland y otros, Biochem. 17:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato-descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato-isomerasa, 3-fosfoglicerato-mutasa, piruvatoquinasa, triosafosfato-isomerasa, fosfoglucosa-isomerasa, y glucoquinasa. Vectores y promotores adecuados para usar en expresión de levadura se describen adicionalmente en R. Hitzeman y otros, EPA 73.657.

Los vectores de levadura preferidos pueden montarse usando secuencias de DNA de pUC18 para selección y replicación en E. coli (gen  $Amp^r$  y origen de replicación) y secuencias de DNA de levadura que incluyen un promotor ADH2 reprimible con glucosa y conductor de secreción de factor  $\alpha$ . El promotor ADH2 ha sido descrito por Russell y otros. (J. Biol. Chem. 258:2674, 1982) y Beier y otros (Nature 300:724, 1982). El conductor de factor  $\alpha$  de levadura, que dirige la secreción de proteínas heterólogas, puede insertarse entre el promotor y el gen estructural que va a expresarse. Véanse, por ejemplo, Kurjan y otros, Cell 30:933, 1982; y Bitter y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330, 1984. La secuencia conductora puede modificarse para contener, cerca de su extremo 3', uno o más sitios de restricción útiles para facilitar la fusión de la secuencia conductora a genes extraños.

Procedimientos de transformación de levaduras adecuados son conocidos por aquéllos de experiencia en la técnica; una técnica ejemplar es descrita por Hinnen y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929, 1978, seleccionando transformantes de  $Trp^+$  en un medio selectivo que consiste en un 0,67% de base nitrogenada de levadura, un 0,5% de casaminoácidos, un 2% de glucosa, 10  $\mu\text{g/ml}$  de adenina y 20  $\mu\text{g/ml}$  de uracilo o transformantes de URA+ en un medio que consiste en un 0,67 de YNB, con aminoácidos y bases según se describe por Sherman y otros, Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1986.

Cepas de huésped transformadas por vectores que comprenden el promotor ADH2 pueden desarrollarse para expresión en un medio rico que consiste en extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, y glucosa al 1% o 4% complementada con 80  $\mu\text{g/ml}$  de adenina y 80  $\mu\text{g/ml}$  de uracilo. La desrepresión del promotor ADH2 se produce durante el agotamiento de la glucosa del medio. Los sobrenadantes de levadura en bruto se recogen por filtración y se mantienen a 4°C antes de purificación adicional.

Diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o insecto también se emplean ventajosamente para expresar proteína recombinante. La expresión de proteínas recombinantes en células de mamífero se prefiere particularmente debido a que tales proteínas están generalmente plegadas correctamente, están modificadas apropiadamente y son completamente funcionales. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero adecuadas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluaman (Cell 23:175, 1981), y otras líneas de células capaces de expresar un vector apropiado, incluyendo, por ejemplo, células L, líneas de células C-127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y un mejorador enlazado al gen que va a expresarse, y otras secuen-

cias no transcritas 5' ó 3' de flaqueo, y secuencias 5' ó 3' no traducidas, tales como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios dadores y aceptores de empalme, y secuencias de terminación de la transcripción. Se da cuenta de sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto por Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988).

5

Las secuencias de control de la transcripción y la traducción en vectores de expresión que van a usarse para transformar células de vertebrados pueden proporcionarse mediante fuentes víricas. Por ejemplo, promotores y mejoradores usados comúnmente derivan de Polioma, Adenovirus 2, Virus de Simio 40 (SV40), y citomegalovirus humano. Las secuencias de DNA derivadas del genoma vírico SV40, por ejemplo, el origen de SV40, los sitios promotor inicial y final, mejorador, de empalme y de poliadenilación pueden usarse para proporcionar los otros elementos genéticos requeridos para la expresión de una secuencia de DNA heterólogo. Los promotores inicial y final son particularmente útiles debido a que se obtienen fácilmente a partir del virus como un fragmento que también contiene el origen vírico de SV40 de replicación (Fiers y otros, *Nature* 273:113, 1978). También pueden usarse fragmentos de SV40 más pequeños o más grandes, con tal de que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio Hind 3 hasta el sitio Bgl1 situado en el origen vírico de replicación. Además, pueden utilizarse secuencias promotora de TNF-R genómico de mamífero, de control y/o de señal, con tal de que tales secuencias de control sean compatibles con la célula huésped elegida. Detalles adicionales que se refieren al uso de un vector de gran expresión de mamífero para producir receptor de TNF de mamífero recombinante son proporcionados en los Ejemplos 2 y 7 debajo. Vectores ejemplares pueden construirse según se describe por Okayama y Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3:280, 1983).

10

15

20

Un sistema útil para un alto nivel de expresión de cDNAs receptores de mamífero en células epiteliales mamarias de ratón C127 pueden construirse substancialmente como se describe por Cosman y otros (*Mol. Immunol.* 23:935, 1986).

25

En aspectos preferidos de la presente invención, los vectores de expresión recombinantes que comprenden cDNAs de TNF-R están integrados establemente en un DNA de una célula huésped. Se alcanzan niveles esperados de producto de expresión seleccionando líneas de células que tienen números ampliados de DNA de vector. Las líneas de células que tienen números ampliados de DNA de vector se seleccionan, por ejemplo, transformando una célula huésped con un vector que comprende una secuencia de DNA que codifica una enzima que es inhibida por un fármaco conocido. El vector también puede comprender una secuencia de DNA que codifica una proteína deseada. Alternativamente, la célula huésped puede cotransformarse con un segundo vector que comprende la secuencia de DNA que codifica la proteína deseada. Las células huésped transformadas o cotransformadas se cultivan a continuación en concentraciones crecientes del fármaco conocido, seleccionando de ese modo las células resistentes al fármaco. Tales células resistentes al fármaco sobreviven en concentraciones incrementadas del fármaco tóxico mediante superproducción de la enzima que es inhibida por el fármaco, frecuentemente como resultado de ampliación del gen que codifica la enzima. Cuando la resistencia al fármaco está causada por un incremento en el número de copias del DNA de vector que codifica la enzima inhibible, hay una coampliación concomitante del DNA de vector que codifica la proteína deseada (TNF-R) en el DNA de las células huésped.

30

35

40

Un sistema preferido para tal coampliación usa el gen para dihidrofolato-reductasa (DHFR), que puede estar inhibido por el fármaco metotrexato (MTX). Para alcanzar coampliación, una célula huésped que carece de un gen activo que codifica DHFR se transforma con un vector que comprende una secuencia de DNA que codifica DHFR y una proteína deseada, o se cotransforma con un vector que comprende una secuencia de DNA que codifica DHFR y un vector que comprende una secuencia de DNA que codifica la proteína deseada. Las células huésped transformadas o cotransformadas se cultivan en medios que contienen niveles crecientes de MTX, y se seleccionan aquellas líneas de células que sobreviven.

45

Un sistema de coampliación particularmente preferido usa el gen para glutamina-sintetasa (GS), que es responsable de la síntesis de glutamato y amoníaco, usando la hidrólisis de ATP en ADP y fosfato para conducir la reacción. La GS se somete a inhibición mediante una variedad de inhibidores, por ejemplo metionina-sulfoximina (MSX). Así, el TNF-R puede expresarse en altas concentraciones coampliando células transformadas con un vector que comprende la secuencia de DNA para GS y una proteína deseada, o cotransformarse con un vector que comprende una secuencia de DNA que codifica GS y un vector que comprende una secuencia de DNA que codifica la proteína deseada, cultivando la célula huésped en medios que contienen niveles crecientes de MSX y seleccionando células supervivientes. El sistema de coampliación de GS, los vectores de expresión recombinantes apropiados y las líneas de células se describen en las siguientes solicitudes PCT: WO 87/04462, WO 89/01036, WO 89/10404 y WO 86/05807.

55

60

Las proteínas recombinantes se expresan preferiblemente mediante coampliación de DHFR con GS

en una célula huésped de mamífero, tales como células de Ovario de Hámster Chino (CHO), o, alternativamente, en una línea de células de mieloma de ratón, tal como SP2/0-Ag14 o NSO o una línea de células de mieloma de rata, tal como YB2/3.0-Ag20, descritas en las solicitudes PCT WO/89/10404 y WO 86/05807.

5

Un vector eucariótico preferido para expresión de DNA de TNF-R se describe debajo en el Ejemplo 2. Este vector, denominado pCAV/NOT, derivaba del vector de gran expresión de mamífero pDC201 y contiene secuencias reguladoras de SV40, adenovirus-2 y citomegalovirus humano.

#### 10 *Purificación de TNF-R Recombinante*

Receptores de TNF de mamífero purificados o análogos se preparan cultivando sistemas de huésped/vector apropiados para expresar los productos de traducción recombinantes de los DNAs de la presente invención, y a continuación se purifican en medios de cultivo o extractos de células.

15

Por ejemplo, los sobrenadantes de los sistemas que secretan proteínas recombinantes en medios de cultivo pueden concentrarse en primer lugar usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender una molécula de TNF o lectina o anticuerpo unida a un soporte adecuado. Alternativamente, puede emplearse una resina de intercambio aniónico, por ejemplo, una matriz o substrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) pendientes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa y otros tipos empleados comúnmente en purificación de proteínas. Alternativamente, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Intercambiadores catiónicos adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren grupos sulfopropilo.

Finalmente, pueden emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) que emplea medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo u otros grupos alifáticos pendientes, para purificar adicionalmente una composición de TNF-R. Alguna o todas las etapas de purificación precedentes, en diversas combinaciones, también pueden emplearse para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

La proteína recombinante producida en cultivos bacterianos se aísla habitualmente mediante extracción inicial de nódulos de células, seguido por una o más etapas de concentración, desalado, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión por tamaños. Finalmente, puede emplearse cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para las etapas de purificación finales. Las células microbianas empleadas en la expresión de TNF-R recombinante de mamífero pueden romperse mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, tratamiento con ultrasonidos, rotura mecánica o uso de agente para lisis de células.

La fermentación de levadura que expresa TNF-R de mamífero como una proteína secretada simplifica mucho la purificación. La proteína recombinante secretada resultante de una fermentación a gran escala puede purificarse por métodos análogos a aquéllos descritos por Urdal y otros (J. Chromatog. 296:171, 1984). Esta referencia describe dos etapas de HPLC en fase inversa secuenciales para purificación de GM-CSF humano recombinante en una columna de HPLC preparativa.

El TNF-R humano sintetizado en cultivo recombinante se caracteriza por la presencia de componentes de células no humanas, incluyendo proteínas, en cantidades y de un carácter que dependen de las etapas de purificación tomadas para recuperar TNF-R humano del cultivo. Estos componentes serán ordinariamente de origen de levadura, procariótico o eucariótico superior no humano y preferiblemente están presentes en cantidades contaminantes inocuas, del orden de menos de aproximadamente un 1% en peso. Además, el cultivo de células recombinantes permite la producción de TNF-R libre de proteínas que pueden estar asociadas normalmente con TNF-R como se encuentra en la naturaleza en sus especies de origen, por ejemplo, en células, exudados celulares o fluidos corporales.

#### *Administración Terapéutica de TNF-R Soluble Recombinante*

La presente invención proporciona métodos para usar composiciones terapéuticas que comprenden una cantidad efectiva de proteínas de TNF-R solubles y un diluyente y vehículo adecuado, y métodos para suprimir respuestas inflamatorias dependientes de TNF-R en humanos, que comprenden administrar una cantidad efectiva de proteína de TNF-R soluble.

Para uso terapéutico, proteína de TNF-R soluble purificada se administra a un paciente, preferiblemente un humano, para tratamiento de una manera apropiada a la indicación. Así, por ejemplo, composiciones de proteína de TNF-R soluble pueden administrarse mediante inyección en bolo, infusión continua, liberación sostenida a partir de implantes, u otra técnica adecuada. Típicamente, un agente terapéutico de TNF-R soluble se administrará en forma de una composición que comprende proteína purificada junto con vehículos, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Tales vehículos serán atóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Ordinariamente, la preparación de tales composiciones implica combinar el TNF-R con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos, incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero no específica son diluyentes apropiados ejemplares. Preferiblemente, el producto se formula como un liofilizado usando soluciones de excipiente apropiado (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse en pruebas. La cantidad y frecuencia de administración dependerán, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y la gravedad de la indicación que se está tratando, la respuesta deseada, el estado del paciente, etc.

Las proteínas de TNF-R solubles se administran con el propósito de inhibir respuestas dependientes de TNF. Se cree que una variedad de enfermedades o estados son causados por TNF, tales como caquexia y choque séptico. Además, otras citoquinas clave (IL-1, IL-2 y otros factores de estimulación de colonias) también pueden inducir producción de TNF por el huésped significativa. Por lo tanto, pueden usarse composiciones de TNF-R soluble, por ejemplo, para tratar caquexia o choque séptico o para tratar efectos secundarios asociados con terapia de citoquinas. Debido a los papeles principales que IL-1 e IL-2 juegan en la producción de TNF, una terapia de combinación usando receptores de IL-1 o receptores de IL-2 puede preferirse en el tratamiento de indicaciones clínicas asociadas con TNF.

Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración, y no a modo de limitación.

Ejemplos

Ejemplo 1

*Ensayos de Unión*

A. Radiomarcaje de TNF $\alpha$  y TNF $\beta$ . TNF $\alpha$  humano recombinante, en forma de una proteína de fusión que contiene un octapéptido hidrófilo en el término N, se expresó en levadura como una proteína secretada y se purificó por cromatografía de afinidad (Hopp y otros, *Bio/Technology* 6:1204, 1988). El TNF $\beta$  humano recombinante se adquirió de R&D Systems (Minneapolis, MN). Ambas proteínas se radiomarcaron usando el agente en fase sólida disponible comercialmente, IODO-GEN (Pierce). En este procedimiento, 5  $\mu$ g de IODO-GEN se cultivaron en placas en el fondo de un tubo de vidrio de 10 x 75 mm y se incubaron durante 20 minutos a 4°C con 75  $\mu$ l de fosfato sódico 0,1 M, pH 7,4, y 20  $\mu$ l (2 mCi) de Na <sup>125</sup>I. Esta solución se transfirió a continuación a un segundo tubo de vidrio que contenía 5  $\mu$ g de TNF $\alpha$  (o TNF $\beta$ ) en 45  $\mu$ l de PBS durante 20 minutos a 4°C. La mezcla de reacción se fraccionó mediante filtración en gel en un volumen de lecho de 2 ml de Sephadex G-25 (Sigma) equilibrado en medio 1640 de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) que contenía un 2,5% (p/v) de albúmina de suero bovino (BSA), un 0,2% (p/v) de azida sódica y Hepes 20 mM, pH 7,4 (medio de unión). La combinación final de <sup>125</sup>I-TNF se diluyó hasta una solución de reserva de trabajo de 1 x 10<sup>-7</sup> M en medio de unión y se almacenó durante un mes a 4°C sin pérdida detectable de actividad de unión al receptor. La actividad específica es rutinariamente 1 x 10<sup>6</sup> cpm/mmol de TNF.

B. Unión a Células Intactas. Se efectuaron ensayos de unión con células intactas mediante dos métodos. En el primer método, las células se hicieron crecer en primer lugar en suspensión (por ejemplo U 937) o mediante adherencia sobre placas de cultivo de tejidos (por ejemplo, WI26-VA4, expresando las células COS el receptor de TNF recombinante). Las células adherentes se eliminaron posteriormente mediante tratamiento con EDTA 5 mM durante 10 minutos a 37 grados centígrados. Los ensayos de unión se realizaron a continuación mediante un método de separación de aceite de ftalato (Dower y otros, *J. Immunol* 132:751, 1984) esencialmente como se describe por Park y otros (*J. Biol. Chem.* 261:4177, 1986). La unión no específica de <sup>125</sup>I-TNF se midió en presencia de un exceso molar de 200 veces o más de TNF no marcado. Se incluyó azida sódica (0,2%) en un ensayo de unión para inhibir la internalización de <sup>125</sup>ITNF por las células. En el segundo método, se ensayó la capacidad de células COS transfectadas con el plásmido que contiene TNF-R, y que expresan receptores de TNF sobre la superficie, para unirse a

<sup>125</sup>I-TNF mediante el ensayo de unión en placa descrito por Sims y otros (Science 241:585, 1988).

C. Ensayos de Unión en Fase Sólida. La capacidad de TNF-R para adsorberse establemente a nitrocelulosa a partir de extractos detergentes de células humanas que todavía retienen la actividad de unión a TNF proporcionaba un medio para detectar TNF-R. Se prepararon extractos de células mezclando un nódulo de células con 2 x un volumen de PBS que contiene Triton X-100 al 1% y un cóctel de inhibidores de proteasa (fluoruro de fenilmetil-sulfonilo 2 mM, pepstatina 10  $\mu$ M, leupeptina 10  $\mu$ M, o-fenantrolina 2 mM y EGTA 2 mM) sometiendo a un vórtice vigoroso. La mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos, después de lo cual se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a 8°C para eliminar los núcleos y otros residuos. Alícuotas de 2 microlitros de extractos de células se pusieron sobre membranas de nitrocelulosa BA85/21 secas (Schleicher y Schuell, Keene, NH) y se dejaron secar. Las membranas se incubaron en discos para cultivo de tejidos durante 30 minutos en Tris (0,05 M) se añadió solución salina (0,15 M), pH 7,5, que contenía un 3% p/v de BSA para bloquear los sitios de unión no específica. La membrana se cubrió a continuación con <sup>125</sup>ITNF 5 x 10<sup>-11</sup> M en PBS + BSA al 3% y se incubó durante 2 horas a 4°C con remoción. Al final de este tiempo, las membranas se lavaron tres veces en PBS, y se secaron y se colocaron en una película X-Omat de Kodak durante 18 horas a -70°C.

#### Ejemplo 2

20 *Aislamiento de cDNA de TNF-R Humano Mediante Expresión Directa de Proteína Activa en Células COS-7.*

Se seleccionó la expresión de TNF-R de diversas líneas de células humanas basándose en su capacidad para unirse a TNF marcado con <sup>125</sup>I. Se encontró que la línea de células de fibroblastos humanos WI-26 VA4 expresaba un número razonable de receptores por célula. Los estudios de unión en equilibrio mostraban que la línea de células exhibía unión bifásica de <sup>125</sup>I-TNF con aproximadamente 4.000 sitios de alta afinidad ( $K_a = 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ) y 15.000 sitios de baja afinidad ( $K_a = 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) por célula.

Se construyó una biblioteca de cDNA no dimensionada mediante transcripción inversa de mRNA poliadenilado aislado de RNA total extraído de células fibroblásticas humanas WI-26 VA4 que se hacen crecer en presencia de mitógeno de hierba carminera usando técnicas estándar (Gubler y otros, Gene 25:263, 1983; Ausubel y otros, eds., Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, 1987). Las células se recogieron mediante lisis de las células en una solución de hidrocloreuro de guanidina y el RNA total se aisló como se describe previamente (March y otros, Nature 315:641, 1985).

Poli A<sup>+</sup> RNA se aisló mediante cromatografía con oligo-dTcelulosa y se preparó cDNA de doble filamento mediante un método similar al de Gubler y Hoffman (Gene 25:263, 1983). En resumen, el poli A<sup>+</sup> RNA se convirtió en un híbrido de RNA-cDNA mediante transcriptasa inversa usando oligo-dT como iniciador. El híbrido de RNA-cDNA se convirtió a continuación en cDNA de doble filamento usando RNAasa H en combinación con DNAPolimerasa I. El cDNA de doble filamento resultante se truncó en los extremos con DNA-polimerasa T4. Al cDNA truncado en los extremos se añadieron adaptadores de enlazador EcoRI (que tiene sitios NotI internos) que se fosforilaron en un solo extremo (gen *in vitro*). El cDNA adaptado por enlazador se trató con polinucleótido-quinasa T4 para fosforilar la región saliente 5' del adaptador de enlazador y los enlazadores no ligados se eliminaron haciendo pasar el cDNA sobre una columna de Sepharose CL4B. El cDNA adaptado por enlazador se ligó a una concentración equimolar de corte de EcoRI y brazos desfosforilados de bacteriófago  $\lambda$ gt10 (Huynh y otros, DNA Cloning: A Practical Approach, Glover, ed., IRL Press, pp. 49-78). El DNA ligado se empaquetó en partículas de fago usando un estuche disponible comercialmente para generar una biblioteca de recombinantes (Stratagene Cloning Systems, San Diego, CA, EE.UU.). Los recombinantes se ampliaron adicionalmente cultivando en placas fago sobre un tamiz bacteriano de cepa de E. coli c600(hfl<sup>-</sup>).

El DNA de fago se purificó de la biblioteca de cDNA de  $\lambda$ gt10 resultante y los insertos de cDNA se cortaron por digestión con la enzima de restricción NotI. Después de la electroforesis del digesto a través de un gel de agarosa, se aislaron cDNAs mayores de 2.000 pb.

Los cDNAs resultantes se ligaron en el vector de expresión eucariótico pCAV/NOT, que se diseñó para expresar secuencias de cDNA insertadas en su sitio de clonación múltiple cuando se transfectan a células de mamífero. pCAV/NOT se montó a partir de pDC201 (un derivado de pMLSV, descrito previamente por Cosman y otros, Nature 312:768, 1984), SV40 y DNA de citomegalovirus y comprende, en secuencia con la dirección de la transcripción desde el origen de la replicación: (1) secuencias SV40 de coordinados 5171-270 que incluyen el origen de replicación, secuencias mejoradoras y promotores inicial y final; (2) secuencias de citomegalovirus que incluyen las regiones promotora y mejoradora (nucleótidos 671 a +63

de la secuencia publicada por Boechart y otros (Cell 41:521, 1985); (3) secuencias de adenovirus-2 que contienen el primer exón y parte del intrón entre los exones primero y segundo del conductor tripartito, el segundo exón y parte del tercer exón del conductor tripartito en un sitio de clonación múltiple (MCS) que contiene sitios para XhoI, KpnI, SmaI, NotI y BglI; (4) secuencias de SV40 de coordinados 4127-4100 y 2770-2533 que incluyen las señales de poliadenilación y terminación para la transcripción primera; (5) secuencias derivadas de pBR322 y secuencias asociadas con virus VAI y VAII de pDC201, con secuencias de adenovirus 10532-1156 que contienen los genes VAI y VAII, seguidas por secuencias de pBR322 de 4363-2486 y 1094375 que contienen el gen de resistencia a la ampicilina y el origen de replicación.

La biblioteca de cDNA de WI-26 VA4 resultante en pCAV/NOT se usó para transformar cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y se cultivaron en placas los recombinantes para proporcionar aproximadamente 800 colonias por placa y suficientes placas para proporcionar aproximadamente 50.000 colonias totales por selección. Las colonias se retiraron de cada placa, se combinaron, y se preparó DNA de plásmido de cada combinación. El DNA combinado se usó a continuación para transfectar una capa subconfluente de células COS-7 de mono usando DEAE-dextrano seguido por tratamiento con cloroquina, según se describe por Luthman y otros (Nucl. Acids Res. 11:1295, 1983) y McCutchan y otros (J. Natl. Cancer Inst. 41:351, 1986). Las células se hicieron crecer en cultivo durante tres días para permitir la expresión transitoria de las secuencias insertadas. Después de tres días, los sobrenadantes de cultivo se descartaron y las monocapas de células en cada placa se ensayaron para la unión a TNF como sigue. 3 ml de medio de unión que contenía FLAG<sup>®</sup>-TNF marcado por <sup>125</sup>I 1,2 x 10<sup>-11</sup> M se añadió a cada placa y las placas se incubaron a 4°C durante 125 minutos. Este medio se descartó a continuación, y cada placa se lavó una vez con medio de unión frío (que no contenía TNF marcado) y dos veces con PBS frío. Los bordes de cada placa se rompieron a continuación, dejando un disco plano que se puso en contacto con película de rayos X durante 72 horas a -70°C usando un pantalla de intensificación. La actividad de unión a TNF se visualizó sobre las películas expuestas como un foco oscuro contra un fondo relativamente uniforme.

Después de que se hubieron seleccionado aproximadamente 240.000 recombinantes de la biblioteca de esta manera, se observó que una combinación de transfectante proporcionaba focos de unión a TNF que eran claramente evidentes contra la exposición de fondo.

Un material congelado de bacterias de la combinación positiva se usó a continuación para obtener placas de aproximadamente 150 colonias. Se hicieron réplicas de estas placas sobre filtros de nitrocelulosa, y las placas se separaron a continuación y se preparó DNA de plásmido y se transfectó como se describe anteriormente para identificar una placa positiva. Las bacterias de colonias individuales de la réplica de nitrocelulosa de esta placa se hicieron crecer en cultivos de 0,2 ml, que se usaron para obtener DNA de plásmido, que se transfectó en células COS-7 según se describe anteriormente. De esta manera, se aisló un solo clon, clon 1, que era capaz de inducir la expresión de TNF-R humano en células COS. El vector de expresión pCAV/NOT que contenía el clon de cDNA de TNF-R se ha depositado en the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, EE.UU. (N° de Registro 68088) bajo el nombre pCAV/NOT-TNF-R, el 6 de Septiembre de 1989.

### Ejemplo 3

#### *Construcción de cDNAs que Codifican huTNF-R $\Delta$ 235 Soluble*

Un cDNA que codifica un huTNF-R $\Delta$ 235 soluble (que tiene la secuencia de aminoácidos 1-235 de la Figura 2A) se construyó cortando un fragmento de 840 pb de pCAV/NOT-TNF-R con las enzimas de restricción NotI y Pvu2. NotI corta en el sitio de clonación múltiple de pCAV/NOT-TNF-R y Pvu2 corta dentro de la región de codificación de TNF-R 20 nucleótidos 5' de la región de transmembrana. Para reconstruir el extremo 3' de las secuencias de TNF-R, se sintetizaron dos oligonucleótidos y se hibridaron para crear el siguiente enlazador de oligonucleótidos:

```

Pvu2                                BamH1 Bgl2
CTGAAGGGGAGCACTGGCGACTAAGGATCCA
GACTTCCCTCGTGACCGCTGATTCCTAGGTCTAG
AlaGluGlySerThrGlyAspEnd

```

Este enlazador de oligonucleótidos tiene sitios de restricción de Pvu2 y Bgl2 terminales, regenera 20 nucleótidos del TNF-R, seguido por un codón de terminación (subrayado) y un sitio de restricción de BamH1 (para comodidad al aislar el TNF-R soluble total mediante digestión con NotI/BamH1). Este oligonucleótido se ligó a continuación con el inserto de TNF-R de NotI/Pvu2 de 840 pb en pCAV/NOT



## ES 2 080 809 T3

cortado con Bgl2/Not1 para dar psolhuTNFR $\Delta$ 235/CAVNOT, que se transfectó en células COS-7 según se describe anteriormente. Este vector de expresión induce la expresión de TNF-R humano soluble que es capaz de unirse a TNF.

### 5 Ejemplo 4

#### *Construcción de cDNAs que Codifican huTNF-R $\Delta$ 185 Soluble*

Un cDNA que codifica un huTNF-R $\Delta$ 185 soluble (que tiene la secuencia de aminoácidos 1-185 de la Figura 2A) se construyó cortando un fragmento de 640 pb de pCAV/NOT-TNF-R con las enzimas de restricción Not1 y Bgl2. Not1 corta en el sitio de clonación múltiple de pCAV/NOT-TNF-R y Bgl2 corta dentro de la región de codificación de TNF-R en el nucleótido 637, que está 237 nucleótidos 5' de la región de transmembrana. Se sintetizaron los siguientes enlazadores de oligonucleótidos:

15

**Bgl2**

**5' -GATCTGTAACGTGGTGGCCATCCCTGGGAATGCAAGCATGGATGC-3'**

**ACATTGCACCACCGGTAGGGACCCTTACGTTCC**

**IleCysAsnValValAlaIleProGlyAsnAlaSerMetAspAla**

20

**Not1**

**5' - AGTCTGCACGTCCACGTCCCCACCCGGTGGAGC -3'**

**TACCTACGTGACAGGTGCAGGTGCAGGGGGTGGGCCACTCGCCGG**

**ValCysThrSerThrSerProThrArgEnd**

25

Los enlazadores de oligonucleótidos anteriores reconstruyen el extremo 3' de la molécula receptora hasta el nucleótido 608, seguido por un codón de terminación (subrayado). Estos oligonucleótidos se ligaron a continuación con el inserto de TNF-R Not1 de 640 pb en pCAV/NOT cortado con Not1 para dar el vector de expresión psolTNF-R $\Delta$ 185/CAVNOT, que se transfectó en células COS-7 como se describe anteriormente. Este vector de expresión inducía la expresión de TNF-R humano soluble que era capaz de unirse a TNF.

### 35 Ejemplo 5

#### *Construcción de cDNAs que Codifican huTNF-R $\Delta$ 163 Soluble*

Un cDNA que codifica un huTNF-R $\Delta$ 163 soluble (que tiene la secuencia de aminoácidos 1-163 de la Figura 2A) se construyó cortando un fragmento de 640 pb de pCAV/NOT-TNF-R con las enzimas de restricción Not1 y Bgl2 según se describe en el Ejemplo 4. Se sintetizaron los siguientes enlazadores de oligonucleótidos:

45

**Bgl2**                      **Not1**

**5' -GATCTGTTGGAGC -3'**

**ACAACCTCGCCGG**

**IleCysEnd**

50 Este enlazador de oligonucleótidos anterior reconstruye el extremo 3' de la molécula receptora hasta el nucleótido 642 (aminoácido 163), seguido por un codón de terminación (subrayado). Este oligonucleótido se ligó a continuación con el inserto de TNF-R de Not1 de 640 pb en pCAV/NOT cortado con Not1 para dar el vector de expresión psolTNFR $\Delta$ 163/CAVNOT, que se transfectó en células COS-7 según se describe anteriormente. Este vector de expresión inducía la expresión de TNF-R humano soluble que era capaz de unirse a TNF en el ensayo de unión descrito en el Ejemplo 1.

### Ejemplo 6

#### *Construcción de cDNAs que Codifican huTNF-R $\Delta$ 142 Soluble*

60 Un cDNA que codifica un huTNF-R $\Delta$ 142 soluble (que tiene la secuencia de aminoácidos 1-142 de la Figura 2A) se construyó cortando un fragmento de 550 pb de pCAV/NOT-TNF-R con las enzimas de

restricción Not1 y AlwN1. AlwN1 corta dentro de la región de codificación de TNF-R en el nucleótido 549. Se sintetizó el siguiente enlazador de oligonucleótidos:

5 **Bgl2** **Not1**  
**5' -CTGAAACATCAGACGTGGTGTGCAAGCCCTGTTAAA-3'**  
**CTTGACTTTGTAGTCTGCACCACACGTTTCGGGACAATTTCTAGA**  
**End**

10 Este enlazador de oligonucleótidos anterior reconstruye el extremo 3' de la molécula receptora hasta el nucleótido 579 (aminoácido 142), seguido por un codón de terminación (subrayado). Este oligonucleótido se ligó a continuación con el inserto de TNF-R de Not1/AlwN1 de 550 pb en pCAV/NOT cortado con Not1/Bgl2 para dar el vector de expresión psolTNFR $\Delta$ 142/CAVNOT, que se transfectó en células COS-7 según se describe anteriormente. Este vector de expresión no inducía la expresión de TNFR humano  
 15 soluble que era capaz de unirse a TNF. Se cree que esta construcción particular no expresaba TNF-R biológicamente activo debido a que se eliminaban uno o más residuos de cisteína esenciales (por ejemplo, Cys<sup>157</sup> o Cys<sup>163</sup>) requeridos para unión intramolecular (para formación de la estructura terciaria apropiada de la molécula de TNF-R).

20 Ejemplo 7

*Expresión de Receptores de TNF Solubles en Células de CHO*

25 El receptor de TNF soluble se expresó en células de Ovario de Hámster Chino (CHO) usando el sistema de amplificación del gen de glutamina-sintetasa (GS), substancialmente como se describe en las solicitudes de patente PCT N° Wo 87/04462 y WO 89/01036. En resumen, las células de CHO se transfectan con un vector de expresión que contiene genes para TNF-R y GS. Las células de CHO se seleccionan para expresión de gen de GS basándose en la capacidad del DNA transfectado para conferir resistencia a bajos niveles de metionina-sulfoximina (MSX). Los casos de ampliación de la secuencia de GS en tales células  
 30 se seleccionan usando concentraciones de MSX elevadas. De este modo, secuencias de TNF-R contiguas también se amplifican y se alcanza expresión de TNF-R mejorada.

El vector usado en el sistema de expresión de GS era psolTNFR/P6/PSVLGS, que se construyó como sigue. En primer lugar el vector pSVLGS.1 (descrito en las Solicitudes PCT N° WO87/04462 y  
 35 WO89/01036, y disponible de Celltech, Ltd. Berkshire, UK) se cortó con enzima de restricción BamH1 y se desfosforiló con fosfatasa alcalina intestinal de ternero (CIAP) para evitar que el vector se religara a sí mismo. El fragmento de pSVLGS.1 cortado con BamH1 se ligó a continuación a un fragmento de BamH1 a Bgl2 de 2,4 kb de pEE6hCMV (descrito en la Solicitud PCT N° WO89/01036, también disponible de  
 40 Ceeltech) que se cortó con Bgl2, BamH1 y Fsp1 para evitar dos fragmentos de tamaño similar, para dar un vector de 11,2 kb denominado p6/PSVLGS.1. pSVLGS.1 contiene el gen marcador seleccionable de glutamina-sintetasa bajo control del promotor final de SV40. El fragmento de BamH1 a Bgl2 de pEE6hCMV contiene el promotor primario inmediato principal de citomegalovirus humano (hCMV), un polienlazador, y la señal de poliadenilación primaria de SV40. Las secuencias de codificación para TNF-R  
 45 soluble se añadieron a p6/PSVLGS.1 cortando un fragmento de Not1 a BamH1 del vector de expresión psolTNFR/CAVNOT (elaborado de acuerdo con el Ejemplo 3 anterior), se truncó en los extremos con Klenow y se ligó con p6/PSVLGS.1 desfosforilado cortado con SmaI, colocando de ese modo las secuencias de codificación de solTNF-R bajo el control del promotor de hCMV. esto daba como resultado un solo vector de plásmido en el que las unidades de transcripción SV40/GS y hCMB/solTNF-R se transcriben  
 50 en direcciones opuestas. Este vector se denominó psolTNFR/P6/PSVLGS.

psolTNFR/P6/PSVLGS se usó para transfectar células de CHOK1 (disponibles de ATCC, Rochville, MD, bajo el número de registro CCL 61) como sigue. Una monocapa de células CHO-K1 se hizo crecer hasta su confluencia en Medio Esencial Mínimo (MEM) 10X (Gibco: 330-1581AJ) sin glutamina y complementado con suero bovino fetal dializado al 10% (Gibco: 220-6300AJ), piruvato sódico 1 mM (Sigma),  
 55 aminoácidos no esenciales en MEM (Gibco: 320-1140AG), asparagina y glutamato 500 mM (Sigma) y nucleósidos (adenosina, guanosina, citidina y uridina 30  $\mu$ M y timidina 10  $\mu$ M) (Sigma).

Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células por cápsula de Petri de 10 cm se transfectaron con 10  $\mu$ g de psolTNFR/P6/PSVLGS mediante precipitación con fosfato cálcico estándar, substancialmente como se describe por Graham & van der Eb, Virology 52:456 (1983). Las células se sometieron a choque con glicerol (glicerol al 15% en medio de cultivo libre de suero durante aproximadamente 1,5 minutos) aproximadamente 4 horas después de la transfección, substancialmente como se describe por Frost & Williams,

Virology 91:39 (1978), y a continuación se lavaron con medio libre de suero. Un día más tarde, las células transfectadas se alimentaron con medio selectivo reciente que contiene MSX con una concentración final de 25  $\mu\text{m}$ . Las colonias de células supervivientes resistentes a MSX eran visibles en 3-4 semanas. Las colonias supervivientes se transfectaron a placas de 24 cavidades y se dejaron crecer hasta confluencia en medio selectivo. Se ensayó a continuación de la actividad de TNF-R soluble del medio acondicionado de cavidades confluentes usando el ensayo de unión descrito en el Ejemplo 1 anteriormente. Estos ensayos indican que las colonias expresaban TNF-R soluble biológicamente activo.

Para seleccionar para ampliación del gen GS, varias líneas de células resistentes a MSX se transfectan con psolTNFR/P6/PSVLGS y se dejan crecer en diversas concentraciones de MSX. Para cada línea de células, aproximadamente  $1 \times 10^6$  células se cultivan en placas en concentraciones gradualmente crecientes de 100  $\mu\text{m}$ , 250  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$  y 1  $\mu\text{m}$  de MSX y se incuban durante 10-14 días. Después de 14 días, aparecen colonias resistentes a los niveles superiores de MSX. Se ensaya la actividad de TNF-R de las colonias supervivientes usando el ensayo de unión descrito arriba en el Ejemplo 1. Cada una de estas líneas de células altamente resistentes contiene células que surgen de múltiples casos de ampliación independientes. A partir de estas líneas de células, se aísla una o más de las líneas de células más altamente resistentes. Las células ampliadas con altas velocidades de producción se clonan a continuación limitando la clonación en dilución. Los cultivos de células en masa de los transfectantes secretan TNF-R soluble activo.

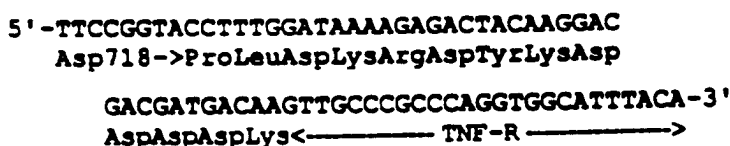
Ejemplo 8

*Expresión de TNF-R Humano Soluble en Levadura*

TNF-R humano soluble se expresó en levadura con el vector de expresión pIXY432, que derivaba del vector de expresión de levadura pIXY120 y del plásmido pYEP352. pIXY120 es idéntico a pY $\alpha$ HuGM (ATCC 53157), excepto que no contiene inserto de cDNA e incluye un sitio polienlazador/de clonación múltiple con un sitio de restricción de Nco1.

Un fragmento de DNA que codifica receptor de TNF y adecuado para clonación en el vector de expresión de levadura pIXY120 se generó en primer lugar mediante ampliación por reacción en cadena de polimerasa (PCR) de la porción extracelular del receptor de longitud total de pCAV/NOT-TNF-R (ATCC 68088). Los siguientes iniciadores se usaron en esta ampliación por PCR:

*Iniciador del Extremo 5'*



*Iniciador del Extremo 3' (sentido contrario)*



El iniciador de oligonucleótidos del extremo 5' usado en la ampliación incluía un sitio de restricción de Asp718 en su extremo 5', seguido por nucleótidos que codifican el extremo 3' de la secuencia conductora de factor  $\alpha$  de levadura (Pro-Leu- Asp-Lys-Arg) y aquéllos que codifican los 8 aminoácidos del péptido FLAG<sup>®</sup> (AspTyrLysAspAspAspAspLys) fusionado a la secuencia que codifica el extremo 5' del receptor maduro. El péptido FLAG<sup>®</sup> (Hopp y otros, Bio/Technology 6:1204, 1988) es una secuencia altamente antigénica que se une reversiblemente al anticuerpo monoclonal M1 (ATCC HB 9259). El oligonucleótido usado para generar el extremo 3' del fragmento derivado por PCR es el filamento de sentido contrario de DNA que codifica secuencias que terminan el cuadro de lectura abierto del receptor después del nucleótido 704 de la región de codificación madura (después del residuo Asp que precede al dominio de transmembrana) introduciendo un codón de detención TAA (subrayado). El codón de detención es seguido a continuación por un sitio de restricción BamH1. Las secuencias de DNA que codifican TNF-R se amplían a continuación mediante PCR, substancialmente como se describe por Innis y otros, eds., PCR

Protocols: A Guide to Methods and Applications (Academic Press, 1990).

El fragmento de DNA derivado por PCR que codifica TNF-R humano soluble se subclonó en el vector de expresión de levadura pIXY120 digiriendo el fragmento de DNA derivado por PCR con enzimas de restricción BamH1 y Asp718, digiriendo pIXY120 con BamH1 y Asp718, y ligando el fragmento de PCR al vector de corte in vitro con DNA-ligasa T4. La construcción resultante (pIXY424) fusiona el cuadro de lectura abierto del receptor de TNF soluble en FLAG<sup>®</sup> en cuadro con la secuencia conductora de factor  $\alpha$  completa y coloca la expresión en la levadura bajo el auspicio del promotor regulado de alcoholdehidrogenasa (ADH2) de levadura. La identidad de la secuencia de nucleótidos del receptor de TNF soluble llevado en pIXY424 con aquéllos en el clon 1 de cDNA se verificó mediante secuenciación de DNA usando el método de terminación de la cadena de disesoxinucleótido. pIXY424 se transformó a continuación en cepa de E. coli RR1.

El receptor de TNF humano soluble también se expresó y secretó en levadura en un segundo vector. Este segundo vector se generó recubriendo el plásmido pIXY424 de E. coli y digiriendo con enzimas de restricción EcoR1 y BamH1 para aislar el fragmento que abarca la región que codifica el promotor ADH2, el conductor de factor  $\alpha$ , el receptor de TNF soluble en FLAG<sup>®</sup> y el codón de detención. Este fragmento se ligó in vitro en plásmido pYEP352 cortado con EcoR1 y BamH1 (Hill y otros, Yeast 2:163 (1986)), para dar el plásmido de expresión pIXY432, que se transformó en cepa de E. coli RR1.

Para probar la secreción del receptor de TNF humano soluble a partir de levadura, pIXY424 se purificó y se introdujo en una cepa de levadura diploide de *S. cerevisiae* (XV2181) mediante electroporación y selección para adquisición del gen TRP1<sup>+</sup> de levadura llevado por el plásmido sobre medio que carece de triptófano. Para ensayar la secreción del receptor dirigido por pIXY432, el plásmido se introdujo en la cepa de levadura PB149-6b mediante electroporación seguida por selección para el gen URA3<sup>+</sup> llevado por el plásmido con crecimiento sobre medio que carece de uracilo. Los cultivos durante la noche se dejaron crecer a 30°C en los medios selectivos apropiados. Los transformantes PB149-6b/pIXY432 se diluyeron en medio de YEP-glucosa al 1% y se dejaron crecer a 30°C durante 38-40 horas. Los sobrenadantes se prepararon por eliminación de células mediante centrifugación, y filtración de los sobrenadantes a través de filtros de 0,45  $\mu$ .

El nivel de receptor secretado en los sobrenadantes se determinó mediante inmuno-goteo-manchado. En resumen, 1  $\mu$ l de sobrenadantes, y diluciones de los sobrenadantes, se hizo gotear sobre filtros de nitrocelulosa y se dejaron secar. Después de bloquear la unión a proteínas no específica con una solución de BSA al 3%, los filtros se incubaron con anticuerpo anti-FLAG<sup>®</sup> M1 diluido, el anticuerpo en exceso se eliminó mediante lavado y a continuación diluciones de anticuerpos anti-IgG de ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante se incubaron con los filtros. Después de la eliminación de los anticuerpos secundarios en exceso, se añadieron substratos de peroxidasa y se dejó que procediera el desarrollo de color durante aproximadamente 10 minutos antes de la eliminación de la solución de substrato.

El material reactivo anti-FLAG<sup>®</sup> encontrado en los sobrenadantes mostraba que eran secretados niveles significativos de receptor por ambos sistemas de expresión. Las comparaciones mostraban que el sistema pIXY432 secretaba aproximadamente 8-16 veces más receptor de TNF humano soluble que el sistema pIXY424. Se ensayó la actividad de TNF-R soluble de los sobrenadantes, según se describe en el Ejemplo 1, mediante su capacidad para unirse a <sup>125</sup>I-TNF $\alpha$  y bloquear la unión a TNF $\alpha$ . Se encontró que los sobrenadantes de pIXY432 contenían niveles significativos de TNF-R soluble activo.

#### Ejemplo 9

##### 50 *Aislamiento de cDNAs de TNF-R de Ratón*

Se aislaron cDNAs de TNF-R de ratón a partir de una biblioteca de cDNA elaborada de células 7B9 de ratón, una línea de células T cooperadoras dependientes de antígeno derivada de ratón C57BL/6, mediante hibridación de especies cruzadas con una prueba de TNF-R humano. La biblioteca de cDNA se construyó en  $\lambda$ ZAP (Stratagene, San Diego), substancialmente como se describe anteriormente en el Ejemplo 2, aislando RNA poliadenilado de las células 7B9.

Una prueba de cDNA de TNF-R humano de doble filamento se produjo cortando un fragmento de Not1 de aproximadamente 3,5 kb del clon 1 de TNF-R humano y marcando son <sup>32</sup>P el cDNA usando iniciadores al azar (Boehringer-Mannheim).

La biblioteca de cDNA de ratón se amplió una vez y se seleccionaron un total de 900.000 placas,

substantialmente como se describe en el Ejemplo 2, con la prueba de cDNA de TNF-R humano. Aproximadamente 21 placas positivas se purificaron, y los plásmidos de Bluescript que contenían insertos enlazados con EcoR1 se cortaron (Stratagene, San Diego). La secuenciación de ácidos nucleicos de una porción de clon 11 de TNF-R de ratón indicaba que la secuencia de codificación del TNF-R de ratón era aproximadamente un 88% homóloga a la secuencia de nucleótidos correspondiente de TNF-R humano. Una secuencia de nucleótidos parcial de clon 11 de cDNA de TNF-R de ratón se indica en las Figuras 3A-3B.

#### Ejemplo 10

##### *Preparación de Anticuerpos Monoclonales para TNF-R*

Se emplearon preparaciones de TNF-R recombinante purificado, por ejemplo, TNF-R humano, o células COS transfectadas que expresan altos niveles de TNF-R para generar anticuerpos monoclonales contra TNF-R usando técnicas convencionales, por ejemplo, aquéllas descritas en la Patente de EE.UU. 4.411.993. Es posible que tales anticuerpos sean útiles para interferir con la unión de TNF a receptores de TNF, por ejemplo, para mejorar efectos tóxicos u otros efectos no deseados del TNF, o como componentes de ensayo de diagnóstico o investigación para TNF o receptor de TNF soluble.

Para inmunizar los ratones, inmunógeno de TNF-R se emulsiona en adyuvante de Freund completo y se inyecta en cantidades que varían de 10-100  $\mu\text{g}$  subcutáneamente en ratones Balb/c. De diez a veinte días más tarde, los animales inmunizados se estimulan con inmunógeno adicional emulsionado en adyuvante de Freund incompleto y se estimulan periódicamente posteriormente con un esquema de inmunización de semanal a bisemanal. Muestras de suero se toman periódicamente mediante sangrado retroorbital o escisión de la punta del rabo para ensayar mediante ensayo de goteo-manchado (sándwich de anticuerpos) o ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas). También son adecuados otros procedimientos. Después de la detección de una concentración de anticuerpo apropiada, se les da a los animales positivos una inyección intravenosa de antígeno en solución salina. De tres a cuatro días más tarde, los animales se sacrifican, los esplenocitos se recogen y se fusionan con la línea de células de mieloma de ratón NS1. Las líneas de células de hibridoma generadas mediante este procedimiento se cultivan en placas sobre placas de microvaloración múltiples en un medio selectivo de HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma, e híbridos de células del bazo.

Los clones de hibridoma así generados pueden seleccionarse mediante ELISA para reactividad con TNF-R, por ejemplo, mediante adaptaciones de la técnica descrita por Engvall y otros, Immunochem. 8:871 (1971) y en la Patente de EE.UU. 4.703.004. Los clones positivos se inyectan a continuación en las cavidades peritoneales de ratones Balb/c singenéticos para producir ascitis que contienen altas concentraciones ( $>1$  mg/ml) de anticuerpo monoclonal anti-TNF-R. El anticuerpo monoclonal resultante puede purificarse mediante precipitación con sulfato amónico seguida por cromatografía de exclusión en gel, y/o cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpo a Proteína A de *Staphylococcus aureus*.

45

50

55

60

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para preparar una proteína de TNF-R de mamífero purificada, comprendiendo el proceso acoplar juntos residuos de aminoácidos sucesivos para formar una proteína de receptor (TNF-R) seleccionada de:
- 5 (a) los aminoácidos 1-x de la Figura 2A, en donde x se selecciona de los aminoácidos 163-235; y
- (b) los aminoácidos 1-233 de la Figura 3A.
- 10 2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de TNF-R comprende la secuencia de los residuos de aminoácido 1-235 de la Figura 2A.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de TNF-R comprende la secuencia de los residuos de aminoácido 1-185 de la Figura 2A.
- 15 4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la secuencia de TNF-R comprende la secuencia de los residuos de aminoácido 1-163 de la Figura 2A.
- 20 5. El uso de una proteína de TNF-R de mamífero de acuerdo con la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para regular respuestas inmunitarias en mamíferos.
6. El uso de una proteína de TNF-R de mamífero de acuerdo con la reivindicación 1, en la preparación de una composición farmacéutica adecuada para administración parenteral a un paciente humano para regular respuestas inmunitarias.
- 25 7. Un proceso para preparar una secuencia de DNA que codifica una proteína de receptor de TNF (TNF-R) de mamífero seleccionada de los residuos de aminoácido 1-x de la Figura 2A, en donde x se selecciona de los aminoácidos 163-235; y los aminoácidos 1-233 de la Figura 3A, comprendiendo el proceso acoplar juntos residuos de nucleótido sucesivos.
- 30 8. Un proceso para preparar una secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la secuencia de DNA codifica una proteína de TNF-R soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de residuos de aminoácido 1-235 de la Figura 2A.
- 35 9. Un proceso para preparar una secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la secuencia de DNA codifica una proteína de TNF-R soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de residuos de aminoácido 1-185 de la Figura 2A.
- 40 10. Un proceso para preparar una secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la secuencia de DNA codifica una proteína de TNF-R soluble que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de residuos de aminoácido 1-163 de la Figura 2A.
- 45 11. Un proceso para preparar una secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 7, seleccionándose dicho DNA de:
- (a) clones de cDNA que tienen una secuencia de nucleótidos seleccionada de la región de codificación de un gen de TNF-R natural de mamífero de la Figura 2A-2B o la Figura 3A-3B;
- 50 (b) secuencias de DNA capaces de hibridarse hasta los clones de (a) bajo condiciones moderadamente rigurosas, (50°C, 2 x SSC) y que codifican proteína de TNF-R biológicamente activa; y
- (c) secuencias de DNA que están degeneradas como resultado del código genético hasta las secuencias DNA definidas en (a) y (b) y que codifican proteína de TNF-R biológicamente activa.
- 55 12. Un proceso para preparar una secuencia de DNA de acuerdo con la reivindicación 7, codificando dicho DNA una proteína de TNF-R que tiene la secuencia de aminoácidos de la proteína de TNF-R expresada por pCAV/NOT-TNF-R (ATCC 68088).
- 60 13. Un proceso para preparar un vector de expresión recombinante, que comprende ligar DNA de vector de expresión bacteriano, de levadura o de mamífero y una secuencia de DNA que codifica una secuencia de proteína de TNF-R humana seleccionada de los residuos de aminoácidos 1-x de la Figura 2A, en donde x se selecciona de los aminoácidos 163-235 y los aminoácidos 1-233 de la Figura 3A.

14. Un proceso para preparar un TNF-R de mamífero o un análogo del mismo, que comprende cultivar una célula huésped adecuada que comprende un vector preparado de acuerdo con la reivindicación 13 bajo condiciones que promueven la expresión.

5

15. Un proceso para detectar moléculas de TNF o TNF-R o la interacción de las mismas, que comprende el uso de una secuencia de proteína de receptor de TNF de mamífero seleccionada de los residuos de aminoácidos 1-x de la Figura 2A, en donde x se selecciona de los aminoácidos 1-163-235; y los aminoácidos 1-233 de la Figura 3A, o un análogo de TNF-R codificado por secuencias de DNA de acuerdo con la reivindicación 11.

10

16. Un proceso para la preparación de anticuerpos inmunorreactivos con una secuencia de proteína de receptor de TNF seleccionada de los residuos de aminoácidos 1-x de la Figura 2A, en donde x se selecciona de los aminoácidos 163-235; y los aminoácidos 1-233 de la Figura 3A, comprendiendo el proceso (a) cultivar una célula de hibridoma que expresa los anticuerpos y recoger los anticuerpos, o (b) recoger anticuerpos inmunorreactivos con tal receptor de TNF de un animal apropiadamente inmunizado.

15

20

25

30

35

40

45

50

---

**NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

55

Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

60

Figura 1

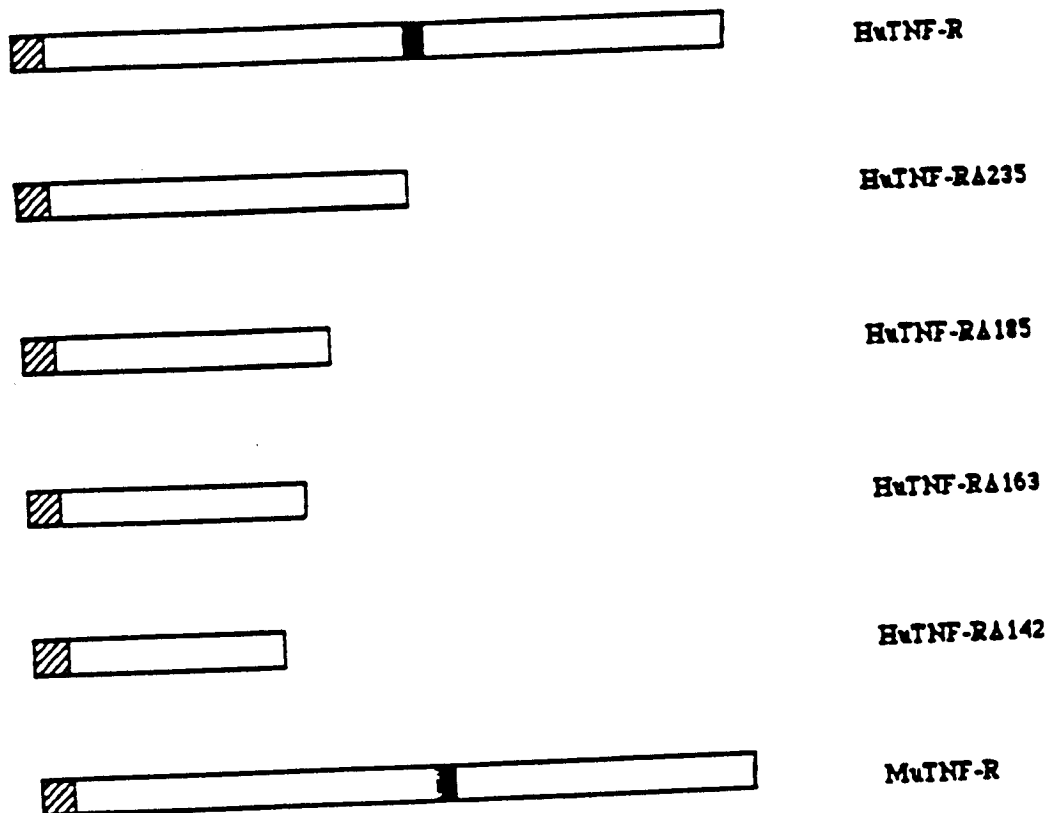




Figura 2A

GCGAGGCAGGCAGCCTGGAGAGAAGGCG	28
CTGGGCTGCGAGGGCGCGAGGGCGCGAGGGGCAACCGGACCCCGCCCGCATCC	97
ATG GCG CCC GTC GCC GTC TGG GCC GCG CTG GCC GTC GGA CTG GAG	132
Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu	-8
CTC TGG GCT GCG GCG CAC GCC TTG CCC GCC CAG GTG GCA TTT ACA	177
Leu Trp Ala Ala Ala His Ala <u>Leu</u> Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr	8
CCC TAC GCC CCG GAG CCC GGG AGC ACA TGC CGG CTC AGA GAA TAC	222
Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr	23
TAT GAC CAG ACA GCT CAG ATG TGC TGC AGC AAA TGC TCG CCG GGC	267
Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly	38
CAA CAT GCA AAA GTC TTC TGT ACC AAG ACC TCG GAC ACC GTG TGT	312
Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys	53
GAC TCC TGT GAG GAC AGC ACA TAC ACC CAG CTC TGG AAC TGG GTT	357
Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val	68
CCC GAG TGC TTG AGC TGT GGC TCC CGC TGT AGC TCT GAC CAG GTG	402
Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val	83
GAA ACT CAA GCC TGC ACT CGG GAA CAG AAC CGC ATC TGC ACC TGC	447
Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys	98
AGG CCC GGC TGG TAC TGC GCG CTG AGC AAG CAG GAG GGG TGC CGG	492
Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg	113
CTG TGC GCG CCG CTG CGC AAG TGC CGC CCG GGC TTC GGC GTG GCC	537
Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala	128
AGA CCA GGA ACT GAA ACA TCA GAC GTG GTG TGC AAG CCC TGT GCC	582
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala	143
CCG GGG ACG TTC TCC AAC ACG ACT TCA TCC ACG GAT ATT TGC AGG	627
Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg	158
CCC CAC CAG ATC TGT AAC GTG GTG GCC ATC CCT GGG AAT GCA AGC	672
Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser	173
ATG GAT GCA GTC TGC ACG TCC ACG TCC CCC ACC CGG AGT ATG GCC	717
Met Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala	188
CCA GGG GCA GTA CAC TTA CCC CAG CCA GTG TCC ACA CGA TCC CAA	762
Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln	203
CAC ACG CAG CCA ACT CCA GAA CCC AGC ACT GCT CCA AGC ACC TCC	807
His Thr Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser	218
TTC CTG CTC CCA ATG GGC CCC AGC CCC CCA GCT GAA GGG AGC ACT	852
Phe Leu Leu Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr	233
GGC GAC TTC GCT CTT CCA GTT GGA CTG ATT GTG GGT GTG ACA GCC	897
Gly Asp <u>Phe Ala Leu Pro Val Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ala</u>	248

Figura 2B

TTG GGT CTA CTA ATA ATA GGA GTG GTG AAC TGT GTC ATC ATG ACC	942
<u>Leu Gly Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys Val Ile Met Thr</u>	263
CAG GTG AAA AAG AAG CCC TTG TGC CTG CAG AGA GAA GCC AAG GTG	987
<u>Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys Val</u>	278
CCT CAC TTG CCT GCC GAT AAG GCC CGG GGT ACA CAG GGC CCC GAG	1032
Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu	293
CAG CAG CAC CTG CTG ATC ACA GCG CCG AGC TCC AGC AGC AGC TCC	1077
Gln Gln His Leu Leu Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser	308
CTG GAG AGC TCG GCC AGT GCG TTG GAC AGA AGG GCG CCC ACT CGG	1122
Leu Glu Ser Ser Ala Ser Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg	323
AAC CAG CCA CAG GCA CCA GGC GTG GAG GCC AGT GGG GCC GGG GAG	1167
Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu	338
GCC CGG GCC AGC ACC GGG AGC TCA GAT TCT TCC CCT GGT GGC CAT	1212
Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser Pro Gly Gly His	353
GGG ACC CAG GTC AAT GTC ACC TGC ATC GTG AAC GTC TGT AGC AGC	1257
Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser	368
TCT GAC CAC AGC TCA CAG TGC TCC TCC CAA GCC AGC TCC ACA ATG	1302
Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr Met	383
GGA GAC ACA GAT TCC AGC CCC TCG GAG TCC CCG AAG GAC GAG CAG	1347
Gly Asp Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro Lys Asp Glu Gln	398
GTC CCC TTC TCC AAG GAG GAA TGT GCC TTT CGG TCA CAG CTG GAG	1392
Val Pro Phe Ser Lys Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu	413
ACG CCA GAG ACC CTG CTG GGG AGC ACC GAA GAG AAG CCC CTG CCC	1437
Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro	428
CTT GGA GTG CCT GAT GCT GGG ATG AAG CCC AGT	1470
Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly Met Lys Pro Ser	439
TAACCAGGCCGGTGTGGGCTGTGTCGTAGCCAAGGTGGGCTGAGCCCTGGCAGGATGAC	
CCTGCCAAGGGGCCCTGGTCCTTCCAGGCCCCCACTAGGACTCTGAGGCTCTTTCT	
GGGCCAAGTTCCTCTAGTGCCCTCCACAGCCGAGCCTCCCTCTGACCTGCAG...	

Figura 3A

CGCAGCTGAGGCACTAGAGCTCC	23
AGGCACAAGGGCGGGAGCCACCGCTGCCCT ATG GCG CCC GCC GCC CTC TGG	75
Met Ala Pro Ala Ala Leu Trp	-16
GTC GCG CTG GTC TTC GAA CTG CAG CTG TGG GCC ACC GGG CAC ACA	120
Val Ala Leu Val Phe Glu Leu Gln Leu Trp Ala Thr Gly His Thr	-1
GTG CCC GCC CAG GTT GTC TTG ACA CCC TAC AAA CCG GAA CCT GGG	165
<u>Val</u> Pro Ala Gln Val Val Leu Thr Pro Tyr Lys Pro Glu Pro Gly	15
TAC GAG TGC CAG ATC TCA CAG GAA TAC TAT GAC AGG AAG GCT CAG	210
Tyr Glu Cys Gln Ile Ser Gln Glu Tyr Tyr Asp Arg Lys Ala Gln	30
ATG TGC TGT GCT AAG TGT CCT CCT GGC CAA TAT GTG AAA CAT TTC	255
Met Cys Cys Ala Lys Cys Pro Pro Gly Gln Tyr Val Lys His Phe	45
TGC AAC AAG ACC TCG GAC ACC GTG TGT GCG GAC TGT GAG GCA AGC	300
Cys Asn Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Ala Asp Cys Glu Ala Ser	60
ATG TAT ACC CAG GTC TGG AAC CAG TTT CGT ACA TGT TTG AGC TGC	345
Met Tyr Thr Gln Val Trp Asn Gln Phe Arg Thr Cys Leu Ser Cys	75
AGT TCT TCC TGT ACC ACT GAC CAG GTG GAG ATC CGC GCC TGC ACT	390
Ser Ser Ser Cys Thr Thr Asp Gln Val Glu Ile Arg Ala Cys Thr	90
AAA CAG CAG AAC CGA GTG TGT GCT TGC GAA GCT GGC AGG TAC TgC	435
Lys Gln Gln Asn Arg Val Cys Ala Cys Glu Ala Gly Arg Tyr Cys	105
GCC TTG AAA ACC CAT TCT GGC AGC TGT CGA CAG TGC ATG AGG CTG	480
Ala Leu Lys Thr His Ser Gly Ser Cys Arg Gln Cys Met Arg Leu	120
AGC AAG TGC GGC CCT GGC TTC GGA GTG GCC AGT TCA AGA GCC CCA	525
Ser Lys Cys Gly Pro Gly Phe Gly Val Ala Ser Ser Arg Ala Pro	135
AAT GGA AAT GTG CTA TGC AAG GCC TGT GCC CCA GGG ACG TTC TCT	570
Asn Gly Asn Val Leu Cys Lys Ala Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser	150
GAC ACC ACA TCA TCC ACT GAT GTG TGC AGG CCC CAC CGC ATC TGT	615
Asp Thr Thr Ser Ser Thr Asp Val Cys Arg Pro His Arg Ile Cys	165
AGC ATC CTG GCT ATT CCC GGA AAT GCA AGC ACA GAT GCA GTC TGT	660
Ser Ile Leu Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Thr Asp Ala Val Cys	180
GCG CCC GAG TCC CCA ACT CTA AGT GCC ATC CCA AGG ACA CTC TAC	705
Ala Pro Glu Ser Pro Thr Leu Ser Ala Ile Pro Arg Thr Leu Tyr	195
GTA TCT CAG CCA GAG CCC ACA AGA TCC CAA CCC CTG GAT CAA GAG	750
Val Ser Gln Pro Glu Pro Thr Arg Ser Gln Pro Leu Asp Gln Glu	210
CCA GGG CCC AGC CAA ACT CCA AGC ATC CTT ACA TCG TTG GGT TCA	795
Pro Gly Pro Ser Gln Thr Pro Ser Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser	225
ACC CCC ATT ATT GAA CAA AGT ACC AAG GGT GGC ATC TCT CTT CCA	840
Thr Pro Ile Ile Glu Gln Ser Thr <u>Lys Gly Gly Ile Ser Leu Pro</u>	240
ATT GGT CTG ATT GTT GGA GTG ACA TCA CTG GGT CTG CTG ATG TTA	885
<u>Ile Gly Leu Ile Val Gly Val Thr Ser Leu Gly Leu Leu Met Leu</u>	255

Figura 3B

GGA CTG GTG AAC TGC ATC ATC CTG GTG CAG AGG AAA AAG AAG CCC	930
Gly Leu Val Asp Cys Ile Ile Leu Val Gln Arg Lys Lys Lys Pro	270
TCC TGC CTA CAA AGA GAT GCC AAG GTG CCT CAT GTG CCT GAT GAG	975
Ser Cys Leu Gln Arg Asp Ala Lys Val Pro His Val Pro Asp Glu	285
AAA TCC CAG GAT GCA GTA GGC CTT GAG CAG CAG CAC CTG TTG ACC	1020
Lys Ser Gln Asp Ala Val Gly Leu Glu Gln Gln His Leu Leu Thr	300
ACA GCA CCC AGT TCC AGC AGC AGC TCC CTA GAG AGC TCA GCC AGC	1065
Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser	315
GCT GGG GAC CGA AGG GCG CCC CCT GGG GGC CAT CCC CAA GCA AGA	1110
Ala Gly Asp Arg Arg Ala Pro Pro Gly Gly His Pro Gln Ala Arg	330
GTC ATG GCG GAG GCC CAA GGG TTT CAG GAG GCC CGT GCC AGC TCC	1155
Val Met Ala Glu Ala Gln Gly Phe Gln Glu Ala Arg Ala Ser Ser	345
AGG ATT TCA GAT TCT TCC CAC GGA AGC CAC GGG ACC CAC GTC AAC	1200
Arg Ile Ser Asp Ser Ser His Gly Ser His Gly Thr His Val Asn	360
GTC ACC TGC ATC GTG AAC GTC TGT AGC AGC TCT GAC CAC AGT TCT	1245
Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys Ser Ser Ser Asp His Ser Ser	375
CAG TGC TCT TCC CAA GCC AGC GCC ACA GTG GGA GAC CCA GAT GCC	1290
Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Ala Thr Val Gly Asp Pro Asp Ala	390
AAG CCC TCA GCG TCC CCA AAG GAT GAG CAG GTC CCC TTC TCT CAG	1335
Lys Pro Ser Ala Ser Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Gln	405
GAG GAG TGT CCG TCT CAG TCC CCG TGT GAG ACT ACA GAG ACA CTG	1380
Glu Glu Cys Pro Ser Gln Ser Pro Cys Glu Thr Thr Glu Thr Leu	420
CAG AGC CAT GAG AAG CCC TTG CCC CTT GGT GTG CCG GAT ATG GGC	1425
Gln Ser His Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Met Gly	435
ATG AAG CCC AGC CAA GCT GGC TGG TTT GAT CAG ATT GCA GTC AAA	1470
Met Lys Pro Ser Gln Ala Gly Trp Phe Asp Gln Ile Ala Val Lys	450
GTG GCC	1476
Val Ala	452
TGACCCCTGACAGGGGTAACACCCTGCAAAGGGACCCCCGAGACCCTGAACCCATGGAAC	1536
TTTCATGACTTTTGTGATCCATTTCCCTTAGTGGCTTCCAGAGCCCCAGTTGCAGGTCA	1596
AGTGAGGGCTGAGACAGCTAGAGTGGTCAAAAACCTGCCATGGTGTTTTATGGGGCAGTC	1656
CCAGGAAGTTGTTGCTCTTCCATGACCCCTCTGGATCTCCTGGGCTCTTGCCTGATTCTT	1716
GCTTCTGAGAGGCCCCAGTATTTTTCCCTTCTAAGGAGCTAACATCCTCTTCCATGAATA	1776
GCACAGCTCTTCAAGCCTGAATGCTGACACTGCAGGGCGGTTCCAGCAAGTAGGAGCAAGT	1836
GGTGGCCTGGTAGGGCACAGAGGCCCTTCAGGTTAGTGCTAAACTCTTAGGAAGTACCCT	1896
CTCCAAGCCACCAGAAATCTTTTGATGCAAGAATCAGAGGCCCCATCAGGCAGAGTTGC	1956
TCTGTTATAGGATGGTAGGGCTGTAACCTCAgTGGTCCAgTGTGCTTTTAGCATGCCCTGG	2016
GTTTGATCCTCAGCAACACATGCAAAACGTAAGTAGACAGCAGCAGCAGACAGCAGC	2076
CAGCCCCCTGTGTGGTTTGCAGCCTCTGCCTTTGACTTTTACTCTGGTGGGCACACAGAG	2136
GGCTGGAGCTCCTCCTCTGACCTCTAATGAGCCCTTCCAAGGCCACGCCTTCTTCCAG	2196
GGAACTCAGGGACTGTAGAGTTCCAGGCCCTGCAGCCACCTGTCTCTTCTACCTCA	2256
GCCTGGAGCACTCCCTCTAACTCCCCAACGgCTTGGTACTGTACTTGTGTGACCCCAAC	2316
GTGCATTGTCGGGTTAGGCACTGTGAGTTGGAACAGCTCATGACATCGGTTGAAAGGCC	2376
CACCCGGAACAGCTAAGCCAGCTCTTTTGCCAAAGGATTCATGCCGGTTTTCTAATCAa	2436
CCTGCTCCTAGCATTGCCCTGGAAGGAAAGGGTTCAGGAGACTCCTCAAGAAGCAAGTTC	2496
AGTCTCAGGTGCTTGGATGCCATGCTCACCGATTCCACTGGATATGAACTTGGCAGAGGA	2556

Figura 3C

```

GCCTAGTTGTTGCCATGGAGACTTAAAGAGCTCAGCACTCTGGAATCAAGATACTGGACA 2616
CTTGGGGCCGACTTGTTAAGGCTCTGCAGCATCAGACTGTAGAGGGGAAGGAACACGTCT 2676
GCCCCCTGGTGGCCCGTCCTGGGAtGACCTCGGGCCtCCTAGGCAACAAAAGAATGAATT 2736
GGAAAGGATGTTCCCTGGGTGTGGCCCTAGCTCCTGTGCTTGTGTGGATCCCTAAAGGGTGT 2796
GCTAAGGAGCAATTGCACTGTGTGCTGGACAGAAATCCTGCTTATAAATGCTTTTTTGTG 2856
TTGTTTTGTACTGAGCCCTGGCTGAGCCACCCACCCACCTCCATCCCACCTTTAC 2916
ACGCCACTCTTGCAATGAGAACCTGGCTGTCTCCCACTTGTAGCCTGTGGATGCTGAGGAA 2976
ACACCCAGCCAAGTAGACTCCAGGCTTgCCCCTATCTCCTGcTtTGAGTcTg9CCTCCTC 3036
AtTgTgTTGTGGGAAgGAGACGGGtTCTGTcATCTCGGAAcgCCCAcACCGTGGATGTGA 3096
ACAaTGGCTGTACTAGCTTAGACCAgCTTAGGGCTCTGCATATCACAGGAGGGGGAGCAG 3156
GGAACAATTTGAGTGTGACCTATAACACAgTTCTAAAGGATCGGGCAGTCCAGAATCT 3216
CCTCCTTCAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT 3276
TGCAATGATGTGTGTGCCAGTGTGTGGAGGCCCGAGGTTGGCTTTGGGTGTGTTTGATCA 3336
CTCTCCAGTTACTGAGGCGGGCTCTCATCTGTACCCAGAGCTTGCAcATTTTCTAGTCTA 3396
ACTTGATTCAGGGATCTCTGTCTGCCTATGGAGgTGCTCAGGTTACAGGCAGGCTGCCAT 3456
ACCTGCCCGACATTTACATGAATACTAGAGATCTGAATTCTGGTCCCTCACACTTGTATAC 3516
CTGCATTTTATCCACTAAGACATCTCTCCAAGGGCTCCCCCTTCCCTATTTAATAAGTTAG 3576
TTTTGAActGGCAAGATGGCTCAGTGGGTAAGGCAGTTTGCGGACAAACCTGATGACCTG 3636
AGTTGGATCCCTGACCATAAGGTAGAAGAGACCTGATTCCCTGCAAGTTGTCCTCTGACCA 3696
CCACCCCATACATGCTTCTGCATATGTGCACACATCACATTCTTGCAcACACACTCACAT 3756
ACCATAAATGTAATAAATTTTTTAATAAATTGATTTTATCTTTTTAAAAAAAAAAAAA 3813

```