



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 204 502**

⑤① Int. Cl.⁷: **C12N 15/11**
C07K 14/705
A61K 38/17
A61K 39/395

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧⑥ Número de solicitud: **00902354 .0**
⑧⑥ Fecha de presentación: **07.01.2000**
⑧⑦ Número de presentación de la solicitud: **1141274**
⑧⑦ Fecha de publicación de la solicitud: **10.10.2001**

⑤④ Título: **Receptor soluble BR43x2 y métodos de utilización en terapia.**

③⑩ Prioridad: **07.01.1999 US 226533**

④⑤ Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2004

④⑤ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2004

⑦③ Titular/es: **ZymoGenetics, Inc.**
1201, Eastlake Avenue East
Seattle, Washington 98102, US

⑦② Inventor/es: **Gross, Jane, A.;**
Xu, Wenfeng;
Madden, Karen y
Yee, David, P.

⑦④ Agente: **Díez de Rivera de Elzaburu, Alfonso**

ES 2 204 502 T3

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

DESCRIPCIÓN

Receptor soluble BR43X2 y métodos de utilización en terapia.

5 Antecedentes del invento

Las interacciones celulares que tienen lugar durante una respuesta inmune son reguladas por miembros de diversas familias de receptores de la superficie celular, incluyendo la familia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR; del inglés, tumor necrosis factor receptor). La familia de TNFR consiste en un número de receptores glicoproteínicos integrales de membrana, muchos de los cuales, junto con sus respectivos ligandos, regulan interacciones entre diferentes linajes celulares hematopoyéticos (Smith et al., The TNF Receptor Superfamily of Cellular and Viral Proteins: Activation, Costimulation and Death, 76: 959-62, 1994, Cosman, Stem Cells 12 440-55, 1994)

Uno de tales receptores es TACI (del inglés, transmembrane activator and CAML-interactor), activador de transmembrana e interaccionador con CAML (von Bülow y Bram, Science 228:138-41, 1997 y Publicación WIPO, WO 98/39361). TACI es un receptor unido a membrana que tiene un dominio extracelular que contiene dos seudorrepeticiones ricas en cisteína, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico que interacciona con CAML (del inglés, calcium-modulator and cyclophilin ligand), modulador de calcio y ligando de ciclofilina, una proteína integral de membrana situada en vesículas intracelulares que es un coinductor de la activación del factor nuclear de células T activadas (NF-AT; del inglés, nuclear factor of activated T cells) cuando se sobreexpresa en células Jurkat. TACI se asocia con células B y un subgrupo de células T. von Bülow y Bram (ibídem) comunican que no se conoce el ligando de TACI.

Se halló que los polipéptidos del presente invento, una isoforma de TACI que sólo tiene una seudorrepetición rica en cisteína (BR43x2), TACI y una proteína de células B relacionada, BCMA (Gras et al., Int. Immunol. 17: 1.093-106, 1.995), se unen al ligando de TNF, ztnf4, ahora conocido como neutroquina α (Publicación WIPO, WO 98/18921), BLyS (Moore et al., Science 285: 260-3, 1.999), BAFF (Schneider et al., J. Exp. Med. 189: 1.747-56, 1.999), TALL-1 (Shu et al., J. Leukoc. Biol. 65: 680-3, 1.999) o THANK (Mukhopadhyay et al., J. Biol. Chem. 274: 15.978-81, 1.999). Como tales, BR43x2, TACI y BCMA serían útiles para regular la actividad de ztnf4, en particular, la activación de células B.

Con este fin, el presente invento proporciona agentes proteicos terapéuticos para modular la actividad de ztnf4 u otros ligandos de BR43x2, TACI o BCMA, composiciones y métodos relacionados, así como otros usos que deberían ser evidentes para los expertos en la técnica a partir de las presentes enseñanzas.

En consecuencia, en un primer aspecto, el invento proporciona el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad de ztnf4 en un mamífero, compuesto que es seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BR43x2, b) un polipéptido soluble que comprende el dominio extracelular de TACI, c) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BCMA, d) un polipéptido que comprende la secuencia de ID. SEC. nº 10, e) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 2, f) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 4, g) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 6, h) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 8, i) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 10, k) un polipéptido de ID. SEC. nº 4, l) los restos de aminoácido 1-166 de la ID. SEC. nº 6, y m) los restos de aminoácido 1-150 de la ID. SEC. nº 8.

En una realización, el compuesto es una proteína de fusión que consiste en una primera porción y una segunda porción unidas por un enlace peptídico, comprendiendo dicha primera porción un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido que comprende la secuencia de ID. SEC. nº 8, b) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 25-58 de la ID. SEC. nº 2, c) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 34-66 de la ID. SEC. nº 6, d) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 71-104 de la ID. SEC. nº 6, e) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 25-104 de la ID. SEC. nº 6, f) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 8-37 de la ID. SEC. nº 8, g) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 41-88 de la ID. SEC. nº 8, y h) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 8-88 de la ID. SEC. nº 8; y comprendiendo dicha segunda porción otro polipéptido. En otra realización, la primera porción comprende además un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) los restos de aminoácido 59-120 de la ID. SEC. nº 2, b) los restos de aminoácido 105-166 de la ID. SEC. nº 6, y c) los restos de aminoácido 89-150 de la ID. SEC. nº 8. En otra realización, la primera porción es seleccionada del grupo que consiste en: a) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BR43x2, b) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de TACI, y c) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BCMA. En una realización relacionada, la primera porción es seleccionada del grupo que consiste en: a) un polipéptido de ID. SEC. nº 4, b) los restos de aminoácido 1-154 de la ID. SEC. nº 6, y c) los restos de aminoácido 1-48 de la ID. SEC. nº 8. En otra realización relacionada, la segunda porción es una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en: a) anticuerpo policlonal, b) anticuerpo monoclonal murino, c) anticuerpo humanizado procedente de b), y d) anticuerpo

monoclonal humano. En una realización relacionada, el fragmento de anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en F(ab'), Fab', Fab, Fv y scFv. En otra realización, el mamífero es un primate.

En otra realización, la actividad de ztnf4 está asociada con linfocitos B. En otra realización relacionada, la actividad de ztnf4 está asociada con linfocitos B activados. En aún otra realización, la actividad de ztnf4 está asociada con linfocitos B en reposo. En otra realización, la actividad de ztnf4 está asociada con la producción de anticuerpos. En una realización relacionada, la producción de anticuerpos está asociada con una enfermedad autoinmune. En una realización relacionada, la citada enfermedad autoinmune es lupus sistémico eritematoso, miastenia gravis (MG), esclerosis múltiple o artritis reumatoide (RA; del inglés, *rheumatoid arthritis*). En otra realización, la actividad de ztnf4 está asociada con asma, bronquitis o enfisema. En aún otra realización, la actividad de ztnf4 está asociada con insuficiencia renal de fase terminal. En aún otra realización, la actividad de ztnf4 está asociada con enfermedad renal. En una realización relacionada, la enfermedad renal es glomerulonefritis, vasculitis, nefritis o pielonefritis. En aún otra realización, la enfermedad renal está asociada con neoplasias renales, mielomas múltiples, linfomas, neuropatía de cadenas ligeras o amiloidosis. En otra realización, la actividad de ztnf4 está asociada con células T efectoras. En una realización relacionada, la actividad de ztnf4 está asociada con moderación de la respuesta inmune. En aún otra realización, la actividad está asociada con inmunosupresión. En aún otra realización, la inmunosupresión está asociada con rechazo de injertos, enfermedad del injerto contra el huésped, o inflamación. En otra realización, la actividad está asociada con enfermedad autoinmune. En una realización relacionada, la enfermedad autoinmune es diabetes mellitus dependiente de insulina o la enfermedad de Crohn. En otra realización, la actividad de ztnf4 está asociada con inflamación. En una realización relacionada, la inflamación está asociada con dolor articular, hinchazón, anemia o shock séptico. En otro aspecto, el invento proporciona un método para la fabricación de un medicamento para inhibir el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ztnf4, que incluye una cantidad de un compuesto como el anteriormente descrito. En otra realización, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con linfocitos B. En otra realización relacionada, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con linfocitos B activados. En aún otra realización, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con linfocitos B en reposo.

En otra realización, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con la producción de anticuerpos. En una realización relacionada, la producción de anticuerpos está asociada con una enfermedad autoinmune. En una realización relacionada, la citada enfermedad autoinmune es lupus sistémico eritematoso, miastenia gravis, esclerosis múltiple o artritis reumatoide. En otra realización, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con asma, bronquitis o enfisema. En aún otra realización, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con insuficiencia renal de fase terminal. En aún otra realización, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con enfermedad renal. En una realización relacionada, la enfermedad renal es glomerulonefritis, vasculitis, nefritis o pielonefritis. En aún otra realización, la enfermedad renal está asociada con neoplasias renales, mielomas múltiples, linfomas, neuropatía de cadenas ligeras o amiloidosis. En otra realización, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con células T efectoras. En una realización relacionada, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con moderación de la respuesta inmune. En aún otra realización, la actividad está asociada con inmunosupresión. En aún otra realización, la inmunosupresión está asociada con rechazo de injertos, enfermedad del injerto contra el huésped, o inflamación. En otra realización, la actividad está asociada con enfermedad autoinmune. En una realización relacionada, la enfermedad autoinmune es diabetes mellitus dependiente de insulina o la enfermedad de Crohn. En otra realización, el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando está asociado con inflamación. En una realización relacionada, la inflamación está asociada con dolor articular, hinchazón, anemia o shock séptico.

En otro aspecto, el invento proporciona una molécula polinucleotídica aislada que codifica un polipéptido de ID. SEC. n° 2. Se proporciona también una molécula polinucleotídica aislada de ID. SEC. n° 1. En una realización relacionada, se proporciona un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente enlazados: un promotor de transcripción, una molécula polinucleotídica como la anteriormente descrita y un terminador de transcripción. En otra realización, el vector de expresión comprende además una secuencia secretora de acoplamiento de receptor-ligando operativamente enlazada a dicha molécula polinucleotídica. También se proporciona una célula en cultivo en la que se ha introducido un vector de expresión como el anteriormente descrito, célula en cultivo que expresa dicho polipéptido codificado por dicho segmento polinucleotídico. El invento proporciona además un método para producir un polipéptido, que comprende: cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión como el anteriormente descrito, mediante lo cual dicha célula expresa dicho polipéptido codificado por dicha molécula polinucleotídica; y recuperar dicho polipéptido expresado. El invento también proporciona un polipéptido aislado que tiene la secuencia de ID. SEC. n° 2. En una realización relacionada, el polipéptido está en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

60 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una alineación de múltiples secuencia de aminoácidos entre BR43x2, TACI (von Bülow y Bram, *ibidem*) (ID. SEC. n° 8), BCMA (Gras et al., *ibidem*) (ID. SEC. n° 6) y BR43x1 (ID. SEC. n° 9). Se indican las seudorrepeticiones ricas en cisteína y el dominio transmembranal.

65 La Figura 2 muestra un análisis gráfico de Scatchard de la unión de I¹²⁵-ztnf4 soluble a TACI y BCMA expresados por transfectantes BHK estables.

ES 2 204 502 T3

La Figura 3A muestra la coactivación de linfocitos B humanos por ztnf4 para que proliferen y secreten inmunoglobulina.

La Figura 3B muestra niveles de IgM e IgG medidos en sobrenadantes obtenidos de células B estimuladas con ztnf4 soluble en presencia de IL-4 o IL-4+IL-5 después de 9 días en cultivo.

La Figura 4 muestra células B humanas de sangre periférica estimuladas con ztnf4 soluble o proteína testigo (ubiquitina) en presencia de IL-4 durante 5 días *in vitro*. TACI-Ig, BCMA-Ig y Fc testigo purificados fueron ensayados en cuanto a la inhibición de la proliferación específica por ztnf4.

La Figura 5A muestra resultados de animales transgénicos en cuanto a ztnf4 que han desarrollado características de lupus sistémico eritematoso (SLE; del inglés, *systemic lupus erythematosus*).

La Figura 5B muestra células de ganglio linfático, bazo y timo procedentes de animales transgénicos en cuanto a ztnf4, teñidas con anticuerpos hacia CD5, CD4 y CD8.

La Figura 5C muestra niveles totales de IgM, IgG e IgE en suero de animales transgénicos en cuanto a ztnf4 con una edad que varía de 6 a 23 semanas.

La Figura 5D muestra el depósito de amiloide y el mesangio engrosado de los glomérulos identificados en secciones renales de animales transgénicos en cuanto a ztnf4.

La Figura 5E muestra células T efectoras en ratones transgénicos en cuanto a ztnf4.

Las Figuras 6A y 6B muestran niveles elevados de ztnf4 en suero obtenido de ratones ZNBWF1 y ratones MRL/lpr/lpr, que se correlacionan con el desarrollo de SLE.

La Figura 7 muestra el porcentaje de ratones NZBWF1 que desarrollan proteinuria a lo largo del curso del estudio.

La Figura 8 muestra niveles anti-DNA de cadena doble (dsDNA; del inglés, *double stranded DNA*), por ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*), de ratones transgénicos en cuanto a ztnf4 y compañeros de camada testigo, comparados con los de suero de ratones ZNBWF1 y MRL/lpr/lpr.

Estos y otros aspectos del invento se harán evidentes por referencia a la descripción detallada siguiente.

Descripción detallada del invento

Antes de exponer el invento, puede ser útil para su comprensión la exposición de las definiciones de ciertas expresiones que se usarán más adelante.

Etiqueta de afinidad

Se usa aquí para significar un segmento polipeptídico que puede ser fijado a un segundo polipéptido para proporcionar la purificación o detección del segundo polipéptido o para proporcionar sitios para la fijación del segundo polipéptido a un sustrato. En principio, como etiqueta de afinidad puede usarse cualquier péptido o proteína para el que se disponga de un anticuerpo u otro agente ligante específico. Las etiquetas de afinidad incluyen una extensión de polihistidina, proteína A (Nilsson et al., *EMBO J.* 4: 1.075, 1.985; Nilsson et al., *Methods Enzymol.* 198: 3, 1.991), glutatión S-transferasa (Smith y Johnson, *Gene* 67: 31, 1.988), etiqueta de afinidad Glu-Glu (Grussenmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7.952-4, 1.985), sustancia P, péptido FlagTM (Hopp et al., *Biotechnology* 6: 1.204-10, 1.988), péptido ligante de estreptavidina, u otro epítipo antigénico o dominio ligante. Véase, en general, Ford et al., *Protein Expression and Purification* 2: 95-107, 1.991. De proveedores comerciales (por ejemplo, Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey, EE.UU.) pueden obtenerse DNAs que codifican etiquetas de afinidad.

Variante alélica

Cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación y puede dar lugar a un polimorfismo fenotípico en las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (es decir, sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos alterada. La expresión “variante alélica” se usa también aquí para significar una proteína codificada por una variante alélica de un gen. También se incluye la misma proteína de la misma especie que difiere de una secuencia de aminoácidos de referencia a causa de una variación alélica. La variación alélica se refiere a diferencias presentes en la naturaleza entre individuos, en genes que codifican una proteína dada.

Amino-terminal y carboxilo-terminal

Se usan aquí para significar posiciones en polipéptidos y proteínas. Cuando el contexto lo permite, estas expresiones se usan con referencia a una secuencia o porción particular de un polipéptido o proteína para significar proximidad

o posición relativa. Por ejemplo, una cierta secuencia dispuesta carboxilo-terminalmente con respecto a una secuencia de referencia de una proteína está situada cerca del extremo carboxílico de la secuencia de referencia pero no está necesariamente en el extremo carboxílico de la proteína completa.

5 *Par de complemento/anticomplemento*

Significa grupos no idénticos que forman un par estable, no covalentemente asociado, bajo condiciones apropiadas. Por ejemplo, la biotina y la avidina (o estreptavidina) son miembros prototípicos de un par de complemento/anticomplemento. Otros pares de complemento/anticomplemento ejemplares incluyen pares de receptor/ligando, pares de anticuerpo/antígeno (o hapteno o epítipo), pares de polinucleótidos sentido/antisentido, y similares. Cuando es deseable la subsiguiente disociación del par de complemento/anticomplemento, el par de complemento/anticomplemento tiene preferiblemente una afinidad de unión $< 10^{-9}$ M.

15 *Contig*

Significa un polinucleótido que tiene un tramo contiguo de secuencia idéntica o complementaria con respecto a otro polinucleótido. Se dice que las secuencias contiguas "se solapan" en un tramo dado de secuencia polinucleotídica, sea en su totalidad o sea a lo largo de un tramo parcial del polinucleótido. Por ejemplo, son contigs representativos relativos a la secuencia polinucleotídica 5'-ATGGCTTAG-CTT-3': 5'-TAGCTTgagtct-3' y 3'-gtcgacTACCGA-5'.

20 *Complementos de moléculas polinucleotídicas*

Significa moléculas polinucleotídicas que tienen una secuencia de bases complementaria y una orientación inversa con respecto a una secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia 5' ATGCACGGG 3' es complementaria de 5' CCCGTGCAT 3'.

Secuencia de nucleótidos degenerada o secuencia degenerada

Significa una secuencia de nucleótidos que incluye uno o más codones degenerados (en comparación con una molécula polinucleotídica de referencia que codifica un polipéptido). Los codones degenerados contienen diferentes tripletes de nucleótidos pero codifican el mismo resto de aminoácido (es decir, tanto el triplete GAU como el GAC codifican Asp).

35 *Vector de expresión*

Una molécula de DNA, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés, operativamente enlazado con segmentos adicionales que proporcionan su transcripción. Tales segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación, y similares. Los vectores de expresión proceden generalmente de DNA plasmídico o vírico, o pueden contener elementos de ambos.

Isoforma

Se refiere a diferentes formas de una proteína que pueden ser producidas a partir de diferentes genes o a partir del mismo gen por remodelación alternativa. En algunos casos, las isoformas difieren en su actividad de transporte, tiempo de expresión en desarrollo, distribución tisular, situación en la célula o una combinación de estas propiedades.

Polinucleótido aislado

Significa que el polinucleótido ha sido extraído de su entorno genético natural y, por ello, carece de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas, y está en una forma adecuada para uso en sistemas de producción de proteínas genéticamente construidas. Dichas moléculas aisladas son aquellas que son separadas de su ambiente natural e incluyen clones de cDNA y genómicos. Las moléculas de DNA aisladas del presente invento carecen de otros genes con los que están normalmente asociadas, pero pueden incluir regiones 5' y 3' no traducidas presentes en la naturaleza, tales como promotores y terminadores. La identificación de regiones asociadas será evidente para quien tiene una experiencia normal en la técnica (véase, por ejemplo, Dynan y Tijan, *Nature* 316: 774-78, 1.985).

Polipéptido o proteína aislados

Es un polipéptido o proteína que se halla en un estado distinto de su ambiente nativo, tal como separado de la sangre y el tejido animal. En una forma preferida, el polipéptido aislado carece sustancialmente de otros polipéptidos, particularmente de otros polipéptidos de origen animal. Se prefiere obtener los polipéptidos en una forma muy purificada, es decir, con una pureza superior a 95%, más preferiblemente una pureza superior a 99%. Cuando se usa en este contexto, el término "aislado" no excluye la presencia del mismo polipéptido en formas físicas alternativas, tales como dímeros o formas alternativamente glicosiladas o derivatizadas.

Operativamente enlazado

Cuando se aplica a segmentos de nucleótidos, la expresión “operativamente enlazado” indica que los segmentos están dispuestos para que actúen de acuerdo a sus fines previstos; por ejemplo, la transcripción se inicia en el promotor y continúa a través del segmento de codificación hasta el terminador.

Ortólogo

Significa un polipéptido o una proteína obtenidos de una especie, que es la réplica funcional de un polipéptido o proteína de una especie diferente. Las diferencias de secuencia entre ortólogos son el resultado de la especiación.

Polinucleótido

Significa un polímero, de cadena sencilla o doble, de bases desoxirribonucleotídicas o ribonucleotídicas leídas del extremo 5' al 3'. Los polinucleótidos incluyen RNA y DNA, y pueden ser aislados de fuentes naturales, sintetizados *in vitro* o preparados a partir de una combinación de moléculas naturales y sintéticas. Los tamaños de los polinucleótidos se expresan en pares de bases (abreviado “bp”; del inglés, *base pairs*), nucleótidos (“nt”) o kilobases (“kb”). Cuando lo permite el contexto, los dos últimos términos pueden describir polinucleótidos que sean de cadena sencilla o cadena doble. Cuando el término se aplica a moléculas de cadena doble, se usa para significar la longitud global y se entenderá que es equivalente a la expresión “pares de bases”. Los expertos en la técnica reconocerán que las dos cadenas de un polinucleótido de cadena doble pueden diferir ligeramente en cuanto a longitud y que los extremos de las mismas pueden estar escalonados como resultado de escisión enzimática; por lo tanto, puede que no todos los nucleótidos de una molécula polinucleotídica de cadena doble estén emparejados. Dichos extremos desparejados tendrán una longitud que no excederá en general de 20 nt.

Polipéptido

Es un polímero de restos de aminoácido unidos por enlaces peptídicos, producido natural o sintéticamente. A los polipéptidos de menos de aproximadamente 10 restos de aminoácido se hace comúnmente referencia como “péptidos”.

Promotor

Significa una porción de un gen que contiene secuencias de DNA que proporcionan la unión de RNA polimerasa y la iniciación de la transcripción. Las secuencias promotoras se hallan comúnmente, aunque no siempre, en las regiones no codificadoras 5' de los genes.

Proteína

Es una macromolécula que comprende una o más cadenas polipeptídicas. Una proteína puede también comprender componentes no peptídicos, tales como grupos carbohidrato. Los carbohidratos y otros sustituyentes no peptídicos pueden ser añadidos a una proteína por la célula en que se produce la proteína, y variarán con el tipo de célula. Las proteínas se definen aquí en términos de sus estructuras de cadena principal aminoácida; no se especifican generalmente sustituyentes tales como grupos carbohidrato aunque, no obstante, puedan estar presentes.

Receptor

Una proteína asociada a la célula, o una subunidad polipeptídica de dicha proteína, que se une a una molécula bioactiva (el “ligando”) y media en el efecto del ligando sobre la célula. La unión del ligando al receptor da lugar a un cambio en el receptor (y, en ciertos casos, la multimerización del receptor, es decir, la asociación de subunidades idénticas o diferentes del receptor) que causa interacciones entre el(los) dominio(s) efector(es) del receptor y otra(s) molécula(s) en la célula. A su vez, estas interacciones conducen a alteraciones en el metabolismo de la célula. Los procesos metabólicos que están conectados con interacciones de receptor-ligando incluyen transcripción génica, fosforilación, desfosforilación, proliferación celular, aumentos de la producción de AMP cíclico, movilización de calcio celular, movilización de lípidos de membrana, adhesión celular, hidrólisis de inositol-lípidos e hidrólisis de fosfolípidos. BR43x2 tiene características de receptores de TNF, como aquí se discute con mayor detalle.

Secuencia señal secretora

Una secuencia de dna que codifica un polipéptido (un “péptido secretor”) que, como un componente de un polipéptido más grande, dirige al polipéptido más grande a través de una ruta secretora de una célula en que es sintetizado. El polipéptido más grande es comúnmente escindido para que se separe el péptido secretor durante el tránsito a través de la ruta secretora.

Receptor soluble

Un polipéptido receptor que no está unido a una membrana celular. Los receptores solubles son muy comúnmente polipéptidos receptores ligantes de ligandos, que carecen de dominios transmembranales y citoplásmicos. Los receptores solubles pueden comprender restos de aminoácido adicionales, tales como etiquetas de afinidad que permiten

la purificación del polipéptido o proporcionan sitios para la fijación del polipéptido a un sustrato. Muchos receptores de la superficie celular tienen remodos solubles, presentes en la naturaleza, que son producidos por proteólisis o son traducidos de mRNAs alternativamente remodelados. Se dice que los polipéptidos receptores carecen sustancialmente de segmentos polipeptídicos transmembranales e intracelulares cuando carecen de suficientes porciones de esos segmentos que proporcionen el anclaje a la membrana o la transducción de señales, respectivamente.

Se entenderá que los pesos y longitudes moleculares de polímeros determinados mediante métodos analíticos inexactos (por ejemplo, electroforesis en gel) son valores aproximados. Cuando tal valor se expresa como “aproximadamente” X, se entenderá que el valor expuesto de X es exacto hasta $\pm 10\%$.

Todas las referencias aquí citadas se incorporan por referencia en su totalidad.

El presente invento se basa en parte en el descubrimiento de una secuencia de DNA de 1.192 bp (ID. SEC. n° 1) y la correspondiente secuencia polipeptídica (ID. SEC. n° 2) que es una isoforma del receptor TACI. La isoforma ha sido denominada BR43x2. Se describe una forma soluble de BR43x2 en la ID. SEC. n° 4, el polinucleótido que codifica el receptor soluble en la ID. SEC. n° 3. Como aquí se describe con mayor detalle, los polipéptidos y polinucleótidos que codifican el receptor BR43x2 del presente invento fueron inicialmente identificados por clonación con trampa de señales usando una librería humana de RPMI 1788 y el ligando del factor de necrosis tumoral, znf4, ahora conocido como neutroquina α (WIPO, WO98/18921), BLyS (Moore et al., ibídem), BAFF (Schneider et al., ibídem), TALL-1 (Shu et al., ibídem) o THANK (Mukhopadhyay et al., ibídem), N- o C-terminalmente etiquetado con FLAG y marcado con biotina o isotiocianato de fluoresceína (FITC; del inglés, fluorescein isothiocyanate). Las colecciones positivas fueron identificadas por unión de ligandos y fueron separadas en clones individuales, y el cDNA fue aislado y secuenciado. Una comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de BR43x2 (como se representa en la ID. SEC. n° 2) con la de receptores conocidos del factor de necrosis tumoral indicó que BR43x2 es una isoforma de TACI, que tiene una única y mal conservada seudorrepetición rica en cisteína.

Estructuralmente, la familia de receptores del TNF se caracteriza por una porción extracelular compuesta de varios módulos históricamente llamados “seudorrepeticiones ricas en cisteína”. Un miembro prototípico de la familia de TNFR tiene cuatro de estas seudorrepeticiones, cada una de aproximadamente 29-43 restos de longitud, una justo detrás de la otra. Una seudorrepetición típica tiene 6 restos de cisteína. Son llamadas seudorrepeticiones porque, aunque parecen tener su origen en un módulo ancestral común, no se repiten exactamente: las seudorrepeticiones n° 1, n° 2, n° 3 y n° 4 tienen rasgos de secuencia característicos que las distinguen entre sí. La estructura cristalina del receptor p55 de TNF reveló que cada seudorrepetición corresponde a un dominio plegable y que las cuatro seudorrepeticiones se pliegan en la misma estructura terciaria, manteniéndose internamente unidas por enlaces disulfuro.

TACI contiene dos seudorrepeticiones ricas en cisteína (von Bülow y Bram, ibídem): la primera está conservada en cuanto a estructura con otros miembros de la familia de receptores del TNF, y la segunda está menos conservada. La isoforma BR43x2 del presente invento carece de la primera seudorrepetición rica en cisteína de TACI, reteniendo sólo la segunda, la repetición menos conservada.

El análisis de secuencia de una secuencia deducida de aminoácidos de BR43x2, como se representa en la ID. SEC. n° 2, indica la presencia de una proteína madura que tiene un dominio extracelular (restos 1-120 de la ID. SEC. n° 2) que contiene una seudorrepetición rica en cisteína (restos 25-58 de la ID. SEC. n° 2), un dominio transmembranal (restos 121-133 de la ID. SEC. n° 2) y un dominio citoplásmico (restos 134-247 de la ID. SEC. n° 2). La seudorrepetición rica en cisteína de BR43x2 tiene 6 restos de cisteína conservados (restos 25, 40, 43, 47, 54 y 58 de la ID. SEC. n° 2), un resto de ácido aspártico conservado (resto 34 de la ID. SEC. n° 2) y dos restos de leucina conservados (restos 36 y 37 de la ID. SEC. n° 2), y comparte una identidad del 46% con la primera seudorrepetición rica en cisteína de TACI (ID. SEC. n° 6) y una identidad del 35% con la seudorrepetición rica en cisteína de BCMA (ID. SEC. n° 8) (Figura 1). La seudorrepetición rica en cisteína puede ser representada mediante el motivo siguiente:

CX [QEK] [QEKNRDHS] [QE] X {0-2} [YFW] [YFW] DXLLX {2} C [IMLV] XCX {3} CX {6-8} CX {2} [YF] C (ID. SEC. n° 10),

en el que C representa el resto de aminoácido cisteína, Q glutamina, E ácido glutámico, K lisina, N asparagina, R arginina, D ácido aspártico, H histidina, S serina, Y tirosina, F fenilalanina, W triptófano, L leucina, I isoleucina y V valina, y X representa cualquier resto de aminoácido presente en la naturaleza salvo cisteína. Los restos de aminoácido entre corchetes “[]” indican la variación de restos de aminoácido permitidos en esa posición. El número entre llaves “{ }” indica el número de restos de aminoácido permitidos en esa posición.

El presente invento también proporciona polipéptidos solubles con una longitud de 32 a 40 restos de aminoácido, como el proporcionado por la ID. SEC. n° 10.

El receptor soluble BR43x2, como es representado por los restos 1-120 de la ID. SEC. n° 4, contiene una seudorrepetición rica en cisteína (restos 25-58 de la ID. SEC. n° 4) y carece de los dominios transmembranal y citoplásmico de BR43x2, como se describe en la ID. SEC. n° 2.

ES 2 204 502 T3

Los expertos en la técnica reconocerán que estos límites de dominio son aproximados y se basan en alineaciones con proteínas conocidas y predicciones de plegadura de la proteína. Estas características indican que el receptor codificado por las secuencias de DNA de ID. SEC. n^{os} 1 y 3 es un miembro de la familia de receptores del TNF.

El análisis, por transferencia Northern y transferencia en forma de manchas, de la distribución tisular del mRNA que corresponde a sondas nucleotídicas hacia BR43x1 que están previstas para detectar la expresión de BR43x2 mostró expresión en bazo, ganglio linfático, células CD19+, débilmente en células que presentan reacción mixta de linfocitos (MLR; del inglés, mixed lymphocyte reaction), células Daudi y células Raji. Usando reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, polymerase chain reaction)-transcriptasa inversa, se detectó BR43x1 sólo en células B y no en células T activadas, como había sido comunicado para TACI (von Bülow y Bram, *ibídem*). Usando una sonda para BR43x2 que solapa al 100% con la correspondiente secuencia de TACI, se detectaron TACI y BR43x2 en bazo, ganglio linfático e intestino delgado, estómago, glándula salival, apéndice, pulmón, médula ósea, bazo fetal, células CD19⁺ y células Raji.

Usando análisis por transferencia Northern, se detectó BCMA en intestino delgado, bazo, estómago, colon, apéndice, ganglio linfático, tráquea y testículo. También se detectó BCMA en adenocarcinoma, linfoma no Hodgkin y tumor parotídeo, y se detectó tenuemente en células CD8⁺, CD19⁺, MLR, Daudi, Raji y Hut-78.

También se realizó un análisis por transferencia Northern usando ztnf4 murino (ID. SEC. n^o 19), y, como con TACI, BCMA y BR43x2 humanos, la expresión de ztnf4 murino se detectó predominantemente en bazo y timo. También se expresaba ztnf4 murino en pulmón y se detectó una tenue expresión en piel y corazón.

El presente invento también proporciona moléculas polinucleotídicas, incluyendo moléculas de DNA y RNA, que codifican los polipéptidos BR43x2 aquí descritos. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que, a la vista de la degeneración del código genético, es posible una considerable variación de secuencias entre estas moléculas polinucleotídicas. La ID. SEC. n^o 11 es una secuencia de DNA degenerada que abarca todos los DNAs que codifican el polipéptido soluble BR43x2 de ID. SEC. n^o 4. Similarmente, la ID. SEC. n^o 12 es una secuencia de DNA degenerada que abarca todos los DNAs que codifican el polipéptido BR43x2 de ID. SEC. n^o 2. Los expertos en la técnica reconocerán que la secuencia degenerada de ID. SEC. n^o 12 también proporciona todas las secuencias de RNA que codifican la ID. SEC. n^o 4 sustituyendo T por U. De este modo, los polinucleótidos que codifican el polipéptido BR43x2 y comprenden del nucleótido 1 al nucleótido 360 de la ID. SEC. n^o 11, del nucleótido 1 al 741 de la ID. SEC. n^o 12 y sus equivalentes de RNA están contemplados por el presente invento. En la Tabla 1 se exponen los códigos de una letra usados en las ID. SEC. n^{os} 11 y 12 para representar posiciones nucleotídicas degeneradas. "Resoluciones" son los nucleótidos representados por una letra del código. "Complemento" indica el código para el(los) nucleótido(s) complementario(s). Por ejemplo, el código Y representa C o T, y su complemento R representa A o G, siendo A complementario de T y siendo G complementario de C.

TABLA 1

Nucleótido	Resolución	Complemento	Resolución
A	A	T	T
C	C	G	G
G	G	C	C
T	T	A	A
R	A/G	Y	C/T
Y	C/T	R	A/G
M	A/C	K	G/T
K	G/T	M	A/C
S	C/G	S	C/G
W	A/T	W	A/T
H	A/C/T	D	A/G/T
B	C/G/T	V	A/C/G
V	A/C/G	B	C/G/T
D	A/G/T	H	A/C/T
N	A/C/G/T	N	A/C/G/T

En la Tabla 2 se exponen los codones degenerados utilizados en las ID. SEC. n^{os} 11 y 12, que abarcan todos los posibles codones para un aminoácido dado.

ES 2 204 502 T3

TABLA 2

	Aminoácido	Código de una letra	Codones	Codón degenerado
5	Cys	C	TGC TGT	TGY
	Ser	S	AGC AGT TCA TCC TCG TCT	WSN
	Thr	T	ACA ACC ACG ACT	ACN
	Pro	P	CCA CCC CCG CCT	CCN
10	Ala	A	GCA GCC GCG GCT	GCN
	Gly	G	GGA GGC GGG GGT	GGN
	Asn	N	AAC AAT	AAY
	Asp	D	GAC GAT	GAY
15	Glu	E	GAA GAG	GAR
	Gln	Q	CAA CAG	CAR
	His	H	CAC CAT	CAY
	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGT	MGN
20	Lys	K	AAA AAG	AAR
	Met	M	ATG	ATG
	Ile	I	ATA ATC ATT	ATH
	Leu	L	CTA CTC CTG CTT TTA TTG	YTN
	Val	V	GTA GTC GTG GTT	GTN
25	Phe	F	TTC TTT	TTY
	Tyr	Y	TAC TAT	TAY
	Trp	W	TGG	TGG
	Ter	.	TAA TAG TGA	TRR
30	Asn/Asp	B		RAY
	Glu/Gln	Z		SAR
	Cualquiera	X		NNN

35 Quien tiene una experiencia normal en la técnica apreciará que se introduce cierta ambigüedad a la hora de determinar un codón degenerado, representativo de todos los posibles codones que codifican cada aminoácido. Por ejemplo, el
 40 codón degenerado para serina (WSN) puede, en algunas circunstancias, codificar arginina (AGR), y el codón degenerado para arginina (MGN) puede, en algunas circunstancias, codificar serina (AGY). Existe una relación similar entre los codones que codifican fenilalanina y leucina. De este modo, algunos polinucleótidos abarcados por la secuencia
 45 degenerada pueden codificar secuencias de aminoácidos variantes, aunque quien tiene una experiencia normal en la técnica puede identificar fácilmente dichas secuencias variantes por referencia a las secuencias de aminoácidos de las ID. SEC. n^{os} 2 y 4. Las secuencias variantes pueden ser fácilmente ensayadas en cuanto a funcionalidad del modo aquí descrito.

45 Quien tiene una experiencia normal en la técnica también apreciará que especies diferentes pueden presentar “utilización de codones preferentes”; véanse, en general, Grantham et al., *Nuc. Acids Res.* 8: 1.893-912, 1.980; Haas et al., *Curr. Biol.* 6: 315-24, 1.996; Wain-Hobson et al., *Gene* 13: 355-64, 1.981; Grosjean y Fiers, *Gene* 18: 199-209, 1.982; Holm, *Nuc. Acids Res.* 14: 3.075-87, 1.986; e Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158: 573-97, 1.982. Como se usa
 50 aquí, la expresión “utilización de codones preferentes” o “codones preferentes” es una expresión de la técnica que se refiere a los codones de traducción a proteínas que son más frecuentemente usados en las células de ciertas especies, favoreciéndose por ello uno o algunos codones representativos de los posibles codones que codifican cada aminoácido
 55 (véase la Tabla 2). Por ejemplo, el aminoácido treonina (Thr) puede ser codificado por ACA, ACC, ACG o ACT pero, en células de mamífero, ACC es el codón más comúnmente usado; en otras especies, tales como, por ejemplo, células de insectos, levaduras, virus o bacterias, codones de Thr diferentes pueden ser preferentes. Codones preferentes para una especie particular pueden ser introducidos en los polinucleótidos del presente invento mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. La introducción de secuencias de codones preferentes en DNA recombinante puede,
 60 por ejemplo, potenciar la producción de la proteína al hacer que la traducción a proteína sea más eficaz en un tipo celular o una especie particulares. Por lo tanto, las secuencias de codones degenerados descritas en las ID. SEC. n^{os} 11 y 12 sirven como un molde para optimizar la expresión de polinucleótidos en diversos tipos celulares y especies comúnmente usados en la técnica y aquí descritos. Las secuencias que contienen codones preferentes pueden ser ensayadas y optimizadas en cuanto a expresión en diversas especies, y ensayadas en cuanto a funcionalidad del modo aquí descrito.

65 Los aminoácidos muy conservados de laseudorrepeticón rica en cisteína de BR43x2 pueden ser usados como una herramienta para identificar nuevos miembros de la familia. Por ejemplo, puede usarse transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR; del inglés, reverse transcription-PCR) para multiplicar secuencias que codifican el dominio extracelular ligante de ligandos, anteriormente descrito, a partir de RNA obtenido de una diversidad de

fuentes tisulares o líneas celulares. En particular, son útiles para este fin los cebadores muy degenerados diseñados a partir de las secuencias de BR43x2.

En realizaciones preferidas del invento, polinucleótidos aislados se hibridarán con regiones de tamaño similar de la ID. SEC. n° 3 o con una secuencia complementaria de las mismas, bajo condiciones rigurosas. En general, se seleccionan condiciones rigurosas para que la temperatura sea aproximadamente 5°C menor que el punto de fusión térmica (T_m) de la secuencia específica a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50% de la secuencia diana se hibrida con una sonda que presenta un apareamiento perfecto. Son condiciones rigurosas típicas aquéllas en que la concentración de sal es hasta aproximadamente 0,03 M a un pH de 7 y la temperatura es al menos aproximadamente 60°C.

Como se indicó previamente, los polinucleótidos aislados del presente invento incluyen DNA y RNA. Los métodos para aislar DNA y RNA son bien conocidos en la técnica. Se prefiere generalmente aislar RNA de células RPMI 1788, células mononucleares de sangre periférica (PBMNC; del inglés, *peripheral blood mononuclear cell*), células B transfectadas en reposo o activadas o tejido amigdalino, aunque el DNA puede también ser preparado usando RNA de otros tejidos o ser aislado como DNA genómico. Puede prepararse RNA total usando extracción con guanidina HCl, seguida de aislamiento por centrifugación en gradiente de CsCl (Chirgwin et al., *Biochemistry* 18: 52-94, 1.979). Se prepara Poli(A) + RNA a partir de RNA total usando el método de Aviv y Leder (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1.408-12, 1.972). Se prepara DNA complementario (cDNA) a partir de Poli(A) + RNA usando métodos conocidos. Los polinucleótidos que codifican polipéptidos BR43x2 son luego identificados y aislados mediante, por ejemplo, hibridación o PCR.

Los expertos en la técnica reconocerán que las secuencias descritas en las ID. SEC. n°s 1 y 3 representan un único alelo del gen humano y que se espera que tenga lugar variación alélica y remodelación alternativa. Las variantes alélicas de las secuencias de DNA mostradas en las ID. SEC. n°s 1 y 3, incluyendo aquéllas que contienen mutaciones silenciosas y aquéllas en que las mutaciones dan lugar a cambios en la secuencia de aminoácidos, están dentro del alcance del presente invento, como lo están las proteínas que son variantes alélicas de las ID. SEC. n°s 2 y 4. Las variantes alélicas y variantes de remodelación de estas secuencias pueden ser clonadas al sondear librerías de cDNA o genómicas procedentes de diferentes individuos o tejidos, de acuerdo con procedimientos estándares conocidos en la técnica.

Los polipéptidos receptores del presente invento, incluyendo polipéptidos receptores de longitud completa, polipéptidos receptores solubles, fragmentos polipeptídicos y polipéptidos de fusión, pueden ser producidos de acuerdo con técnicas convencionales en células huésped genéticamente creadas. Son células huésped adecuadas los tipos celulares que pueden ser transformados o transfectados con DNA exógeno y ser desarrollados en cultivo, e incluyen bacterias, células fúngicas, y células eucarióticas superiores en cultivo. Se prefieren las células eucarióticas, particularmente células cultivadas de organismos multicelulares. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU., 1.989, y Ausubel et al., redactores, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, EE.UU., 1.987, describen técnicas para manipular moléculas de DNA clonadas e introducir DNA exógeno en una diversidad de células huésped.

En general, una secuencia de DNA que codifica un polipéptido BR43x2 está operativamente enlazada a otros elementos genéticos requeridos para su expresión, que incluyen generalmente un promotor y un terminador de transcripción, dentro de un vector de expresión. El vector también contendrá comúnmente uno o más marcadores seleccionables y uno o más orígenes de replicación, aunque los expertos en la técnica reconocerán que, en ciertos sistemas, los marcadores seleccionables pueden disponerse en vectores separados y que la replicación del DNA exógeno puede obtenerse por integración en el genoma de la célula huésped. La selección de promotores, terminadores, marcadores seleccionables, vectores y otros elementos es una cuestión de proyecto rutinario dentro del nivel de experiencia normal en la técnica. Muchos de tales elementos son descritos en la bibliografía y son asequibles de proveedores comerciales.

Para dirigir un polipéptido BR43x2 a la ruta secretora de una célula huésped, se proporciona una secuencia señal secretora (también conocida como secuencias señal, secuencia líder, preprosecuencia o presecuencia) en el vector de expresión. La secuencia señal secretora puede ser la del polipéptido BR43x2 o puede proceder de otra proteína secretada (por ejemplo, t-PA) o ser sintetizada *de novo*. La secuencia señal secretora es unida a la secuencia de DNA de BR43x2 en el marco de lectura correcto y es colocada para que dirija el polipéptido recién sintetizado a la ruta secretora de la célula huésped. Las secuencias señal secretoras se colocan comúnmente en 5' con respecto a la secuencia de DNA que codifica el polipéptido de interés, aunque ciertas secuencias señal pueden ser colocadas en otro sitio de la secuencia de DNA de interés (véanse, por ejemplo, Welch et al., Patente de EE.UU. n° 5.037.743, y Holland et al., Patente de EE.UU. n° 5.143.830).

Las células de mamífero en cultivo son huéspedes adecuados en el presente invento. Los métodos para introducir DNA exógeno en células huésped de mamífero incluyen transfección mediada por fosfato cálcico (Wigler et al., *Cell* 14: 725, 1.978; Corsaro y Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7: 603, 1.981; y Graham y Van der Eb, *Virology* 52: 456, 1.973), electroporación (Neumann et al., *EMBO J.* 1: 841-45, 1.982), transfección mediada por dietilaminoetil (DEAE)-dextrano (Ausubel et al., *ibidem*), y transfección mediada por liposomas (Hawley-Nelson et al., *Focus* 15: 73, 1.993; y Ciccarone et al., *Focus* 15: 80, 1.993). La producción de polipéptidos recombinantes en células de mamífero en cultivo es descrita, por ejemplo, por Levinson et al., Patente de EE.UU. n° 4.713.339; Hagen et al., Patente de EE.UU. n° 4.784.950; Palmiter et al., Patente de EE.UU. n° 4.579.821; y Ringold, Patente de EE.UU. n° 4.656.134.

Las células de mamífero en cultivo adecuadas incluyen las células COS-1 (ATCC n° CRL 1650), COS-7 (ATCC n° CRL 1651), BHK (ATCC n° CRL 1632), BHK 570 (ATCC n° CRL 10314), 293 (ATCC n° CRL 1573; Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36: 59-72, 1.977), Jurkat (ATCC n° CRL-8129), BaF3 (una línea celular prelinfoide dependiente de la interleuquina 3, procedente de médula ósea murina; véanse Palacios y Steinmetz, *Cell* 41: 727-34, 1.985, y Matthey-Prevot et al., *Mol. Cell. Biol.* 6: 4.133-5, 1.986) y líneas celulares de ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1, ATCC n° CCL 61). Líneas celulares adecuadas adicionales son conocidas en la técnica y son asequibles de depositarias públicas tales como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; del inglés, American Type Culture Collection), Rockville, Maryland, EE.UU. En general, se prefieren promotores de transcripción potentes, tales como promotores del virus 40 de simios (SV-40; del inglés, simian virus 40) o citomegalovirus; véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. n° 4.956.288. Otros promotores adecuados incluyen los de genes de la metalotioneína (Patentes de EE.UU. n°s 4.579.821 y 4.601.978) y el promotor tardío principal de adenovirus.

Se usa generalmente la selección por fármacos para seleccionar las células de mamífero en cultivo en que se ha insertado DNA extraño. A dichas células se hace comúnmente referencia como “transfectantes”. A las células que han sido cultivadas en presencia del agente selectivo y son capaces de pasar el gen de interés a su progenie se hace referencia como “transfectantes estables”. Un marcador seleccionable preferido es un gen que codifica resistencia al antibiótico neomicina. La selección es llevada a cabo en presencia de un fármaco de tipo neomicina, tal como G-418 o similar. Pueden usarse también sistemas de selección para aumentar el nivel de expresión del gen de interés, un procedimiento al que se hace referencia como “multiplicación”. La multiplicación es llevada a cabo cultivando transfectantes en presencia de un bajo nivel del agente selectivo y aumentando luego la cantidad de agente selectivo para seleccionar las células que producen niveles elevados de los productos de los genes introducidos. Un marcador seleccionable y multiplicable preferido es la dihidrofolato reductasa (DHFR), que confiere resistencia al metotrexato. Pueden usarse también otros genes de resistencia a fármacos (por ejemplo, resistencia a higromicina, resistencia a múltiples fármacos, y puromicina acetiltransferasa). Pueden usarse marcadores alternativos que introducen un fenotipo alterado, tal como la proteína fluorescente verde, o proteínas de la superficie celular, tales como CD4, CD8, proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC; del inglés, major histocompatibility complex) de Clase I, y fosfatasa alcalina placentaria, para diferenciar células transfectadas de células no transfectadas por medios tales como la clasificación por fluorescencia de células activadas (FACS; del inglés, fluorescence activated cell sorting) o la tecnología de separación por glóbulos magnéticos.

Pueden usarse también otras células eucarióticas superiores como huéspedes, incluyendo células vegetales, células de insecto y células aviares. El uso de *Agrobacterium rhizogenes* como un vector para expresar genes en células vegetales ha sido revisado por Sinkar et al., *J. Biosci. (Bangalore)* 11: 47-58, 1.987. La transformación de células de insecto y la producción de polipéptidos extraños en ellas son descritas por Guarino et al., Patente de EE.UU. n° 5.162.222 y la publicación WIPO WO 94/06463. Las células de insecto pueden ser infectadas con un baculovirus recombinante, comúnmente procedente del virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV; del inglés, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus); véanse King y Possee, *The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide*, Londres, Chapman & Hall; O'Reilly et al., *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*, New York, Oxford University Press, 1.994; y Richardson, redactor, *Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology*, Totowa, New Jersey, EE.UU., Humana Press, 1.995. En un segundo método para preparar un baculovirus con BR43x2 recombinante se usa un sistema basado en transposones descrito por Luckow (Luckow et al., *J. Virol.* 67: 4.566-79, 1.993). Este sistema, en el que se utilizan vectores de transferencia, es vendido en el conjunto Bac-to-Bac™ (Life Technologies, Rockville, Maryland, EE.UU.). En este sistema se utiliza un vector de transferencia, pFastBac1™ (Life Technologies), que contiene un transposón Tn7 para introducir el DNA que codifica el polipéptido BR43x2 en un genoma de baculovirus mantenido en *E. coli* como un plásmido grande llamado “bácmido”; véanse, Hill-Perkins y Possee, *J. Gen. Virol.* 71: 971-6, 1.990; Bonning et al., *J. Gen. Virol.* 75: 1.551-6, 1.994; y Chazenbalk y Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270: 1.543-9, 1.995. Además, los vectores de transferencia pueden incluir una fusión en marco con DNA que codifica una etiqueta epitópica en el extremo C o N del polipéptido BR43x2 expresado, por ejemplo, una etiqueta epitópica Glu-Glu (Grussenmeyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7.952-4, 1.985). Usando una técnica conocida en este campo técnico, se transforma *E. coli* con un vector de transferencia que contiene BR43x2 y se explora el vector en cuanto a bácmidos que contienen un gen LacZ interrumpido, indicativo de baculovirus recombinante. El DNA bacmídico que contiene el genoma de baculovirus recombinante es aislado usando técnicas habituales y es usado para transfectar células de *Spodoptera frugiperda*, por ejemplo, células Sf9. Posteriormente se produce el virus recombinante que expresa BR43x2. Se preparan reservas víricas recombinantes mediante métodos comúnmente usados en la técnica.

El virus recombinante es usado para infectar células huésped, típicamente una línea celular procedente del gusano cogollero del maíz, *Spodoptera frugiperda*; véase, en general, Glick y Pasternak, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, Washington, Distrito de Columbia, EE.UU., 1.994. Otra línea celular adecuada es la línea celular High FiveO™ (Invitrogen) procedente de *Trichoplusia ni* (Patente de EE.UU. n° 5.300.435). Se usan medios exentos de suero comercialmente asequibles para desarrollar y mantener las células. Son medios adecuados: Sf900 II™ (Life Technologies) y ESF 921™ (Expression Systems) para las células Sf9, y Ex-cello405™ (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, EE.UU.) y Express FiveO™ (Life Technologies) para las células de *T. ni*. Las células son desarrolladas desde una densidad de inoculación de aproximadamente 2-5 x 10⁵ células hasta una densidad de 1-2 x 10⁶ células, momento en que una reserva vírica recombinante es añadida con una multiplicidad de infección (MOI; del inglés, multiplicity of infection) de 0,1 a 10, más típicamente próxima a 3. Los procedimientos usados son generalmente descritos en manuales de laboratorio asequibles (King y Possee, *ibidem*; O'Reilly et al.,

ibídem; Richardson, ibídem). La subsiguiente purificación del polipéptido BR43x2 a partir del sobrenadante puede realizarse usando métodos aquí descritos.

Pueden también usarse células fúngicas, incluyendo células de levadura, en el presente invento. Las especies de levadura de particular interés a este respecto incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Pichia methanolic*. Métodos para transformar células de *S. cerevisiae* con DNA exógeno y producir polipéptidos recombinantes a partir de las mismas son descritos, por ejemplo, por Kawasaki, Patente de EE.UU. n° 4.599.311; Kawasaki et al., Patente de EE.UU. n° 4.931.373; Brake, Patente de EE.UU. n° 4.870.008; Welch et al., Patente de EE.UU. n° 5.037.743; y Murray et al., Patente de EE.UU. n° 4.845.075. Las células transformadas son seleccionadas mediante el fenotipo determinado por el marcador seleccionable, comúnmente la resistencia a fármacos o la capacidad para crecer en ausencia de un nutriente concreto (por ejemplo, leucina). Un sistema vector preferido para uso en *Saccharomyces cerevisiae* es el sistema vector *POT1* descrito por Kawasaki et al. (Patente de EE.UU. n° 4.931.373), que permite que las células transformadas sean seleccionadas mediante crecimiento en medios que contienen glucosa. Los promotores y terminadores adecuados para uso en levadura incluyen los de genes de enzimas glicolíticas (véanse, por ejemplo, Kawasaki, Patente de EE.UU. n° 4.599.311; Kingsman et al., Patente de EE.UU. n° 4.615.974; y Bitter, Patente de EE.UU. n° 4.977.092) y genes de alcohol deshidrogenasa; véanse también las Patentes de EE.UU. números 4.990.446, 5.063.154, 5.139.936 y 4.661.454. En la técnica se conocen sistemas de transformación para otras levaduras, incluyendo *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolic*, *Pichia guilliermondii* y *Candida maltosa*; véanse, por ejemplo, Gleeson et al., *J. Gen. Microbiol.* 132: 3.459-65, 1.986, y Cregg, Patente de EE.UU. n° 4.882.279. Pueden utilizarse células de *Aspergillus* de acuerdo con los métodos de McKnight et al., Patente de EE.UU. n° 4.935.349. Sumino et al., Patente de EE.UU. n° 5.162.228, describen métodos para transformar *Acremonium chrysogenum*. Lambowitz, Patente de EE.UU. n° 4.486.533, describe métodos para transformar *Neurospora*.

Por ejemplo, el uso de *Pichia methanolic* como huésped para la producción de proteínas recombinantes es descrito por Raymond, Patente de EE.UU. n° 5.716.808, Raymond, Patente de EE.UU. n° 5.736.383, Raymond et al., *Yeast* 14: 11-23, 1.998, y en la publicaciones internacionales n°s WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536 y WO 98/02565. Las moléculas de DNA para uso en la transformación de *P. methanolic* serán comúnmente preparadas como plásmidos circulares de doble cadena que son preferiblemente linealizados antes de la transformación. Para la producción de polipéptidos en *P. methanolic*, se prefiere que el promotor y el terminador del plásmido sean los de un gen de *P. methanolic*, tal como un gen de utilización de alcohol de *P. methanolic* (*AUG1* o *AUG2*). Otros promotores útiles incluyen los de los genes de dihidroxiacetona sintetasa (DHAS), formiato deshidrogenasa (FMD) y catalasa (CAT). Para facilitar la integración del DNA en el cromosoma huésped, se prefiere tener el segmento de expresión completo del plásmido flanqueado por secuencias de DNA huésped en ambos extremos. Un marcador seleccionable preferido para utilización en *Pichia methanolic* es un gen *ADE2* de *P. methanolic*, que codifica fosforribosil-5-aminoimidazol carboxilasa (AIRC; EC 4.1.1.21), que permite que células huésped *ade2* se desarrollen en ausencia de adenina. Para procesos industriales a gran escala en que es deseable minimizar el uso de metanol, se prefiere usar células huésped en que estén suprimidos ambos genes de utilización de metanol (*AUG1* y *AUG2*). Para la producción de proteínas secretadas, se prefieren células huésped deficientes en cuanto a genes de proteasas vacuolares (*PEP4* y *PRB1*). Se usa electroporación para facilitar la introducción de un plásmido que contiene DNA que codifica un polipéptido de interés en células de *P. methanolic*. Se prefiere transformar células de *P. methanolic* por electroporación usando un campo eléctrico de impulsos, que decae exponencialmente, que tiene una intensidad de campo de 2,5 a 4,5 kV/cm, preferiblemente de aproximadamente 3,75 kV/cm, y una constante de tiempo (t) de 1 a 40 milisegundos, muy preferiblemente de aproximadamente 20 milisegundos.

Las células huésped procarióticas, incluyendo cepas de las bacterias *Escherichia coli*, *Bacillus* y otros géneros, son también células huésped útiles en el presente invento. Las técnicas para transformar estos huéspedes y hacer que se expresen secuencias de DNA extrañas en ellos clonadas son bien conocidas en este campo técnico (véase, por ejemplo, Sambrook et al., ibídem). Cuando se expresa un polipéptido BR43x2 en bacterias tales como *E. coli*, el polipéptido puede quedar retenido en el citoplasma, típicamente como gránulos insolubles, o puede ser dirigido al espacio periplásmico por una secuencia de secreción bacteriana. En el primer caso, las células son lisadas y los gránulos son recuperados y son desnaturalizados usando, por ejemplo, urea o isotiocianato de guanidina. El polipéptido desnaturalizado puede luego volverse a plegar y dimerizarse al diluir el agente desnaturalizante, tal como mediante diálisis frente a una disolución de urea y una combinación de glutatión reducido y oxidado, seguida de diálisis frente a una disolución salina tamponada. En el segundo caso, el polipéptido puede ser recuperado del espacio periplásmico en una forma soluble y funcional al romper las células (mediante, por ejemplo, sonicación o choque osmótico) para que liberen los contenidos del espacio periplásmico y recuperar la proteína, obviándose por ello la necesidad de desnaturalización y replegadura.

Las células huésped transformadas o transfectadas son cultivadas de acuerdo con procedimientos convencionales en un medio de cultivo que contiene nutrientes y otros componentes requeridos para el desarrollo de las células huésped escogidas. En la técnica se conoce una diversidad de medios adecuados, incluyendo medios definidos y medios complejos, medios que incluyen generalmente una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. Los medios pueden también contener componentes tales como factores de crecimiento o suero, según se requiera. El medio de desarrollo seleccionará generalmente las células que contengan el DNA exógenamente añadido, mediante, por ejemplo, selección por fármacos o deficiencia en un nutriente esencial que es complementado por el marcador seleccionable llevado por el vector de expresión o introducido por cotransfección en la célula huésped. Las células de *P. methanolic* son cultivadas en un medio que comprende fuentes adecuadas de carbono, nitrógeno

y oligonutrientes a una temperatura de aproximadamente 25°C a 35°C. Los cultivos líquidos son provistos de una aireación suficiente por medios convencionales, tales como el sacudimiento de pequeños matraces o el burbujeo en fermentadores. Un medio de cultivo preferido para *P. methanolicus* es YEPD [D-glucosa al 2%, peptona Bacto™ (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE.UU.) al 2%, extracto de levadura Bacto™ (Difco Laboratories) al 1%, adenina al 0,004% y L-leucina al 0,006%].

Los polipéptidos BR43x2 recombinantes expresados (o polipéptidos BR43x2 quiméricos o de fusión) pueden ser purificados usando fraccionamiento y/o métodos y medios para purificación convencionales. Se prefiere obtener las proteínas o polipéptidos del presente invento en una forma muy purificada, es decir, con una pureza superior a 95%, más preferiblemente superior a 99%. Pueden usarse precipitación por sulfato amónico y extracción por ácidos o agentes caotrópicos para el fraccionamiento de las muestras. Las operaciones de purificación ejemplares pueden incluir hidroxipatito, exclusión por tamaños, cromatografía líquida de resolución rápida para proteínas y cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa. Los medios de intercambio aniónico adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices especiales, y similares. Se prefieren los derivados de PEI, DEAE, QAE y Q, siendo particularmente preferido el DEAE Fast-Flow Sepharose (Pharmacia, Piscataway, New Jersey, EE.UU.). Los medios cromatográficos ejemplares incluyen los medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl Butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, Pennsylvania, EE.UU.), Octyl-Sepharose (Pharmacia) y similares; y resinas poliacrílicas tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Los soportes sólidos adecuados incluyen glóbulos de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, glóbulos de agarosa, glóbulos de agarosa reticulada, glóbulos de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticulada y similares, que son insolubles bajo las condiciones en que se van a usar. Estos soportes pueden ser modificados con grupos reactivos que permiten la fijación de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de carbohidrato. Los ejemplos de químicas de copulación incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida, y derivados carboxílicos y amínicos para químicas de copulación con carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son bien conocidos y ampliamente usados en la técnica, y son asequibles de proveedores comerciales. Los métodos para unir polipéptidos receptores a medios de soporte son bien conocidos en la técnica. La selección de un método concreto es una cuestión de diseño rutinario y viene determinada en parte por las propiedades del soporte elegido; véase, por ejemplo, *Affinity Chromatography: Principles Methods*, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1.988.

Los polipéptidos del presente invento pueden ser aislados por explotación de sus propiedades físicas. Por ejemplo, puede usarse cromatografía de adsorción sobre iones metálicos inmovilizados (IMAC; del *immobilized metal ion adsorption chromatography*) para purificar proteínas ricas en histidina, incluyendo las que comprenden etiquetas de polihistidina. En resumen, se carga primero un gel con iones metálicos divalentes para formar un quelato (Sulkowski, *Trends in Biochem. Sci.* 3: 1-7, 1.985). Las proteínas ricas en histidina quedarán adsorbidas en esta matriz con diferentes afinidades, que dependerán del ion metálico usado, y serán eluidas por elución competitiva, reducción del pH o uso de agentes quelantes fuertes. Otros métodos de purificación incluyen la purificación de proteínas glicosiladas por cromatografía de afinidad sobre lectina y cromatografía de intercambio iónico (*Methods in Enzymol.*, volumen 182, "Guide to Protein Purification", redactado por M. Deutscher, Acad. Press, San Diego, 1.990, páginas 529-39). En realizaciones adicionales del invento, puede construirse una fusión del polipéptido de interés y una etiqueta de afinidad {por ejemplo, proteína ligante de maltosa, etiqueta FLAG [Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys (ID. SEC. nº 13)], etiqueta Glu-Glu [Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu (ID. SEC. nº 14)] o un dominio inmunoglobulínico} para facilitar la purificación.

Pueden usarse ventajosamente procedimientos para la replegadura (y, opcionalmente, reoxidación) de proteínas. Se prefiere purificar la proteína hasta una pureza > 80%, más preferiblemente hasta una pureza > 90% y, aún más preferiblemente, > 95%, y se prefiere particularmente un estado farmacéuticamente puro, es decir, más de 99,9% puro con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos, y exento de agentes infecciosos y pirógenos. Preferiblemente, una proteína purificada está sustancialmente exenta de otras proteínas, particularmente de otras proteínas de origen animal.

Los polipéptidos BR43x2 pueden ser también preparados mediante síntesis química. Los polipéptidos BR43x2 ejemplares incluyen polipéptidos con una longitud de 32-40 restos, que tienen una secuencia de aminoácidos que se ajusta al motivo: XXCX [QEK] [QEKNRDHS] [QE] X {0-2} [YFW] [YFW] DXLLX {2} C [IMLV] XCX {3} CX {6-8} CX {2} [YF] CXX (ID. SEC. nº 10), y sujeta a las limitaciones aquí descritas.

Los polipéptidos BR43x2 pueden ser sintetizados mediante síntesis exclusivamente en fase sólida, métodos parcialmente en fase sólida, condensación de fragmentos o síntesis clásica en disolución. Los polipéptidos son preferiblemente preparados mediante síntesis peptídica en fase sólida.

El presente invento proporciona además una diversidad de otras fusiones polipeptídicas y proteínas multímeras relacionadas que comprenden una o más fusiones polipeptídicas. Un polipéptido BR43x2, TACI o BCMA soluble puede expresarse como una fusión con una región constante de cadena pesada de inmunoglobulina, típicamente un fragmento F_c, que contiene dos dominios de región constante y carece de la región variable. En las Patentes de EE.UU. nºs 5.155.027 y 5.567.584 se describen métodos para preparar tales fusiones. Tales fusiones son típicamente secretadas como moléculas multímeras en que las porciones Fc están unidas entre sí por enlaces disulfuro y dos polipéptidos no inmunoglobulínicos están dispuestos en estrecha proximidad entre sí. Las fusiones de inmunoglobulina-polipéptido BR43x2 (TACI o BCMA) pueden expresarse en células genéticamente creadas, para producir una diversidad de

compuestos análogos a BR43x2 multímeros. Pueden fusionarse dominios auxiliares a polipéptidos BR43x2 (TACI o BCMA) para dirigirlos a células, tejidos o macromoléculas específicos. Pueden prepararse también fusiones usando toxinas, como aquí se discute. De este modo, polipéptidos y proteínas pueden ser dirigidos con fines terapéuticos o diagnósticos. Un polipéptido BR43x2 puede ser fusionado con dos o más grupos, tales como una etiqueta de afinidad para purificación y un dominio de direccionamiento. Las fusiones polipeptídicas pueden comprender también uno o más sitios de escisión, particularmente entre dominios; véase Tuan et al., *Connect. Tiss. Res.* 34: 1-9, 1.996.

El invento también proporciona receptores BR43x2 solubles y fragmentos polipeptídicos usados para formar proteínas de fusión con marcadores o etiquetas de afinidad. Las proteínas de fusión de BR43x2 soluble-etiqueta de afinidad se usan, por ejemplo, para identificar los ligandos de BR43x2 así como los agonistas y antagonistas del ligando natural. Usando BR43x2 soluble marcado, las células que expresan el ligando, agonistas o antagonistas son identificadas por inmunocitometría o inmunohistoquímica de fluorescencia. Las proteínas de fusión solubles son útiles para estudiar la distribución del ligando en tejidos o linajes celulares específicos y para hacerse una idea de la biología de receptores/ligandos.

Para purificar el ligando, agonistas o antagonistas, se añade una proteína de fusión de BR43x2-Ig a una muestra que contiene el ligando, agonista o antagonista bajo unas condiciones que facilitan la unión receptor-ligando (típicamente una temperatura, un pH y una fuerza iónica casi fisiológicos). El complejo receptor- ligando es luego separado de la mezcla usando proteína A que está inmovilizada sobre un soporte sólido (por ejemplo, glóbulos de resina insoluble). El ligando, agonista o antagonista es luego eluido usando técnicas químicas convencionales, tal como con un gradiente de sal o pH. Como alternativa, la propia proteína de fusión puede ser unida a un soporte sólido, llevándose a cabo la unión y la elución como antes. Los medios resultantes estarán generalmente configurados en forma de una columna, y los fluidos que contienen el ligando son hechos pasar a través de la columna una o más veces para permitir que el ligando se una al polipéptido receptor. El ligando es luego eluido usando cambios de concentración salina, agentes caotrópicos ($MnCl_2$) o pH para deshacer la unión ligando-receptor.

Para dirigir la exportación del receptor soluble desde la célula huésped, el DNA del receptor soluble es unido a un segundo segmento de DNA que codifica un péptido secretor, tal como un péptido secretor t-PA. Para facilitar la purificación del dominio receptor secretado, una extensión N- o C-terminal, tal como una etiqueta de afinidad u otro polipéptido o proteína para el que se dispone de un anticuerpo u otro agente ligante específico, puede ser fusionada con el polipéptido receptor.

En la Figura 2 se muestra un análisis gráfico de Scatchard para la unión de I^{125} -ztnf4 soluble a TACI y BCMA, y en la Tabla 7 se compara con las constantes de unión de otros miembros de la familia de TNFR.

TABLA 7

Ligando	Kd M	Fuente celular	Referencia
TNFa alto	7,14E-11	HL-60	a
TNFa bajo	3,26E-10	HEP-2	a
TNFa alto	2,00E-10	HL-60	b
CD27L	3,70E-10	MP-1	c
CD27L	8,30E-09	MP-1	c
CD40L	5,00E-10	EL40.5	d
CD40L	1,00E-09	EBNA	d
(125I-CD40)			

TABLA 7 (continuación)

Ligando	Kd M	Fuente celular	Referencia
4-1BBL	1,16E-09	Biacore	e
Anti-41BBmab	4,14E-10	Biacore	e
ztnf4 sol.	1,11E-09	TACI-BHK	
ztnf4 sol.	1,25E-09	BCMA-BHK	

a Hohmann et al., *J. Biol. Chem.* **264**: 14.927-34, 1.989

b Manna y Aggarwal, *J. Biol. Chem.* **273**: 33.333-41, 1.998

c Goodwin et al., *Cell* **73**: 447-56, 1.993

d Armitage et al., *Nature* **357**: 80-82, 1.992

e Shuford et al., *J. Exp. Med.* **186**: 47-55, 1.997

Mediante análisis por FACS (Flow Cytometry and Sorting, redactado por Melamed et al., Wiley-Liss, 1.990, e Immunofluorescence and Cell Sorting, Current Protocols in Immunology, volumen 1, redactado por Coligan et al., John Wiley & Son, 1.997), se halló que ztnf4 (5 ng/ml) se une a BR43x2 (ID. SEC. n° 2), TACI (ID. SEC. n° 6), BCMA (ID. SEC. n° 8) y BR43x1 (ID. SEC. n° 9). Usando análisis por FACS, también se mostró que ztnf4 soluble, marcado con FITC, se une específicamente a, entre otros, linfocitos B de PBMCs, células amigdalinas, líneas celulares de linfomas de células B (Raji, linfoma humano de Burkitt, ATCC CCL86), Ramos (línea celular de linfoma de Burkitt, ATCC CRL-1596), Daudi (linfoma humano de Burkitt, ATCC CCL213) y RPMI 1788 (una línea celular de linfocitos B, ATCC CCL-156). No se vio unión con HL-60 (una línea celular promielocítica, ATCC CCL-240). La especificidad de la unión a células B procedentes de PBMC y células amigdalinas fue confirmada por cotinción con anticuerpos hacia moléculas específicas de células B, incluyendo CD19, IgD, IgM y CD20. La similitud entre ztnf4 y CD40L sugería una distribución tisular más amplia que la vista. Usando, por ejemplo, ensayos de proliferación de citoquinas y proliferación de células T, se analizó la afinidad de ztnf4 por monocitos, células dendríticas y células T purificadas, y no pudo detectarse la unión de ztnf4 ni ningún otro efecto biológico sobre ningún otro tipo de célula analizada. Por lo tanto, la especificidad de las células B por el ligando y el receptor sugiere que son útiles para el estudio y el tratamiento de la autoinmunidad, cánceres de células B, inmunomodulación, enfermedad intestinal inflamatoria y patologías mediadas por anticuerpos, tales como, por ejemplo, púrpura trombocitopénica idiopática, miastenia gravis y similares, enfermedades renales, respuesta inmune de células T indirecta, rechazo de injertos, y enfermedad del injerto contra el huésped.

Se ha mostrado que ztnf4 activa células B dando lugar a proliferación de células B, producción de anticuerpos y suprarregulación de marcadores de activación *in vitro* (véanse los ejemplos posteriores). Puede que estos efectos requieran una coestimulación por medio de IL-4 u otras citoquinas, o una estimulación a través del receptor antigénico de la célula B u otros receptores de la superficie celular que activan las células B, es decir, CD40. Otros ligandos del factor de necrosis tumoral, tales como gp39 y TNF β , también estimulan la proliferación de células B. De este modo, los polipéptidos del invento actual pueden ser dirigidos para que regulen específicamente las respuestas de las células B, inhibiendo las células B activadas, durante la respuesta inmune sin que afecten a otras poblaciones celulares, lo que es ventajoso en el tratamiento de la enfermedad. Además, los polipéptidos del presente invento podrían ser usados para modular el desarrollo de células B, el desarrollo de otras células, la producción de anticuerpos y la producción de citoquinas. Los polipéptidos BR43x2 pueden hallar también uso en la inducción de apoptosis y/o anergia en células. Los polipéptidos del presente invento podrían también modular la comunicación entre células T y B al neutralizar los efectos proliferativos de ztnf4. Se dispone de bioensayos y ELISAs para medir la respuesta celular a ztnf4 en presencia de BR43x2, TACI y/o BCMA solubles. Otros ensayos incluyen aquellos en que se miden cambios en la producción de citoquinas como una medida de la respuesta celular (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Immunology*, redactado por John E. Coligan et al., NIH, 1.996). Los ensayos para medir otras respuestas celulares incluyen isotipo de anticuerpo, activación de monocitos, formación de células asesinas naturales (NK; del inglés, *natural killer*), función de célula presentadora de antígeno (APC; del inglés, *antigen presenting cell*), y apoptosis.

Los polipéptidos BR43x2 del presente invento serían útiles en la preparación de un medicamento para neutralizar los efectos de ztnf4 con objeto de tratar leucemias de células B o pre-B, tales como leucemia de células plasmáticas, leucemia linfocítica crónica o aguda, mielomas tales como mieloma múltiple, mieloma de células plasmáticas, mieloma endotelial y mieloma de células gigantes; y linfomas tales como linfoma no Hodgkin, con las que se asocia un aumento de polipéptidos ztnf4. El BR43x2 soluble sería un componente útil de un medicamento para inhibir el progreso y la supervivencia de tumores.

Un análisis por transferencia Northern mostró que *ztnf4* se expresa en células CD8⁺, monocitos, dendrocitos, y monocitos activados. Esto sugiere que, en algunos trastornos autoinmunes, células T citotóxicas podrían estimular la producción de células B a través de una producción de *ztnf4* en exceso. Las proteínas inmunosupresoras que bloquean selectivamente la acción de los linfocitos B servirían para tratar la enfermedad. La producción de autoanticuerpos es común a diversas enfermedades autoinmunes y contribuye a la destrucción tisular y la exacerbación de la enfermedad. Los autoanticuerpos pueden conducir también a la existencia de complicaciones por depósitos de complejos inmunes y conducir a muchos síntomas del lupus sistémico eritematoso, incluyendo insuficiencia renal, síntomas neurálgicos y muerte. La modulación de una producción de anticuerpos independiente de respuesta celular sería también beneficiosa en muchos estados morbosos. Se ha mostrado también que las células B desempeñan una función en la secreción de inmunoglobulinas artríticas en la artritis reumatoide (Korganow et al., *Immunity* 10: 451-61, 1.999). Como tal, la inhibición de la producción de anticuerpos hacia *ztnf4* sería beneficiosa en el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la miastenia gravis y la artritis reumatoide. Los agentes terapéuticos inmunosupresores, tales como BR43x2 soluble, que bloquean o neutralizan selectivamente la acción de linfocitos B serían útiles para tales fines. Para verificar estas capacidades en polipéptidos receptores solubles BR43x2 del presente invento, dichos polipéptidos BR43x2 son evaluados usando ensayos conocidos en la técnica y aquí descritos.

El invento proporciona métodos en que se emplean polipéptidos, fusiones, anticuerpos, agonistas o antagonistas de BR43x2, TACI o BCMA para bloquear o neutralizar selectivamente las acciones de células B en asociación con enfermedades renales de fase terminal, las cuales pueden estar asociadas o no con enfermedades autoinmunes. Tales métodos serían también útiles para tratar enfermedades renales inmunológicas. Tales métodos serían útiles para tratar la glomerulonefritis asociada con enfermedades tales como nefropatía membranosa, nefropatía por IgA o enfermedad de Berger, nefropatía por IgM, enfermedad de Goodpasture, glomerulonefritis posinfecciosa, enfermedad mesangioproliferativa y síndrome nefrótico de cambio mínimo. Tales métodos servirían también como aplicaciones terapéuticas para tratar la glomerulonefritis o vasculitis secundarias asociadas con enfermedades tales como lupus, poliarteritis, púrpura de Henoch-Schonlein, esclerodermia, enfermedades relacionadas con el virus de la inmunodeficiencia humana, amiloidosis y síndrome urémico hemolítico. Los métodos del presente invento también serían útiles como parte de una aplicación terapéutica para tratar la nefritis o pielonefritis intersticiales asociadas con pielonefritis crónica, abuso de analgésicos, nefrocalcinosis, nefropatía causada por otros agentes, nefrolitiasis, o nefritis intersticial crónica o aguda.

Los métodos del presente invento también incluyen el uso de polipéptidos, fusiones, anticuerpos, agonistas o antagonistas de BR43x2, TACI o BCMA en el tratamiento de enfermedades hipertensivas o de grandes vasos, incluyendo estenosis u oclusión de arterias renales y émbolos de colesterol o émbolos renales.

El presente invento también proporciona métodos para el diagnóstico y tratamiento de neoplasias renales o urológicas, mielomas múltiples, linfomas, neuropatía de cadenas ligeras o amiloidosis.

El invento también proporciona métodos para bloquear o inhibir células B activadas, usando polipéptidos, fusiones, anticuerpos, agonistas o antagonistas de BR43x2, TACI o BCMA para el tratamiento del asma y otras enfermedades crónicas de las vías aéreas, tales como bronquitis y enfisema.

También se proporcionan métodos para inhibir o neutralizar una respuesta de células T efectoras usando polipéptidos, fusiones, anticuerpos, agonistas o antagonistas de BR43x2, TACI o BCMA para uso en inmunosupresión, en particular para un uso terapéutico tal como para la enfermedad del injerto contra el huésped y el rechazo de injertos. Se hallaría un uso adicional en la regulación de la respuesta inmune, en particular la activación y regulación de linfocitos. Los polipéptidos, fusiones, anticuerpos, agonistas o antagonistas de BR43x2, TACI o BCMA serían útiles en terapias para tratar inmunodeficiencias. Los polipéptidos, fusiones, anticuerpos, agonistas o antagonistas de BR43x2, TACI o BCMA serían útiles en protocolos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes tales como la diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM; del inglés, *insulin dependent diabetes mellitus*) y la enfermedad de Crohn. Los métodos del presente invento tendrían un valor terapéutico adicional para tratar enfermedades inflamatorias crónicas, en particular para reducir el dolor articular, la hinchazón, la anemia y otros síntomas asociados, así como para tratar el shock séptico.

El efecto de los polipéptidos y proteínas de fusión solubles de BR43x2, TACI o BCMA sobre la respuesta inmune puede ser medido por administración de los polipéptidos del presente invento a animales inmunizados con antígeno, seguida de inyección de *ztnf4* y medición de la producción de isotipos de anticuerpos y las respuestas de células B y T, incluyendo hipersensibilidad de tipo retardado y producción de citoquinas y proliferación *in vitro* de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Por lo tanto, el presente invento proporciona el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad de *ztnf4* en un mamífero, compuesto que es seleccionado del grupo que consiste en: a) un polipéptido de ID. SEC. n° 4, b) un polipéptido de ID. SEC. n° 8, c) una proteína de fusión, d) un polipéptido del resto 1 al resto 166 de aminoácido de la ID. SEC. n° 6, e) un polipéptido del resto 1 al resto 150 de aminoácido de la ID. SEC. n° 8, f) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. n° 4, y g) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. n° 10. Los ejemplos de proteínas de fusión incluyen fusiones de BR43x2 (ID. SEC. n° 4), TACI (del resto 1 al resto 166 de aminoácido de la ID. SEC. n° 6) o BCMA (del resto 1 al resto 150 de aminoácido de la ID. SEC. n° 8) solubles con otro polipéptido, preferiblemente un fragmento F_c de regiones constantes de cadenas pesadas inmunoglobulínicas. El invento propor-

ciona similarmente un método para preparar un medicamento para inhibir el acoplamiento receptor BR43x2, TACI o BCMA-ligando.

Dichos métodos serían particularmente útiles donde la actividad de ztnf4 está asociada con linfocitos B activados y para tratar cánceres de células pre-B o células B. Dichos métodos también serían útiles donde la actividad de ztnf4 está asociada con la producción de anticuerpos, en particular, la producción de anticuerpos asociada con enfermedades autoinmunes tales como lupus sistémico eritematoso, miastenia gravis y artritis reumatoide.

El sistema de adenovirus puede ser también usado para la producción de proteínas *in vitro*. Al cultivar células no 293, infectadas con adenovirus, en condiciones bajo las cuales las células no se dividen rápidamente, las células pueden producir proteínas durante periodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, células BHK son dejadas crecer hasta confluencia en fábricas de células y son luego expuestas al vector adenovírico que codifica la proteína secretada de interés. Las células son luego dejadas crecer bajo condiciones exentas de suero, lo que permite que las células infectadas sobrevivan durante varias semanas sin una división celular significativa. Alternativamente, células 293S infectadas con vector adenovírico pueden ser dejadas crecer en un cultivo en suspensión con una densidad celular relativamente elevada, para producir cantidades significativas de proteína (véase Garnier et al., *Cytotechnol.* 15: 145-55, 1.994). Con cualquier protocolo, una proteína heteróloga expresada y secretada puede ser repetidamente aislada del sobrenadante del cultivo celular. En el protocolo de producción de células 293S infectadas, también pueden obtenerse eficazmente proteínas no secretadas.

Se dispone de modelos animales bien establecidos para ensayar la eficacia *in vivo* de los polipéptidos BR43x2, TACI o BCMA solubles del presente invento en ciertos estados morbosos.

Para medir el efecto sobre la respuesta de células B, puede obtenerse la respuesta inmune en animales sometidos a una estimulación antigénica regular (por ejemplo, ovoalbúmina o colágeno) seguida de la administración de polipéptidos BR43x2, TACI o BCMA o fusiones-Ig solubles.

Pueden usarse estudios farmacocinéticos en asociación con polipéptidos o fusiones de BR43x2, TACI o BCMA solubles y radiomarcados, para determinar la distribución y la semivida de dichos polipéptidos *in vivo*. Además, pueden usarse modelos animales para determinar los efectos de BR43x2, TACI o BCMA solubles sobre tumores y desarrollo de tumores *in vivo*.

También se proporciona el uso de polipéptidos BR43x2, TACI o BCMA como marcadores sustitutivos para enfermedades autoinmunes, enfermedades renales y enfermedades de células B y T. Puede extraerse sangre de dichos pacientes y pueden detectarse los receptores solubles BR43x2, TACI o BCMA y sus ligandos en la sangre.

El invento también proporciona usos de anticuerpos en la preparación de medicamentos. Pueden obtenerse anticuerpos hacia BR43x2 o péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de ID. SEC. n° 8 usando, por ejemplo, como un antígeno, el producto de un vector de expresión que contiene el polipéptido de interés, o un polipéptido aislado de una fuente natural. Son particularmente útiles los anticuerpos que se "unen específicamente" con BR43x2 o péptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de ID. SEC. n° 10. Se considera que los anticuerpos se unen específicamente si los anticuerpos se unen a un polipéptido BR43x2 o a un polipéptido de ID. SEC. n° 8, péptido o epítipo con una afinidad de unión (K_a) de 10^6 M^{-1} o mayor, preferiblemente de 10^7 M^{-1} o mayor, más preferiblemente de 10^8 M^{-1} o mayor, y muy preferiblemente de 10^9 M^{-1} o mayor. La afinidad de unión de un anticuerpo puede ser fácilmente determinada por quien tiene una experiencia normal en la técnica mediante, por ejemplo, un análisis de Scatchard (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660, 1.949). Los anticuerpos adecuados incluyen anticuerpos que se unen a BR43x2, en particular al dominio extracelular de BR43x2 (restos de aminoácido 1-120 de la ID. SEC. n° 2), y aquellos que se unen a polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de ID. SEC. n° 10.

Pueden producirse anticuerpos anti-BR43x2 usando péptidos y polipéptidos antigénicos que llevan epítopos de BR43x2. Los péptidos y polipéptidos antigénicos del presente invento que llevan epítopos contienen una secuencia de al menos nueve, preferiblemente de entre 15 y aproximadamente 30, aminoácidos contenida en la ID. SEC. n° 2. Sin embargo, los péptidos o polipéptidos que comprenden una porción mayor de una secuencia de aminoácidos del invento, que contienen de 30 a 50 aminoácidos, o cualquier longitud de hasta, e inclusive, la secuencia entera de aminoácidos de un polipéptido del invento, son también útiles para inducir anticuerpos que se unen a BR43x2. Es deseable que la secuencia de aminoácidos del péptido que lleva epítopos sea seleccionada para que proporcione una solubilidad sustancial en disolventes acuosos (es decir, la secuencia incluye restos relativamente hidrófilos, mientras que los restos hidrófobos son preferiblemente evitados). A partir de un gráfico de hidrofobia, véanse, por ejemplo, Hopp y Woods (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3.824-8, 1.981), y Kyte y Doolittle (*J. Mol. Biol.* 157: 105-142, 1.982), un experto en la técnica puede prever péptidos hidrófilos. Además, las secuencias de aminoácidos que contienen restos de prolina pueden ser también deseables para la producción de anticuerpos.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales hacia proteína BR43x2 recombinante o hacia BR43x2 aislado de fuentes naturales, usando métodos bien conocidos por quienes tienen experiencia en la técnica; véanse, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera" en *Immunochemical Protocols* (redactado por Manson), páginas 1-5 (Humana Press, 1.992), y Williams et al., "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies" en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª edición, Glover et al. (redactores), página 15 (Oxford University Press, 1.995). La inmunogenicidad de un polipéptido BR43x2 puede ser aumentada mediante

el uso de un adyuvante, tal como alúmina (hidróxido de aluminio) o adyuvante completo o incompleto de Freund. Los polipéptidos útiles para inmunización también incluyen polipéptidos de fusión, tales como las fusiones de BR43x2 o una porción del mismo con un polipéptido inmunoglobulínico o con la proteína ligante de maltosa (MBP; del inglés, maltose binding protein). El inmunógeno polipeptídico puede ser una molécula de longitud completa o una porción de la misma. Si la porción polipeptídica es de "tipo hapteno", dicha porción puede ser ventajosamente unida o enlazada a un vehículo macromolecular [tal como hemocianina de *Fissurella* (KLH; del inglés, keyhole limpet hemocyanin), albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) o toxoide tetánico] para inmunización.

Aunque los anticuerpos policlonales son típicamente generados en animales tales como caballos, vacas, perros, gallinas, ratas, ratones, conejos, hámsters, cobayas, cabras u ovejas, un anticuerpo anti-BR43x2 del presente invento puede también proceder de un anticuerpo de primate subhumano. En, por ejemplo, Goldenberg et al., publicación de patente internacional n° WO 91/11465, y en Losman et al., *Int. J. Cancer* 46: 310, 1.990, pueden hallarse técnicas generales para generar anticuerpos diagnóstica y terapéuticamente útiles en babuinos. Pueden también generarse anticuerpos en animales transgénicos tales como ovejas, vacas, cabras y cerdos transgénicos, y puede hacerse que aquellos se expresen en levaduras y hongos en formas modificadas así como en células de mamíferos e insectos.

Alternativamente, pueden generarse anticuerpos anti-BR43x2 monoclonales. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales de roedor hacia antígenos específicos mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica [véanse, por ejemplo, Kohler et al., *Nature* 256: 495, 1.975, Coligan et al. (redactores), *Current Protocols in Immunology*, volumen 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons, 1.991), Picklesley et al., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*" en *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2ª edición, Glover et al. (redactores), página 93 (Oxford University Press, 1.995)].

En resumen, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales al inyectar una composición que comprende un producto del gen de BR43x2 a ratones, verificar la presencia de producción de anticuerpos tras extraer una muestra de suero, extraer el bazo para obtener linfocitos B, fusionar los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonar los hibridomas, seleccionar los clones positivos que producen anticuerpos hacia el antígeno, cultivar los clones que producen anticuerpos hacia el antígeno, y aislar los anticuerpos de los cultivos de hibridomas.

Además, un anticuerpo anti-BR43x2 del presente invento puede proceder de un anticuerpo monoclonal humano. Los anticuerpos monoclonales humanos se obtienen de ratones transgénicos que han sido creados para que produzcan anticuerpos humanos específicos en respuesta a una estimulación antigénica. En esta técnica, se introducen elementos del locus humano de las cadenas pesada y ligera en cepas de ratones procedentes de líneas celulares pluripotenciales embrionarias que contienen alteraciones específicas de los loci de la cadena pesada y la cadena ligera endógenas. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos específicos para antígenos humanos, y los ratones pueden ser usados para producir hibridomas que secreten anticuerpos humanos. Por ejemplo, Green et al., *Nat. Genet.* 7: 13, 1.994, Lonberg et al., *Nature* 368: 856, 1.994, y Taylor et al., *Int. Immun.* 6: 579, 1.994, describen métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser aislados y purificados de cultivos de hibridomas mediante una diversidad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína A-Sepharose, cromatografía de exclusión por tamaños y cromatografía de intercambio iónico [véanse, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y las páginas 2.9.1-2.9.3; y Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)" en *Methods in Molecular Biology*, volumen 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc., 1.992)].

Para usos particulares, puede ser deseable preparar fragmentos de anticuerpos anti-BR43x2. Tales fragmentos de anticuerpos pueden ser obtenidos, por ejemplo, por hidrólisis proteolítica del anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos pueden ser obtenidos por digestión de anticuerpos completos con pepsina o papaína, mediante métodos convencionales. Como una ilustración, pueden producirse fragmentos de anticuerpos por escisión enzimática de los anticuerpos con pepsina para obtener un fragmento de 5 S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede ser adicionalmente escindido usando un agente reductor tiólico para producir fragmentos monovalentes Fab' de 3,5 S. Opcionalmente, la reacción de escisión puede ser llevada a cabo usando un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resultan de la escisión de los enlaces disulfuro. Como una alternativa, una escisión enzimática usando papaína produce directamente dos fragmentos Fab monovalentes y un fragmento Fc. Estos métodos son descritos, por ejemplo, por Goldenberg, Patente de EE.UU. n° 4.331.647, Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89: 230, 1.960, Porter, *Biochem. J.* 73: 119, 1.959, Edelman et al. en *Methods in Enzymology*, volumen 1, página 422 (Academic Press 1.967), y Coligan, *ibidem*.

Pueden usarse también otros métodos para escindir anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos monovalentes de cadenas ligera-pesada, escisión adicional de fragmentos y otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, con tal que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Por ejemplo, los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser no covalente, como describen Inbar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2.659, 1.972. Alternativamente, las cadenas variables pueden ser unidas por un enlace disulfuro intermolecular o ser reticuladas por agentes químicos tales como el glutaraldehído (véase, por ejemplo, Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437, 1.992).

Los fragmentos Fv pueden comprender cadenas V_H y V_L que estén conectadas por un conector peptídico. Estas proteínas ligantes de antígeno de una sola cadena (scFv; del inglés, *single-chain Fv*) son preparadas construyendo un gen estructural que comprende secuencias de DNA que codifican los dominios V_H y V_L, que están conectados por un oligonucleótido. El gen estructural es insertado en un vector de expresión que es posteriormente introducido en una

célula huésped, tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una sola cadena polipeptídica con un péptido conector que conecta los dos dominios V. Por ejemplo, Whitlow et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 97, 1.991, describen métodos para producir scFvs; véanse también Bird et al., Science 242: 423, 1.988, Ladner et al., Patente de EE.UU. n° 4.946.778, Pack et al., Bio/Technology 11: 1.271, 1.993, y Sandhu, *ibídem*.

Como una ilustración, puede obtenerse un scFv al exponer linfocitos a un polipéptido BR43x2 *in vitro* y seleccionar librerías de despliegue de anticuerpos en fagos o vectores similares (por ejemplo, a través del uso de una proteína o péptido BR43x2 inmovilizado o marcado). Pueden obtenerse genes que codifican polipéptidos que tienen posibles dominios ligantes del polipéptido BR43x2, al explorar librerías peptídicas aleatorias desplegadas en fagos (despliegue en fagos) o en bacterias tales como *E. coli*. Pueden obtenerse secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos de diversas maneras, tales como a través de mutagénesis aleatoria y síntesis aleatoria de polinucleótidos. Estas librerías de despliegue peptídico aleatorias pueden ser usadas para explorar péptidos que interaccionen con una diana conocida que puede ser una proteína o un polipéptido, tal como un ligando o receptor, una macromolécula biológica o sintética, o sustancias orgánicas o inorgánicas. En este campo técnico se conocen técnicas para crear y explorar tales librerías de despliegue peptídico aleatorias (Ladner et al., Patente de EE.UU. n° 5.223.409, Ladner et al., Patente de EE.UU. n° 4.946.778, Ladner et al., Patente de EE.UU. n° 5.403.484, Ladner et al., Patente de EE.UU. n° 5.571.698, y Kay et al., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc., 1.996), y se dispone comercialmente de librerías de despliegue peptídico aleatorias y de sistemas para explorar dichas librerías, en, por ejemplo, Clontech (Palo Alto, California, EE.UU.), Invitrogen Inc. (San Diego, California, EE.UU.), New England Biolabs Inc. (Beverly, Massachusetts, EE.UU.), y Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, New Jersey, EE.UU.). Las librerías de despliegue peptídico aleatorias pueden ser exploradas usando las aquí descritas secuencias de BR43x2 para identificar proteínas que se unen a BR43x2.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región determinante de la complementariedad (CDR; del inglés, *complementary-determining region*). Pueden obtenerse péptidos CDR ("unidades mínimas de reconocimiento") construyendo genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes son preparados, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir de RNA de células productoras de anticuerpos (véanse, por ejemplo, Larrick et al., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2: 106, 1.991, Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies" en Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, redactado por Ritter et al., página 166 (Cambridge University Press, 1.995), y Ward et al., "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies" en Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, redactado por Birch et al., página 137 (Wiley-Liss, Inc., 1.995).

Alternativamente, un anticuerpo anti-BR43x2 puede proceder de un anticuerpo monoclonal "humanizado". Se producen anticuerpos monoclonales "humanizados" al transferir regiones determinantes de la complementariedad de ratón procedentes de cadenas variables pesadas y ligeras de la inmunoglobulina de ratón a un dominio variable humano. Restos típicos de anticuerpos humanos son luego sustituidos en las regiones estructurales de los remedos murinos. El uso de componentes de anticuerpo procedentes de anticuerpos monoclonales humanizados obvia los posibles problemas asociados con la inmunogenicidad de las regiones constantes murinas. Por ejemplo, Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3.833, 1.989, describen técnicas generales para clonar dominios variables de inmunoglobulinas murinas. Por ejemplo, Jones et al., Nature 321: 522, 1.986, Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4.285, 1.992, Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, 1.992, Singer et al., J. Immun. 150: 2.844, 1.993, Sudhir (redactor), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc., 1.995), Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies" en Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland et al. (redactores), páginas 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1.996), y Queen et al., Patente de EE.UU. n° 5.693.762 (1.997), describen técnicas para producir anticuerpos monoclonales humanizados.

Pueden prepararse anticuerpos policlonales antiidiotipo al inmunizar animales con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-BR43x2, usando técnicas estándares; véase, por ejemplo, Green et al., "Production of Polyclonal Antisera" en Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols, Manson (redactor), páginas 1-12 (Humana Press, 1.992); véanse también las páginas 2.4.1-2.4.7 de Coligan, *ibídem*. Alternativamente, pueden prepararse anticuerpos monoclonales antiidiotipo usando anticuerpos o fragmentos de anticuerpos anti-BR43x2 como inmunógenos con las técnicas anteriormente descritas. Como otra alternativa, pueden prepararse anticuerpos antiidiotipo humanizados o anticuerpos antiidiotipo de primate subhumano usando las técnicas anteriormente descritas. Por ejemplo, Irie, Patente de EE.UU. n° 5.208.146, Greene et al., Patente de EE.UU. n° 5.637.677, y Varthakavi y Minocha, J. Gen. Virol. 77: 1.875, 1.996, describen métodos para producir anticuerpos antiidiotipo.

Los presentes anticuerpos o polipéptidos pueden ser también directa o indirectamente conjugados con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares, y estos productos de conjugación ser usados para aplicaciones diagnósticas o terapéuticas *in vivo*. Por ejemplo, los polipéptidos o anticuerpos del presente invento pueden ser usados para identificar o tratar tejidos u órganos que expresan una correspondiente molécula anticomplementaria (un receptor o un antígeno, respectivamente, por ejemplo). Más específicamente, polipéptidos BR43x2 o anticuerpos anti-BR43x2, o fragmentos o porciones bioactivos de los mismos, pueden ser copulados con moléculas detectables o citotóxicas y suministrados a un mamífero que tenga células, tejidos u órganos que expresen la molécula anticomplementaria.

Las moléculas detectables adecuadas pueden ser directa o indirectamente fijadas al polipéptido o anticuerpo, e incluyen radionucleidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, marcadores fluorescentes, marcadores quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden ser directa o indirectamente fijadas al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y otras), así como radionucleidos terapéuticos tales como yodo-131, renio-188 e itrio-90 (directamente fijados al polipéptido o anticuerpo, o indirectamente fijados por medio de, por ejemplo, un grupo quelante). Los polipéptidos o los anticuerpos pueden ser también conjugados con fármacos citotóxicos, tales como la adriamicina. Para la fijación indirecta de una molécula detectable o citotóxica, la molécula detectable o citotóxica puede ser conjugada con un miembro de una pareja complementaria/anticomplementaria cuyo otro miembro está unido a la porción de polipéptido o anticuerpo. Para estos fines, la pareja biotina/estreptavidina es una pareja complementaria/anticomplementaria ejemplar.

Los polipéptidos BR43x2 solubles o anticuerpos hacia BR43x2 pueden ser directa o indirectamente conjugados con fármacos, toxinas, radionucleidos y similares, y estos productos de conjugación ser usados para la preparación de composiciones terapéuticas para uso *in vivo*. Por ejemplo, los polipéptidos o anticuerpos del presente invento pueden ser usados para tratar tejidos u órganos que expresan una correspondiente molécula anticomplementaria (un receptor o un antígeno, respectivamente, por ejemplo). Más específicamente, polipéptidos BR43x2 o anticuerpos anti-BR43x2, o fragmentos o porciones bioactivos de los mismos, pueden ser copulados con moléculas citotóxicas y suministrados a un mamífero que tenga células, tejidos u órganos que expresen la molécula anticomplementaria.

Las moléculas citotóxicas adecuadas pueden ser directa o indirectamente fijadas al polipéptido o anticuerpo, e incluyen toxinas bacterianas o vegetales (por ejemplo, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas*, ricina, abrina y similares), así como radionucleidos terapéuticos tales como yodo-131, renio-188 e itrio-90 (directamente fijados al polipéptido o anticuerpo, o indirectamente fijados por medio de, por ejemplo, un grupo quelante). Los polipéptidos o los anticuerpos pueden ser también conjugados con fármacos citotóxicos, tales como la adriamicina. Para la fijación indirecta de una molécula citotóxica, la molécula citotóxica puede ser conjugada con un miembro de una pareja complementaria/anticomplementaria cuyo otro miembro está unido a la porción de polipéptido o anticuerpo. Para estos fines, la pareja biotina/estreptavidina es una pareja complementaria/anticomplementaria ejemplar.

Dichas proteínas de fusión de polipéptido-toxina o proteínas de fusión de anticuerpo/fragmento-toxina pueden ser usadas para la inhibición o ablación de células o tejidos específicos (por ejemplo, para tratar células o tejidos cancerosos). Alternativamente, si el polipéptido tiene múltiples dominios funcionales (es decir, un dominio de activación o un dominio ligante de ligandos, más un dominio de direccionamiento), una proteína de fusión que sólo incluya el dominio de direccionamiento puede ser adecuada para dirigir una molécula detectable, una molécula citotóxica o una molécula complementaria a un tipo celular o tisular de interés. En los casos en que la proteína de fusión de dominio único incluye una molécula complementaria, la molécula anticomplementaria puede ser conjugada con una molécula detectable o citotóxica. De este modo, dichas proteínas de fusión de dominio-molécula complementaria representan un vehículo de direccionamiento genérico para una distribución celular/tisularmente específica de productos de conjugación genéricos de moléculas anticomplementaria-citotóxica. Los productos de conjugación de polipéptidos o anticuerpos bioactivos aquí descritos pueden ser distribuidos intravenosa, intraarterial o intraductalmente o pueden ser localmente introducidos en el pretendido sitio de acción.

Pueden prepararse anticuerpos hacia polipéptidos BR43x2 solubles que estén etiquetados con His o FLAGTM. Pueden también prepararse anticuerpos hacia proteínas de fusión-MBP producidas en *E. coli*. Alternativamente, dichos polipéptidos podrían incluir una proteína de fusión con Ig humana. En particular, un antisero que contenga anticuerpos polipeptídicos hacia BR43x2 soluble etiquetado con His o etiquetado con FLAGTM puede ser usado en el análisis de la distribución tisular de BR43x2 por inmunohistoquímica sobre tejido de ser humano o primate. Estos polipéptidos BR43x2 solubles pueden ser también usados para inmunizar ratones con objeto de producir anticuerpos monoclonales hacia un polipéptido BR43x2 humano soluble. Los anticuerpos monoclonales hacia un polipéptido BR43x2 humano soluble pueden ser también usados para remedar una copulación de ligando/receptor, dando lugar a la activación o inactivación del par ligando/receptor. Por ejemplo, se ha demostrado que la reticulación de anticuerpos monoclonales anti-CD40 soluble proporciona una señal estimulante a células B que han sido subóptimamente activadas con anti-IgM o lipopolisacárido (LPS), y da lugar a proliferación y producción de inmunoglobulinas. Estos mismos anticuerpos monoclonales actúan como antagonistas cuando se usan en disolución al bloquear la activación del receptor. Los anticuerpos monoclonales hacia BR43x2 pueden ser usados para determinar la distribución, regulación e interacción biológica del par BR43x2/ligando de BR43x2 sobre linajes celulares específicos identificados mediante estudios de distribución tisular.

Pueden formularse cantidades farmacéuticamente eficaces de polipéptidos BR43x2, TACI o BCMA del presente invento con vehículos farmacéuticamente aceptables para administración parenteral, oral, nasal, rectal, tópica, transdérmica o similar, de acuerdo con métodos convencionales. Las formulaciones pueden incluir además uno o más diluyentes, cargas, agentes emulsivos, conservantes, tampones, excipientes y similares, y pueden ser dispuestas en formas tales como, por ejemplo, líquidos, polvos, emulsiones, supositorios, liposomas, parches transdérmicos y tabletas. Pueden también utilizarse sistemas de distribución por liberación lenta o prolongada, incluyendo cualesquiera de diversos biopolímeros (sistemas de base biológica), sistemas en que se emplean liposomas y sistemas de distribución polímeros, con las aquí descritas composiciones para proporcionar una fuente continua o de larga duración del polipéptido o antagonista de BR43x2. Dichos sistemas de liberación lenta son aplicables a las formulaciones para, por ejemplo, uso oral, tópico o parenteral. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un medio

vehículo que no interfiere en la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos y que no es tóxico para el huésped o paciente. Un experto en la técnica puede formular los compuestos del presente invento de una manera apropiada y de acuerdo con prácticas admitidas, tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, redactado por Genaro, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, EE.UU., 19ª edición, 1.995.

Como se usa aquí, una “cantidad farmacéuticamente eficaz” de un polipéptido, agonista o antagonista de BR43x2, TACI o BCMA es una cantidad suficiente para provocar un resultado biológico deseado. El resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad, o cualquier otra alteración deseada de un sistema biológico. Por ejemplo, una cantidad eficaz de un polipéptido BR43x2, TACI o BCMA es aquella que proporciona bien un alivio subjetivo de síntomas o bien una mejora objetivamente identificable según advierte el clínico u otro observador cualificado. Por ejemplo, dicha cantidad eficaz de un polipéptido o una fusión soluble de BR43x2, TACI o BCMA proporcionaría una disminución de la respuesta de células B durante la respuesta inmune, una inhibición o disminución de la producción de autoanticuerpos, y una inhibición o disminución de los síntomas asociados con SLE, MG o RA. Cantidades eficaces de BR43x2, TACI o BCMA disminuirán el porcentaje de células B en sangre periférica. Las cantidades eficaces de los polipéptidos BR43x2, TACI o BCMA pueden variar mucho dependiendo de la enfermedad o síntoma que se trata. La cantidad del polipéptido que se va a administrar y su concentración en las formulaciones dependen del vehículo seleccionado, la vía de administración, la potencia del polipéptido concreto, el estado clínico del paciente, los efectos secundarios y la estabilidad del compuesto en la formulación. De este modo, el clínico empleará la preparación apropiada que contenga la concentración apropiada en la formulación, así como la cantidad de formulación administrada, dependiendo de la experiencia clínica con el paciente en cuestión o con pacientes similares. Dichas cantidades dependerán, en parte, del estado concreto que se trata, la edad, el peso y la salud general del paciente, y otros factores evidentes para los expertos en la técnica. Típicamente, la dosis estará en el intervalo de 0,1-100 mg/kg del sujeto. Las dosis para compuestos específicos pueden ser determinadas a partir de estudios *in vitro* o *ex vivo* en combinación con estudios en animales experimentales. Las concentraciones de compuestos que se han hallado eficaces *in vitro* o *ex vivo* proporcionan una orientación para estudios en animales, en los que se calculan las dosis que proporcionan concentraciones similares en el sitio de acción.

El invento es adicionalmente ilustrado mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Identificación de BR43x2

La isoforma de TACI fue clonada a partir de una librería de despliegue de RPMI usando el procedimiento de trampa de secreción. Se desplegó una librería de RPMI 1788 (línea de células B activadas) usando veinte placas de 96 pocillos. Cada pocillo contenía aproximadamente 100 colonias de *E. coli*, conteniendo cada colonia un clon de cDNA. Se prepararon minipreparaciones de DNA en formato de 96 pocillos usando el sistema Tomtech Quadra 9600. El DNA aislado fue luego reunido en 120 colecciones, cada una de las cuales representa 1.600 clones. Células Cos-7 fueron transfectadas con estas colecciones y fueron sembradas en placas de 12 pocillos. Se mezclaron tres microlitros de DNA de colección y 5 μ l de LipofectAMINE en 92 μ l de medio DMEM desprovisto de suero (55 mg de piruvato sódico, 146 mg de L-glutamina, 5 mg de transferrina, 2,5 mg de insulina, 1 μ g de selenio y 5 mg de fetuina en 500 ml de DMEM) y se incubó la mezcla a temperatura ambiental durante 30 minutos, lo que fue seguido de la adición de 400 μ l de medio DMEM desprovisto de suero. Se añadió la mezcla de DNA-LipofectAMINE a 220.000 células Cos-7/pocillo sembradas en placas para cultivo tisular de 12 pocillos, y se incubó durante 5 horas a 37°C. Después de la incubación, se añadieron 500 μ l de medio DMEM-suero bovino fetal (FBS; del inglés, fetal bovine serum) al 20% (100 ml de FBS, 55 mg de piruvato sódico y 146 mg de L-glutamina en 500 ml de DMEM) a cada pocillo y se incubaron las células durante la noche.

La exploración con trampa de secreción fue llevada a cabo usando ztnf4 biotinilado y etiquetado con FLAG. Las células fueron enjuagadas con disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) y fueron fijadas durante 15 minutos con formaldehído al 1,8% en PBS. Las células fueron luego lavadas con TNT (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y Tween-20 al 0,05% en H₂O). Se dejó durante 15 minutos que Triton-X al 0,1% en PBS penetrara en las células, lo que fue seguido de un lavado en TNT. Las células fueron bloqueadas durante 1 hora con TNB (Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,15 M y Reactivo bloqueador al 0,5%) utilizando el sistema Renaissance® TSA-Direct de NEN (NEN, Boston, Massachusetts, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron lavadas con TNT y fueron bloqueadas durante 15 minutos con avidina y luego con biotina (n° SP-2001 del catálogo de Vector Labs), realizándose un lavado intermedio con TNT. Las células fueron incubadas durante 1 hora con 1 μ g/ml de ztnf4/Flag/biotina en TNB, lo que fue seguido de un lavado con TNT. Las células fueron incubadas durante una hora con una dilución 1:300 de estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (HRP; del inglés, horseradish peroxidase) (NEN) en TNB y fueron lavadas con TNT. Las hibridaciones fueron detectadas con el reactivo fluoresceína-tiramida diluido 1:50 en tampón de dilución (NEN) e incubado durante 4,4 minutos y fueron lavadas con TNT. Las células fueron conservadas con Vectashield Mounting Media (Vector Labs, Burlingame, California, EE.UU.) diluido 1:5 en TNT.

Las células fueron visualizadas por microscopía fluorescente usando un filtro de FITC. Doce colecciones eran positivas en cuanto a unión a ztnf4. Se descompuso la colección D8 (que representaba 1.600 clones) y se aisló un

ES 2 204 502 T3

único clon (D8-1), positivo en cuanto a unión a *tnf4*. Un análisis por secuenciación reveló que el clon D8-1 contenía una secuencia polipéptidica que codificaba una isoforma de TACI, en la que la primera seudorrepetición rica en cisteína Phe21-Arg67 de TACI estaba sustituida por un solo resto de aminoácido, triptófano. Esta isoforma fue denominada BR43x2, cuya secuencia polinucleotídica se presenta en la ID. SEC. n° 1.

Ejemplo 2

Localización de BR43x1 en linfocitos y monocitos

Se usó transcriptasa inversa-PCR para localizar la expresión de BR43x1 en células T y B y monocitos. Se usaron los cebadores oligonucleotídicos ZC19980 (ID. SEC. n° 15) y ZC19981 (ID. SEC. n° 16) para explorar cDNA de CD19⁺, CD3⁺ y monocitos para BR43. La reacción de la transcriptasa inversa fue llevada a cabo a 94°C durante 3 minutos, lo que fue seguido de 30 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 68°C durante 2 minutos y 72°C durante 1 minuto, seguidos de una extensión de 7 minutos a 72°C. Una banda del tamaño esperado, 720 bp, fue detectada sólo en células B y no en células T activadas, como había sido comunicado para TACI usando anticuerpos (von Bülow y Bram, *ibídem*).

Ejemplo 3

*Ensayo de proliferación de células B usando el ligando *tnf4* de BR43*

1 x 10⁸ células mononucleares de sangre periférica (PBMC; del inglés, peripheral blood mononuclear cell) congeladas, obtenidas por aféresis y contenidas en un vial, fueron rápidamente descongeladas en un baño de agua a 37°C y fueron resuspendidas en 25 ml de medio para células B (Medio de Dulbecco modificado de Iscove, suero bovino fetal al 10% térmicamente inactivado, L-glutamina al 5%, y Pen/Strep al 5%) en un tubo de 50 ml de capacidad. Las células fueron analizadas en cuanto a viabilidad usando azul de tripano (GIBCO BRL, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se dispuso una capa de diez mililitros de Ficoll/Hypaque Plus (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Piscataway, New Jersey, EE.UU.) bajo la suspensión celular, y el conjunto fue centrifugado durante 30 minutos a 1.800 rpm y dejado detener con el freno quitado. La capa de interfase fue luego separada y transferida a un nuevo tubo de 50 ml de capacidad, llevada hasta un volumen final de 40 ml con PBS y centrifugada durante 10 minutos a 1.200 rpm con el freno puesto. La viabilidad de las células B aisladas fue analizada usando azul de tripano. Las células B fueron resuspendidas hasta una concentración final de 1 x 10⁶ células/ml en medio para células B y fueron sembradas en una placa de 96 pocillos con fondo en U (Falcon, VWR, Seattle, Washington, EE.UU.) en una cantidad de 180 µl/pocillo.

A las células se añadió uno de los estimuladores siguientes hasta llevar el volumen final a 200 ml/pocillo:

tnf-4sCF o *tnf-4-sNF* soluble etiquetado con FLAG, en diluciones a la décima parte de 1 mg-1 ng/ml ya sea solo, con 10 µg/ml de anti-IgM (anti-IgM humana, de cabra) diluido en NaH₂CO₃, pH de 9,5 (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama, EE.UU.), o con 10 µg/ml de anti-IgM y 10 ng/ml de IL-4 humana recombinante (diluida en PBS y BSA al 0,1%). Además, también se ensayaron otras citoquinas tales como IL-3 e IL-6, así como un anticuerpo hacia CD40 soluble (sCD40; Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.). Como un testigo, las células fueron incubadas con albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% y PBS, 10 µg/ml de anti-IgM, o 10 µg/ml de anti-IgM y 10 ng/ml de IL-4 (u otras citoquinas). Las células fueron luego incubadas a 37°C en una incubadora humidificada durante 72 horas. Dieciseis horas antes de la recolección, se añadieron 3,7 x 10⁴ Bq de ³H-timidina a todos los pocillos. Las células fueron recolectadas en una placa filtrante de 96 pocillos (Unifilter GF/C, Packard, Meriden, Connecticut, EE.UU.), donde fueron recolectadas usando una cosechadora celular (Packard) y recogidas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las placas fueron secadas a 55°C durante 20-30 minutos, y el fondo de los pocillos fue sellado con un sellador de placas opaco. Se añadieron 0,25 ml de líquido de centelleo (Microscint-O, Packard) a cada pocillo y se leyó la placa usando un contador de centelleo TopCount (Packard) para microplacas.

Para medir la inducción de la producción de IgG en respuesta a diversos mitógenos de células B después de la estimulación de células B purificadas, las células fueron preparadas del modo descrito y fueron incubadas durante 9 días. El sobrenadante celular fue recogido para determinar la producción de IgG.

Para medir la activación de marcadores de la superficie celular en respuesta a diversos mitógenos de células B después de la estimulación de células B purificadas, las células fueron preparadas del modo anteriormente descrito pero sólo fueron incubadas 48 horas. Los marcadores de la superficie celular fueron medidos mediante análisis por FACS.

En la Tabla 5 se resume la proliferación de células B purificadas humanas, estimuladas con los diversos mitógenos de células B.

TABLA 5

Estímulo	Índice proliferativo
ztnf4	1,5
ztnf4 + IL-4	9,9
ztnf4 + anti-IgM + IL-4	15,8

Se vio un efecto sinérgico de ztnf4 con IL-4, IL-3 (10 μ g/ml) e IL-6 (10 μ g/ml) sobre la proliferación de células B. Se vio un aumento del doble en la generación de señales en células B cuando se usó sCD40.

En la Tabla 6 se resume la inducción de la producción de IgG (ng/ml) en respuesta a diversos mitógenos de células B después de la estimulación de células B purificadas.

TABLA 6

Estímulo	Testigo	Ztnf4
anti-IgM	3	7,5
anti-IgM + IL-4	13	32
anti-IgM + IL-4 + IL-5	10	45

Se vio un aumento de los marcadores de activación de la superficie celular después de la estimulación de células B purificadas con ztnf4 solo, con anti-IgM, o con anti-IgM + IL-4. No hubo efecto alguno sobre la proliferación de PBMCs en presencia de mitógenos de células T óptimos o subóptimos. Tampoco se vio efecto alguno sobre la producción de TNF- α en monocitos purificados en respuesta a una estimulación con LPS.

La Figura 3 muestra la coactivación de linfocitos B humanos con ztnf4 soluble para que proliferen y secreten inmunoglobulina. La Figura 3A muestra la proliferación de células B purificadas de sangre periférica humana en respuesta a una estimulación con ztnf4 soluble (25 ng/ml) en presencia de IL-4 solo, e IL-4 con anti-IgM, anti-CD40 o anti-CD19, después de cinco días en cultivo. La Figura 3B muestra los niveles de IgM e IgG medidos en los sobrenadantes obtenidos de células B humanas estimuladas con ztnf4 soluble en presencia de IL-4 o IL-4+IL-5, después de nueve días en cultivo.

Estos resultados sugieren que el ztnf4 soluble es una molécula de activación de células B que actúa de concierto con otros estímulos de células B y débilmente por sí mismo. El ztnf4 soluble activa la proliferación de células B y la producción de Ig. La suprarregulación de moléculas de adhesión, moléculas coestimuladoras y receptores de activación sugiere un papel para activar la función APC de las células B.

La Figura 4 muestra la estimulación de células B de sangre periférica humana con ztnf4 soluble (25 ng/ml) o una proteína testigo (ubiquitina) en presencia de 10 ng/ml de IL-4 durante 5 días *in vitro*. TACI-Ig, BCMA-Ig y Fc testigo purificados fueron ensayados en cuanto a la inhibición de la proliferación específica por ztnf4 soluble.

Ejemplo 4

Selección de células BHK transformadas con TACI y BCMA, usando la unión de ztnf4

Células BHK que expresan un nivel elevado de proteína TACI fueron seleccionadas mediante clonación por dilución de una colección de transfectantes. Se incubaron células transfectantes (2×10^5) sobre hielo durante 30 minutos con ztnf4 biotinilado en una concentración de 1 μ g/ml en tampón de unión (PBS, BSA al 2% y NaN₃ al 0,02%). Las células fueron lavadas 2 veces con tampón de unión y fueron luego incubadas con estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE; del inglés, streptavidin-phycoerythrin) (Caltag; dilución 1:1.000 en tampón de unión) sobre hielo durante 30 minutos. Las células fueron luego lavadas 2 veces en tampón de unión, resuspendidas en tampón de unión y leídas por FACS (FACS Vantage, Becton Dickinson). Se seleccionan los clones con la mayor unión de TNF4.

Células BHK que expresan un nivel elevado de proteína BCMA fueron seleccionadas al marcar superficialmente con ztnf4 biotinilado la colección de transfectantes que expresan BCMA. Esto fue seguido de SA-PE (Caltag, Burlingame, California, EE.UU.) y clasificación en medio estéril en cuanto a células brillantes en el canal 2 de fluorescencia (FL2) del sistema FACS Vantage (Becton Dickinson). Las colonias individuales fueron luego exploradas en cuanto a la unión de ztnf4.

Ejemplo 5

Distribución tisular

Se sondaron transferencias Northern de múltiples tejidos humanos (MTN I, MTN II y MTN III; Clontech) para determinar la distribución tisular de la expresión humana de BR43x2 y TACI. Una sonda de aproximadamente 500 bp procedente de PCR (ID. SEC. n° 21) fue multiplicada usando BR43x2 (ID. SEC. n° 1) como molde y los oligonucleótidos ZC20061 (ID. SEC. n° 22) y ZC20062 (ID. SEC. n° 23) como cebadores. Esta secuencia es idéntica a la región homóloga de TACI. La multiplicación fue llevada a cabo del modo siguiente: 1 ciclo a 94°C durante 1,0 minutos, 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa, y el producto de PCR de 500 bp fue purificado usando un sistema de extracción en gel (Qiagen, Chatsworth, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda fue marcada radiactivamente usando el sistema MULTIPRIME para marcación de DNA (Amersham, Arlington Heights, Illinois, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda fue purificada usando una columna NUCTRAP de empuje (Stratagene). Se utilizó la disolución EXPRESSHYB (Clontech) para la prehibridación y como una disolución de hibridación para las transferencias Northern. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 65°C usando 10⁶ cpm/ml de sonda marcada. Las transferencias se lavaron luego en tampón de disolución salina-citrato sódico (SSC; del inglés, *saline-sodium citrate*) 2x y dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, *sodium dodecylsulfate*) al 0,1% a temperatura ambiental, lo que fue seguido de 2 lavados en SSC 0,1x y SDS al 0,1% a 50°C. Se detectó un transcrito de aproximadamente 1,5 kb en bazo, ganglio linfático e intestino delgado.

Se sondaron transferencias Northern de múltiples tejidos humanos (MTN I, MTN II y MTN III; Clontech) para determinar la distribución tisular de la expresión de BCMA humana. Una sonda de aproximadamente 257 bp procedente de PCR (ID. SEC. n° 24) fue multiplicada usando cDNA de células Daudi como molde y los oligonucleótidos ZC21065 (ID. SEC. n° 25) y ZC21067 (ID. SEC. n° 26) como cebadores. La multiplicación fue llevada a cabo del modo siguiente: 1 ciclo a 94°C durante 1,0 minutos, 35 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, seguidos de 1 ciclo a 72°C durante 10 minutos. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa, y el producto de PCR de 257 bp fue purificado usando un sistema de extracción en gel (Qiagen, Chatsworth, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda fue marcada radiactivamente usando el sistema MULTIPRIME para marcación de DNA (Amersham, Arlington Heights, Illinois, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La sonda fue purificada usando una columna NUCTRAP de empuje (Stratagene). Se utilizó la disolución EXPRESSHYB (Clontech) para la prehibridación y como una disolución de hibridación para las transferencias Northern. La hibridación tuvo lugar durante la noche a 65°C usando 10⁶ cpm/ml de sonda marcada. Las transferencias se lavaron luego en SSC 2x y SDS al 0,1% a temperatura ambiental, lo que fue seguido de 2 lavados en SSC 0,1x y SDS al 0,1% a 50°C. Se detectó un transcrito de aproximadamente 1,2 kb en estómago, intestino delgado, ganglio linfático, tráquea, bazo y testículo.

Transferencias RNA Master en forma de manchas (Clontech) que contenían RNAs de diversos tejidos que estaban normalizados a 8 genes domésticos fueron también sondadas con la sonda de TACI (ID. SEC. n° 21) o la sonda de BCMA (ID. SEC. n° 24) e hibridadas de la manera anteriormente descrita. Se vio expresión de BR43x2/TACI en bazo, ganglio linfático, intestino delgado, estómago, glándula salival, apéndice, pulmón, médula ósea y bazo fetal. Se detectó expresión de BCMA en intestino delgado, bazo, estómago, colon, ganglio linfático y apéndice.

Se sondaron un Blot V de un conjunto de tumores humanos (Invitrogen Inc., San Diego, California, EE.UU.) y una transferencia de linfoma humano (Invitrogen) de la forma anteriormente descrita con una sonda de BR43x2/TACI (ID. SEC. n° 21) o una sonda de BCMA (ID. SEC. n° 24). Se halló un transcrito de 1,5 kb que correspondía a TACI en linfoma no Hodgkin y tumor parotídeo. Se halló un transcrito de 1,2 kb que correspondía a BCMA en adenocarcinoma, linfoma no Hodgkin y tumor parotídeo.

Se preparó RNA total de células CD4+, CD8+, CD19+ y células que presentan reacción mixta de linfocitos (CellPro, Bothell, Washington, EE.UU.) usando isotiocianato de guanidina (Chirgwin et al., *Biochemistry* 18: 52-94, 1.979), seguido de una operación de centrifugación en CsCl. Se aisló poli(A) + RNA usando una cromatografía en oligo(dT)-celulosa (Aviv y Leder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 1.408-12, 1.972). Luego se llevó a cabo un análisis por transferencia Northern del modo siguiente.

Aproximadamente 2 mg de cada uno de los poli(A) + RNAs fueron desnaturalizados en formaldehído 2,2 M/tampón de fosfato (Na₂HPO₄ 50 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaOAc 50 mM, EDTA 1 mM y formaldehído 2,2 M) y sometidos a separación mediante electroforesis en un minigel de agarosa al 1,5% (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, California, EE.UU.) en formaldehído/tampón de fosfato. El RNA fue transferido durante la noche a un filtro Nytran (Schleicher & Schuell, Keene, New Hampshire, EE.UU.), y el filtro fue reticulado por luz UV (1.200 mJ) en un reticulador UV STRATALINKER® (Stratagene Cloning Systems) y luego secado a 80°C durante 1 hora.

Las transferencias fueron sondadas con una sonda de TACI (ID. SEC. n° 21) o de BCMA (ID. SEC. n° 24). Sólo se detectó una banda de 1,5 kb que representaba a TACI en células CD19+. Se detectó tenuemente un transcrito de 1,2 kb que representaba a BCMA en células CD8+, CD19+ y MLR.

Se llevó a cabo un análisis adicional por transferencia Northern sobre transferencias realizadas con poli(A)-RNA de células K-562 (línea eritroide, ATCC CCL 243), células HUT78 (célula T, ATCC TIB-161), células Jurkat (célula T), DAUDI (linfoma humano de Burkitt, Clontech, Palo Alto, California, EE.UU.), RAJI (linfoma humano de Burkitt, Clontech) y HL60 (monocito) del modo anteriormente descrito. Las transferencias fueron sondadas con una sonda de TACI (ID. SEC. n° 21) o de BCMA (ID. SEC. n° 24). Se detectó un transcrito de 1,5 kb que correspondía a TACI en células Raji. Se detectó un transcrito de 1,2 kb que correspondía a BCMA en células Daudi, Raji y Hut 78.

Se usó una exploración basada en PCR para identificar tejidos que expresasen TACI humano o murino y BCMA humano. Se exploraron los conjuntos de expresión génica Rapid-Scan™ (OriGene Technologies, Inc., Rockville, Maryland, EE.UU.) humanos y murinos de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se crearon los cebadores oligonucleotídicos ZC24200 (ID. SEC. n° 27) y ZC24201 (ID. SEC. n° 28) para abarcar una juntura exónica y producir un fragmento de 272 bp correspondiente a TACI murino. Se detectó expresión en bazo, timo, pulmón, mama, corazón, músculo, piel, glándula suprarrenal, estómago, intestino delgado, cerebro, ovario, próstata y embrión. Se detectaron bandas adicionales de ~500 y 800 bp en muchos tejidos.

Se crearon los cebadores oligonucleotídicos ZC24198 (ID. SEC. n° 29) y ZC24199 (ID. SEC. n° 30) para abarcar una juntura exónica y producir un fragmento de 204 bp correspondiente a TACI humano. Se detectó expresión en bazo, cerebro, corazón, hígado, colon, pulmón, intestino delgado, músculo, estómago, testículo, placenta, glándula salival, glándula suprarrenal, páncreas, próstata, linfocitos de sangre periférica y médula ósea.

Se crearon los cebadores oligonucleotídicos ZC24271 (ID. SEC. n° 31) y ZC24272 (ID. SEC. n° 32) para abarcar una juntura exónica y producir un fragmento de 329 bp correspondiente a BCMA humano. Se detectó expresión en cerebro, bazo, colon, pulmón, intestino delgado, estómago, ovario, testículo, glándula salival, glándula suprarrenal, próstata, linfocitos de sangre periférica, médula ósea e hígado fetal.

Se crearon los cebadores oligonucleotídicos ZC24495 (ID. SEC. n° 33) y ZC24496 (ID. SEC. n° 34) para abarcar una juntura exónica y producir un fragmento de 436 bp correspondiente a BCMA murino. Se detectó expresión en hígado.

Ejemplo 6

Preparación de vectores de las fusiones TACI-Ig y BCMA-Ig

Construcción del Fragmento Fc4 de Ig gamma-1

Para preparar la proteína de fusión TACI-Ig, la región Fc de IgG1 humana (la región bisagra y los dominios CH2 y CH3) fue modificada para eliminar las funciones receptor de Fc (FcγRI) y unión a complemento (C1q). Esta versión modificada de Fc de IgG1 humana fue llamada Fc4.

La región Fc fue aislada de una librería de hígado fetal humano (Clontech) por PCR usando los cebadores oligonucleotídicos ZC10.134 (ID. SEC. n° 43) y ZC10.135 (ID. SEC. n° 44). Se usó PCR para introducir mutaciones en la región Fc para reducir la unión a FcγRI. El sitio de unión a FcγRI (Leu-Leu-gly-Gly) fue mutado a Ala-Glu-gly-Ala (restos de aminoácido 38-41 de la ID. SEC. n° 45) de acuerdo con Baum et al. (*EMBO J.* 13: 3.992-4.001, 1.994), para reducir la unión a FcR1 (Duncan et al., *Nature* 332: 563-4, 1.988). Se usaron los cebadores oligonucleotídicos ZC15.345 (ID. SEC. n° 46) y ZC15.347 (ID. SEC. n° 47) para introducir la mutación. Para un volumen final de 50 μl se añadieron 570 ng de molde de IgFc, 5 μl de tampón de reacción de Pfu 10x (Stratagene), 8 μl de desoxinucleótido trifosfatos (dNTPs) 1,25 mM, 31 μl de H₂O destilada, y 2 μl de ZC15.345 (ID. SEC. n° 46) y ZC15.347 (ID. SEC. n° 47) 20 mM. Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la mezcla de reacción a 94°C durante 1 minuto. Se añadió polimerasa Pfu (2,5 unidades, Stratagene), lo que fue seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto, seguidos de una extensión de 7 minutos a 72°C. Se sometieron los productos de reacción a electroforesis y se detectó la banda correspondiente al tamaño previsto de ~676 bp. La banda fue escindida del gel y fue recuperada usando el sistema de extracción en gel QIAGEN QIAquick™ (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

También se usó PCR para introducir una mutación de Ala a Ser (resto de aminoácido 134 de la ID. SEC. n° 45) y Pro a Ser (resto de aminoácido 135 de la ID. SEC. n° 45) para reducir la unión del complemento C1q y/o la fijación del complemento (Duncan y Winter, *Nature* 332: 788, 1.988), y el codón de parada TAA. Se realizaron dos reacciones de primer ciclo usando como un molde la secuencia de IgFc mutada en el lado de unión a FcγRI. Para un volumen final de 50 μl se añadieron 1 μl de molde de IgFc mutada en el sitio de unión a FcγRI, 5 μl de tampón de reacción de Pfu 10x (Stratagene), 8 μl de dNTPs 1,25 mM, 31 μl de H₂O destilada, 2 μl de ZC15.517 (ID. SEC. n° 48) 20 mM, un cebador 5' que empieza en el nucleótido 26 de la ID. SEC. n° 45, y 2 μl de ZC15.530 (ID. SEC. n° 49) 20 mM, un cebador 3' que empieza en el complemento del nucleótido 405 de la ID. SEC. n° 45. La segunda mezcla de reacción contenía 2 μl de cada una de las disoluciones originales 20 mM de los cebadores oligonucleotídicos ZC15.518 (ID. SEC. n° 50), un cebador 5' que empieza en el nucleótido 388 de la ID. SEC. n° 45, y ZC15.347 (ID. SEC. n° 47), un cebador 3', para introducir la mutación Ala a Ser, un sitio de restricción Xba I y un codón de parada. Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentaron las mezclas de reacción a 94°C durante 1 minuto. Se añadió polimerasa Pfu (2,5 unidades, Stratagene), lo que fue seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 2 minutos, seguidos de una extensión de 7 minutos a 72°C. Se sometieron los

productos de reacción a electroforesis y se detectaron las bandas correspondientes a los tamaños previstos, ~370 y ~395 bp, respectivamente. Las bandas fueron escindidas del gel y fueron extraídas usando el sistema de extracción en gel QIAGEN QIAquick™ (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó una reacción de segundo ciclo para unir los fragmentos anteriores y añadir el sitio de restricción BamH I 5'. Para un volumen final de 50 µl se añadieron 30 µl de H₂O destilada, 8 µl de dNTPs 1,25 mM, 5 µl de tampón de reacción de polimerasa Pfu 10x (Stratagene), y 1 µl de cada uno de los dos primeros productos de las dos PCR. Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la mezcla de reacción a 94°C durante 1 minuto. Se añadió polimerasa Pfu (2,5 unidades, Stratagene), lo que fue seguido de 5 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, y 72°C durante 2 minutos. Se llevó de nuevo la temperatura a 94°C y se añadieron 2 µl de cada una de las disoluciones originales 20 mM de ZC15.516 (ID. SEC. n° 51), un cebador 5' que empieza en el nucleótido 1 de la ID. SEC. n° 45, y ZC15.347 (ID. SEC. n° 47), lo que fue seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos, y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Una porción de la mezcla de reacción fue visualizada usando electroforesis en gel. Se detectó una banda de 789 bp que correspondía al tamaño previsto.

15 Construcción de los vectores de expresión de TACI-Fc4 y BCMA-Fc4

Plásmidos de expresión que contenían las proteínas de fusión TACI-Fc4 y BCMA-Fc4 fueron construidos en levadura por medio de recombinación homóloga. Se aisló un fragmento de cDNA de TACI usando PCR, que incluía la secuencia polinucleotídica del nucleótido 15 al nucleótido 475 de la ID. SEC. n° 5. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento de TACI eran: (1) un cebador que contenía 40 bp de la secuencia flanqueadora 5' del vector y 17 bp que correspondían al extremo amínico del fragmento de TACI (ID. SEC. n° 52); y (2) 40 bp del extremo 3' correspondiente a la secuencia de Fc4 flanqueadora y 17 bp que correspondían al extremo carboxílico del fragmento de TACI (ID. SEC. n° 53). Para un volumen final de 100 µl se añadieron 10 ng de molde de TACI, 10 µl de tampón de reacción de polimerasa Taq 10x (Perkin Elmer), 8 µl de dNTPs 2,5 mM, 78 µl de H₂O destilada, 2 µl de cada una de las disoluciones originales 20 mM de los cebadores oligonucleotídicos de ID. SEC. n° 52 e ID. SEC. n° 53, y polimerasa Taq (2,5 unidades, Life Technology). Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la mezcla de reacción a 94°C durante 2 minutos, lo que fue seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguidos de una extensión de 5 minutos a 72°C.

Se aisló un fragmento de cDNA de BCMA usando PCR, que incluye la secuencia polinucleotídica del nucleótido 219 al nucleótido 362 de la ID. SEC. n° 7. Los dos cebadores usados en la producción del fragmento de BCMA eran un cebador oligonucleotídico que contenía 40 bp de la secuencia flanqueadora 5' del vector y 17 bp que correspondían al extremo amínico del fragmento de BCMA (ID. SEC. n° 54); y un cebador oligonucleotídico que contenía 40 bp del extremo 3' correspondiente a la secuencia de Fc4 flanqueadora y 17 bp que correspondían al extremo carboxílico del fragmento de BCMA (ID. SEC. n° 55). Para un volumen final de 100 µl se añadieron 10 ng de molde de BCMA, 10 µl de tampón de reacción de polimerasa Taq 10x (Perkin Elmer), 8 µl de dNTPs 2,5 mM, 78 µl de H₂O, y 2 µl de cada una de las disoluciones originales 20 mM de los cebadores oligonucleotídicos de ID. SEC. n° 54 e ID. SEC. n° 55. Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la mezcla de reacción a 94°C durante 2 minutos, lo que fue seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguidos de una extensión de 5 minutos a 72°C.

El fragmento que contiene el cDNA que codifica el fragmento Fc4 fue construido de una manera similar, uno para cada una de las construcciones de fusión de TACI y BCMA. Para TACI, los dos cebadores usados en la producción del fragmento Fc4 eran (aguas arriba y aguas abajo) un cebador oligonucleotídico que contenía 40 bp de la secuencia flanqueadora 5' de TACI y 17 bp que correspondían al extremo amínico del fragmento Fc4 (ID. SEC. n° 56); y un cebador oligonucleotídico que contenía 40 bp del extremo 3' correspondiente a la secuencia vector flanqueadora y 17 bp que correspondían al extremo carboxílico del fragmento Fc4 (ID. SEC. n° 57). Para BCMA, el cebador aguas arriba usado en la producción del fragmento Fc4 era un cebador oligonucleotídico que contenía 40 bp de la secuencia flanqueadora 5' de BCMA y 17 bp que correspondían al extremo amínico del fragmento Fc4 (ID. SEC. n° 58). Para la construcción de BCMA, el cebador aguas abajo para el Fc4 era el mismo que el anteriormente descrito para TACI-Fc4 (ID. SEC. n° 57).

Para un volumen final de 100 µl se añadieron 10 ng del molde de Fc4 anteriormente descrito, 10 µl de tampón de reacción de polimerasa Taq 10x (Perkin Elmer), 8 µl de dNTPs 2,5 mM, 78 µl de H₂O destilada, 2 µl de cada una de las disoluciones originales 20 mM de los oligonucleótidos de ID. SEC. n° 56 e ID. SEC. n° 57 para TACI y los oligonucleótidos de ID. SEC. n° 58 e ID. SEC. n° 57 para BCMA, y polimerasa Taq (2,5 unidades, Life Technology). Se añadió un volumen igual de aceite mineral y se calentó la mezcla de reacción a 94°C durante 2 minutos, lo que fue seguido de 25 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto, seguidos de una extensión de 5 minutos a 72°C.

Se desarrollaron diez microlitros de cada una de las mezclas de reacción PCR de 100 µl anteriormente descritas, en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0,8% (Seaplaque GTG) con tampón TBE 1x para análisis. Los 90 µl restantes de cada reacción PCR fueron sometidos a precipitación mediante la adición de 5 µl de NaCl 1 M y 250 µl de etanol absoluto. El plásmido pZMP6 fue cortado con SmaI para linealizarlo en el policonector. El plásmido pZMP6 procedía del plásmido pCZR199 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE.UU.; ATCC n° 98668) y es un vector de expresión de mamífero que contiene una casete de expresión que tiene el promotor precoz inmediato de CMV, un intrón de consenso procedente de la región variable del locus de cadenas pesadas inmunoglobulínicas de ratón, múltiples sitios de restricción para la inserción de secuencias de codificación, un codón de parada y un

terminador de la hormona de crecimiento humana (hGH; del inglés, human growth hormone). El plásmido tiene también un origen de replicación de *E. coli*, una unidad de expresión de marcadores seleccionables de mamífero que tiene un promotor, potenciador y origen de replicación del virus 40 de simios (SV40; del inglés, simian virus 40), un gen de DHFR y el terminador de SV40. El vector pZMP6 fue construido a partir de pCZR199 por sustitución del promotor de metalotioneína por el promotor precoz inmediato de CMV, y las secuencias de Kozac en el extremo 5' del marco de lectura abierto.

Se combinaron cien microlitros de células de levadura competentes (*S. cerevisiae*) con 10 μ l que contenían aproximadamente 1 μ g tanto del dominio extracelular de TACI o BCMA como de los fragmentos de PCR de Fc4 apropiados para recombinación con cada uno de ellos, y 100 ng del vector pZMP6 sometido a digestión con SmaI, y se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,2 cm. Las mezclas de levadura/DNA fueron sometidas a impulsos eléctricos de 0,75 kV (5 kV/cm), ∞ ohmios, 25 μ F. Se añadieron 600 μ l de sorbitol 1,2 M a cada cubeta, y las levaduras fueron sembradas en dos partes alícuotas de 300 μ l en placas URA-D y fueron incubadas a 30°C.

Después de aproximadamente 48 horas, los transformantes de levadura Ura+ de una sola placa fueron resuspendidos en 1 ml de H₂O y fueron centrifugados brevemente para recoger las células de levadura como sedimento. El sedimento celular fue resuspendido en 1 ml de tampón de lisis (Triton X-100 al 2%, SDS al 1%, NaCl 100 mM, Tris 10 mM, pH de 8,0, EDTA 1 mM). Se añadieron quinientos microlitros de la mezcla de lisis a un tubo Eppendorf que contenía 300 μ l de glóbulos de vidrio lavados con ácido y 200 μ l de fenol-cloroformo y se revolvió la mezcla dos o tres veces durante intervalos de 1 minuto con formación de remolinos, lo que fue seguido de una centrifugación de 5 minutos en una centrifugadora Eppendorf a la máxima velocidad. Se transfirieron trescientos microlitros de la fase acuosa a un tubo nuevo y se hizo precipitar el DNA con 600 μ l de etanol (EtOH), lo que fue seguido de centrifugación durante 10 minutos a 4°C. El sedimento de DNA fue resuspendido en 100 μ l de H₂O.

La transformación de células de *E. coli* electrocompetentes (DH10B, GibcoBRL) fue realizada con 0,5-2 ml de preparación de DNA de levadura y 40 μ l de células DH10B. Las células fueron sometidas a impulsos eléctricos de 2,0 kV, 25 mF y 400 ohmios. Después de la electroporación, se sembró 1 ml de SOC [triptona Bacto (Difco, Detroit, Michigan, EE.UU.) al 2%, extracto de levadura (Difco) al 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucosa 20 mM] en partes alícuotas de 250 μ l en cuatro placas LB AMP [caldo LB (Lennox), agar Bacto (Difco) al 1,8%, 100 mg/l de ampicilina].

Los clones individuales que contenían la correcta construcción de expresión para TACI-Fc4 o BCMA-Fc4 fueron identificados por digestión de restricción para verificar la presencia del inserto y confirmar que las diversas secuencias de DNA habían sido correctamente unidas entre sí. El inserto de los clones positivos fue sometido a un análisis de secuencia. Se aisló DNA plasmídico a mayor escala usando el sistema Qiagen Maxi (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Ejemplo 7

Expresión de TACI-Fc4 y BCMA-Fc4 en mamífero

Células BHK 570 (ATCC n° CRL-10314) fueron sembradas en placas de 10 cm para cultivo tisular y fueron dejadas crecer hasta una confluencia de aproximadamente 50 a 70% durante la noche a 37°C, CO₂ al 5%, en medio DMEM/FBS [DMEM, Gibco/BRL High Glucose (Gibco BRL, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.), suero bovino fetal (Hyclone, Logan, Utah, EE.UU.) al 5%, L-glutamina (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas, EE.UU.) 1 mM, piruvato sódico (Gibco BRL) 1 mM]. Las células fueron luego transfectadas con el plásmido TACI-Fc4/pZMP6 o BCMA-Fc4/pZMP6, usando Lipofectamine™ (Gibco BRL), en una formulación de medio exenta de suero (SF; del inglés, serum free) (DMEM, 10 mg/ml de transferrina, 5 mg/ml de insulina, 2 mg/ml de fetuína, L-glutamina al 1% y piruvato sódico al 1%). Se diluyó TACI-Fc4/pZMP6 o BCMA-Fc4/pZMP6 hasta un volumen final total de 640 μ l con medio SF en tubos de 15 ml de capacidad. Se mezclaron 35 μ l de Lipofectamine™ (Gibco BRL) con 605 μ l de medio SF. Se añadió la mezcla de Lipofectamine™ a la mezcla de DNA y se dejó todo en incubación a temperatura ambiental durante aproximadamente 30 minutos. Se añadieron cinco mililitros de medio SF a la mezcla de DNA:Lipofectamine™. Se enjuagaron las células una vez con 5 ml de medio SF y se succionaron, y se añadió la mezcla de DNA:Lipofectamine™. Se incubaron las células a 37°C durante cinco horas y luego se añadieron 6,4 ml de medio DMEM/FBS al 10%, penicilina-estreptomicina-neomicina al 1% a cada placa. Las placas fueron incubadas a 37°C durante la noche, y la mezcla de DNA:Lipofectamine™ fue sustituida por medio FBS al 5%/DMEM fresco el día siguiente. El día 5 después de la transfección, las células fueron repartidas en matraces T-162, en medio de selección (DMEM/FBS al 5%, L-Glu al 1%, piruvato sódico al 1%). Aproximadamente 10 días después de la transfección, dos placas de cultivo de 150 mm de colonias resistentes al metotrexato procedentes de cada transfección fueron tratadas con tripsina, y las células fueron reunidas, sembradas en un matraz T-162 y transferidas a un cultivo a gran escala.

Ejemplo 9

Expresión transgénica de ztnf4

Se crearon animales transgénicos que expresaban genes de ztnf4 usando machos fértiles adultos (B6C3f1), hembras fértiles prepubescentes (B6C3f1), machos sometidos a vasectomía (B6D2f1) y hembras fértiles adultas (B6D2f1) (todos de Taconic Farms, Germantown, New York, EE.UU.). Se hizo que las hembras fértiles prepubescentes supe-

rovularan usando gonadotropina de suero de yegua preñada (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) y gonadotropina coriónica humana [hCG; del inglés, human chorionic gonadotropin (Sigma)]. Las hembras con superovulación fueron posteriormente apareadas con machos fértiles adultos, y la copulación fue confirmada por la presencia de tapones vaginales.

Los óvulos fertilizados fueron recogidos bajo un ámbito quirúrgico (Estereomicroscopio Leica MZ12, Leica, Wetzlar, Alemania). Los óvulos fueron luego lavados en hialuronidasa y medio W640 de Whitten (Tabla 8; todos los reactivos asequibles de Sigma Chemical Co.) que había sido incubado con CO₂ al 5%, O₂ al 5% y N₂ al 90% a 37°C. Los óvulos fueron guardados en una incubadora a 37°C/CO₂ al 5% hasta la microinyección.

TABLA 8

Medio 640 de WHITTEN

	mg/200 ml	mg/500 ml
NaCl	1.280	3.200
KCl	72	180
KH ₂ PO ₄	32	80
MgSO ₄ ·7H ₂ O	60	150
Glucosa	200	500
Lactato Ca ²⁺	106	265
Bencilpenicilina	15	37,5
Estreptomycin-SO ₄	10	25
NaHCO ₃	380	950
Piruvato Na	5	12,5
H ₂ O	200 ml	500 ml
EDTA 500 mM	100 µl	250 µl
Rojo fenol al 5 %	200 µl	500 µl
BSA	600	1.500

El marco de lectura abierto de 858 bp que codifica el ligando Blys de TACI humano de longitud completa (ID. SEC. n° 35) fue multiplicado por PCR con objeto de introducir un codón de iniciación optimizado y sitios 5' *PmeI* y 3' *AscI* flanqueadores usando los cebadores oligonucleotídicos de ID. SEC. n° 36 e ID. SEC. n° 37. Este fragmento *PmeI/AscI* fue subclonado en pKFO24, un vector transgénico restringido a células B y/o T que contiene el potenciador E_m de Ig (fragmento *NotI/XbaI* de 690 bp de pE_mSR; Bodrug et al., *EMBO J.* 13: 2.124-30, 1.994), el promotor V_h de Ig (fragmento *HincII/HxoI* de 536 bp de pJHIX(-); Hu et al., *J. Exp. Med.* 177: 1.681-90, 1.993), el intrón 16S de SV40 (fragmento *XhoI/HindIII* de 171 bp de pE_mSR), un policonector *PmeI/AscI*, y la señal de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento humana (fragmento *SmaI/EcoRI* de 627 bp; Seeburg, *DNA* 1: 239-49, 1.982). El inserto transgénico fue separado de la estructura plasmídica por digestión con *NotI* y purificación en gel de agarosa, y los óvulos fertilizados de los apareamientos de ratones B6C3F1Tac anteriormente descritos fueron microinyectados e implantados en hembras pseudopreñadas esencialmente del modo previamente descrito (Malik et al., *Molec. Cell. Biol.* 15: 2.349-58, 1.995).

Los receptores fueron devueltos a las jaulas por parejas y fueron dejados en una gestación de 19-21 días. Después del parto, se dejaron 19-21 días de posparto antes de la determinación del sexo y el destete, y se cortaron 0,5 cm de la cola con unas tijeras limpias para biopsia (usados para determinación del genotipo).

Se preparó DNA genómico a partir de los recortes de la cola usando un sistema comercialmente asequible (Dneasy 96 Tissue Kit; Qiagen, Valencia, California, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA genómico fue analizado por PCR usando cebadores diseñados para la porción 3' UTR (región no traducida; del inglés, untranslated region) de la hormona de crecimiento humana (hGH) del vector transgénico. Los cebadores ZC17251 (ID. SEC. n° 38) y ZC17252 (ID. SEC. n° 39) multiplican un fragmento de 368 pares de bases de hGH. El uso de una región única con respecto a la secuencia humana (identificada a partir de una alineación de las secuencias de DNA 3' UTR de las hormonas de crecimiento humana y de ratón) aseguraba que la reacción PCR no multiplicaba la secuencia de ratón. Además, pueden usarse los cebadores ZC17156 (ID. SEC. n° 40) y ZC17157 (ID. SEC. n° 41), que se hibridan con secuencias del vector y multiplican el inserto de cDNA, junto con los cebadores de hGH. En estos experimentos, el DNA de animales positivos para el transgén generaba dos bandas, una banda de 368 pares de bases correspondiente al fragmento 3' UTR de hGH, y una banda de tamaño variable que correspondía al inserto de cDNA.

Una vez que se confirmó que los animales eran transgénicos (TG), fueron retrocruzados en una cepa consanguínea al colocar una hembra TG con un macho de tipo silvestre, o un macho TG con una o dos hembras de tipo silvestre. Una vez nacidas y destetadas las crías, se separaron por sexo y se cortaron muestras de la cola con unas tijeras para determinación del genotipo.

Para comprobar la expresión de un transgén en un animal vivo, se lleva a cabo una biopsia de supervivencia. El análisis del nivel de expresión de mRNA de cada transgén fue realizado usando un ensayo de hibridación en disolución de RNA o una PCR en tiempo real en un dispositivo ABI Prism 7700 (PE Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación celular y citometría de flujo

Se analizaron los ratones fundadores a distintas edades. Para el análisis citométrico de flujo (FACS) de tejidos linfoides, se aislaron células de médula ósea (BM; del inglés, *bone marrow*) de fémures y tibias por deshacimientto cuidadoso en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) usando un mortero y su maja. Las células fueron resuspendidas, desprovistas de fragmentos óseos por sedimentación pasiva y recogidas como sedimento de una centrifugación a 1.000 x g. Se obtuvieron esplenocitos, timocitos o células de ganglio linfático aplastando tejidos intactos entre portaobjetos de vidrio, y luego resuspendiendo y recogiendo las células como sedimento de centrifugación de igual modo que para BM. Antes de su tinción, las células fueron resuspendidas en tampón de lavado (WB; del inglés, *wash buffer*) de FACS (disolución salina equilibrada de Hank, BSA al 1%, Hepes 10 mM, pH de 7,4) en una concentración de 20 x 10⁶ células/ml. Para la tinción, 1 x 10⁶ células fueron transferidas a tubos de 5 ml de capacidad, lavadas con 1 ml de WB de FACS y luego recogidas como sedimento de una centrifugación a 1.000 x g. Las células fueron luego incubadas sobre hielo durante 20 minutos en presencia de cantidades saturantes de los apropiados anticuerpos monoclonales (mAbs; del inglés, *monoclonal Antibodies*) conjugados con FITC, PE y/o TriColor(TC), en un volumen total de 100 ml en WB de FACS. Las células fueron lavadas con 1,5 ml de WB y recogidas como sedimento de centrifugación, y fueron luego resuspendidas en 400 ml de WB y analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur usando el programa informático CellQuest (Becton Dickinson, Mountain View, California, EE.UU.). Se ajustaron detectores a escala lineal para las dispersiones lumínicas directa (FSC; del inglés, *forward scatter*) y lateral (SSC; del inglés, *side scatter*), mientras que se usaron detectores logarítmicos para los tres canales de fluorescencia (FL-1, FL-2 y FL-3).

En cada experimento, se llevó a cabo una compensación para el solapamiento espectral entre canales FL usando poblaciones celulares teñidas con un solo color. Todas las células fueron recogidas sin selección en un disco, y los datos fueron analizados usando el programa informático CellQuest. Los glóbulos rojos y las células muertas fueron excluidas al seleccionar electrónicamente los datos sobre la base de los perfiles FSC frente a SSC.

Anticuerpos

Los mAbs anti-CD8 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (clon 53-6.7) y anti-CD4 conjugado con ficeotritina (PE) (clon RM4-5), anti-CD5 (clon 53-7.3), anti-CD19 (clon 1D3) y antisindecán (clon 281-2) fueron adquiridos a PharMingen (San Diego, California, EE.UU.). El mAb anti-CD45R/B220 conjugado con Tricolor(TC) (clon RA3-6B2) fue adquirido a Caltag.

Ratones transgénicos que sobreexpresan *ztnf4* en el compartimiento linfoide desarrollan números aumentados de células B periféricas, células plasmáticas aumentadas y niveles elevados de inmunoglobulina sérica. Estos animales transgénicos tienen un número aumentado de células B200+ en el bazo, los ganglios linfáticos y el timo. El número aumentado de células B esplénicas incluye tanto células B-2 convencionales como la población de células B-1 normalmente rara. En general, las células B-1 están en gran parte confinadas en la cavidad peritoneal y otras cavidades corporales, producen anticuerpos autorreactivos de baja afinidad y se han asociado a menudo con el desarrollo de enfermedades autoinmunes tales como el lupus sistémico eritematoso (SLE).

Los animales transgénicos más viejos producen autoanticuerpos y desarrollan proteinuria y glomérulos escleróticos, características del lupus sistémico eritematoso.

La Figura 5A muestra suspensiones celulares independientes de bazo (gráfico superior), ganglio linfático mesentérico (gráfico central) y médula ósea (gráfico inferior) preparadas del modo descrito más adelante, teñidas con anti-B220-TC y analizadas por citometría de flujo. El número de células B220+ en cada tejido fue calculado multiplicando el porcentaje de células B220+ por el número total de células vivas (exclusión de azul de tripano) contadas con un hemocitómetro. Cada barra representa datos de ratones individuales transgénicos en cuanto a *ztnf4* (TG, barras sombreadas) o compañeros de camada testigo no-TG (barras claras).

La Figura 5B muestra células aisladas de ganglio linfático (fila superior), bazo (filas centrales) y timo (fila inferior) de ratones TG en cuanto a *ztnf4* (gráficos a mano derecha) y de compañeros de camada no-TG (gráficos a mano izquierda), teñidas con mAbs hacia las moléculas indicadas (CD5, CD4 y CD8) y luego analizadas por citometría de flujo. Los datos mostrados fueron seleccionados para excluir las células muertas y los glóbulos rojos.

La Figura 5C muestra niveles totales de IgG, IgM e IgE en suero de ratones transgénicos en cuanto a *ztnf4* con una edad que variaba de 6 a 23 semanas.

La Figura 5D muestra el depósito de amiloide y el mesangio engrosado de los glomérulos identificados en secciones renales, teñidas con H&E, de ratones transgénicos en cuanto a *ztnf4* en comparación con glomérulos normales de compañeros de camada testigo.

ES 2 204 502 T3

La Figura 5E muestra un aumento de células T efectoras en ratones transgénicos en cuanto a ztnf4, similar al comunicado por Mackay et al. (J. Exp. Med. 190: 1.697-1.710, 1.999).

Se inyectan (ip, im o iv) fusiones solubles de TACI (BR43x2) o BCMA- Ig a animales transgénicos que sobreexpresan ztnf4. Se usará un análisis citométrico de flujo (FACS) de tejidos linfoides para identificar cualquier cambio en el número de células B B220+ en el bazo, los ganglios linfáticos y el timo.

Ejemplo 10

ELISA de unión directo

Se desarrolló un ELISA de unión directo para caracterizar la capacidad de TACI-Ig soluble o BCMA-Ig soluble para unirse a, e inhibir, la actividad biológica de ztnf4 *in vitro*.

Una placa de 96 pocillos fue revestida con 1 µg/ml de anti-Ig humana de cabra (Jackson Labs, Bar Harbor, Massachusetts, EE.UU.) en tampón ELISA A (Na₂HCO₃ 0,1 M, pH de 9,6, NaN₃ al 0,02%) y fue incubada durante la noche a 4°C. TACI, BCMA, y un receptor de TNF no relacionado tal como ztnfr10 (ID. SEC. nº 42), como un testigo, fueron titulados mediante diluciones a la quinta parte desde 10 µg/ml hasta 320 ng/ml más un cero y coinubados con 2,5, 0,5 ó 0,1 µg/ml de ztnf4 biotinilado u ovalbúmina como un testigo negativo, y fueron incubados durante 1 hora a temperatura ambiental.

La mezcla de receptor-ligando biotinilado coinubados fue luego añadida a las placas de 96 pocillos revestidos con anti-Ig humana de cabra. Las placas fueron luego lavadas [ELISA C, 500 µl de Tween 20 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, EE.UU.), 200 mg de NaN₃, PBS hasta un volumen final de 1 litro] y bloqueadas con Superblock (Pierce, Rockford, Illinois, EE.UU.). Las placas fueron luego incubadas a 37°C durante 2 horas.

Las placas son lavadas una vez más con ELISA C, lo que va seguido de la adición de 100 µl/pocillo de NeutrAvidin™-HRP a 1:10.000 en ELISA B [5 ó 10 µg de BSA (Sigma) para BSA al 1% o 2%, respectivamente, 250 µl de Tween 20 (Sigma), 100 mg de NaN₃, disolución salina tamponada con fosfato, pH de 7,2 (PBS, Sigma), hasta un volumen final de 500 ml; alternativamente, el tampón puede ser preparado como BSA al 1% o 2% en tampón ELISA C]. Las placas son luego desarrolladas con o-fenilendiamina (OPD; del inglés, ortho-phenylendiamine) durante 10 minutos a temperatura ambiental y son leídas a 492 nm.

Ejemplo 11

Ensayo de actividad biológica

Se desarrolló un ensayo de actividad biológica para medir la inhibición, por TACI-FC soluble, de la estimulación de células B humanas por ztnf4 soluble. Se aislaron células B de células mononucleares de sangre periférica (PBMNC) usando glóbulos magnéticos-CD19 y el sistema de separación magnético VarioMacs (Miltenyi Biotec, Auburn, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células B purificadas fueron mezcladas con ztnf4 soluble (25 ng/ml) e IL-4 humana recombinante (10 ng/ml, Pharmigen) y fueron sembradas (por triplicado) en placas de 96 pocillos de fondo redondo en una cantidad de 1 x 10⁵ células por pocillo.

TACI-FC soluble fue diluido de 5 µg/ml a 6 ng/ml y fue incubado con las células B durante 5 días, estimulando durante la noche del día 4 con 3,7 x 10⁴ Bq de ³H-timidina (Amersham) por pocillo. Como un testigo, también se incubó TACI-FC soluble con células B e IL-4 sin ztnf4 presente.

Las placas fueron recolectadas usando la cosechadora Packard de placas y fueron contadas usando el lector Packard. El receptor soluble TACI-Ig inhibía la capacidad de ztnf4 soluble para estimular la proliferación de células B *in vitro* de un modo dependiente de la dosis. Un exceso molar de TACI-Ig de 10 veces inhibe completamente la proliferación de células B humanas en respuesta a ztnf4 soluble en presencia de IL-4.

Ejemplo 12

Ensayo ORIGIN

Se determinaron los niveles de ztnf4 en individuos con un estado morbooso (tal como SLE o artritis reumatoide, por ejemplo) con respecto a los de individuos normales usando un ensayo de electroquimioluminiscencia (ECL; del inglés, electrochemiluminescence). Se preparó una curva patrón a partir de ztnf4 humano soluble en unas concentraciones de 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml y 0 ng/ml en tampón ORIGIN (Igen, Gaithersburg, Maryland, EE.UU.). Se diluyeron muestras de suero en tampón ORIGIN. Los patrones y las muestras se incubaron a temperatura ambiental durante 2 horas con anticuerpo anti-ztnf4-NF BV humano biotinilado de conejo, diluido hasta 1 µg/ml en tampón de ensayo Origin (Igen), y anticuerpo policlonal anti-ztnf4-NF BV humano rutenilado de conejo, diluido hasta 1 µg/ml en tampón de ensayo Origin (IGEN). Después de la incubación, se removieron las muestras con formación de remolinos y se añadieron 50 µl/tubo de Dynabeads-estreptavidina a 0,4 mg/ml (Dynal, Oslo, Noruega) a cada uno de los patrones y muestras, realizándose una incubación a temperatura ambiental durante 30 minutos. Las muestras fueron luego removidas con formación de remolinos y fueron leídas en un analizador Origin (Igen) de acuerdo con las instrucciones

del fabricante. El ensayo Origin se basa en la electroquimioluminiscencia y produce una lectura en ECL: ¿qué es esto, cómo actúa y qué te dice?

Se detectó un nivel elevado de *ztnf4* en las muestras de suero de ratones tanto NZBWF1/J como MRL-Mpj-Fas^{lpr} que han progresado hasta fases avanzadas de glomerulonefritis y enfermedad autoinmune.

Ejemplo 13

TACI-Ig soluble en un modelo espontáneo de SLE

Los ratones NZBW se vuelven sintomáticos en cuanto a SLE espontáneo a aproximadamente los 7-9 meses de edad. Se administró TACI-Fc a ratones NZBW para determinar su efecto supresor sobre células B a lo largo del periodo de 5 semanas en que, por término medio, se piensa que la producción de autoanticuerpos por células B está en niveles elevados en los ratones NZBW.

Se dividieron cien hembras de ratón (NZB x NZW)_{F1} de 8 semanas de edad (Jackson Labs) en 6 grupos de 15 ratones. Antes del tratamiento, se determinó una vez al mes la proteína úrica de los ratones y se extrajo sangre para cuenta sanguínea completa (CBC; del inglés, complete blood count) y depósito de suero. El suero será explorado en cuanto a la presencia de autoanticuerpos. Puesto que la proteinuria es la marca de contraste de la glomerulonefritis, los niveles de proteína úrica se determinaron mediante tira reactiva a intervalos regulares a lo largo del curso del estudio. Antes del tratamiento, los animales fueron pesados. La dosificación empezó cuando los ratones tenían aproximadamente 5 meses de edad. Los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de vehículo solo (PBS) o IgG-FC humano (proteína testigo) o TACI-FC4 (proteína de ensayo) tres veces a la semana durante 5 semanas.

Grupo (5 ratones cada uno)	Tratamiento	Dosis
1	Testigo no tratado	
2	Vehículo solo	
3	IgG-FC humano	20 µg
4	IgG-FC humano	100 µg
5	TACI-FC4 humano	20 µg
6	TACI-FC4 humano	100 µg

Se recogió sangre dos veces durante la dosificación y se recogerá al menos dos veces tras la dosificación. Se determinaron los valores de proteinuria mediante tira reactiva y los pesos corporales cada dos semanas una vez que hubo comenzado la dosificación. Se recogieron sangre, el valor úrico mediante tira reactiva y el peso corporal en el momento de la eutanasia. Se obtuvieron los pesos del bazo, timo, hígado con vesícula biliar, riñón izquierdo y cerebro. Se dividieron el bazo y el timo para análisis por FACS e histología. También se recogerán glándulas salivales submandibulares, cadena de ganglios linfáticos mesentéricos, lóbulo hepático con vesícula biliar, ciego e intestino grueso, estómago, intestino delgado, páncreas, riñón derecho, glándula suprarrenal, lengua con tráquea y esófago, corazón y pulmones para histología.

La Figura 6 muestra un nivel elevado de *ztnf4* en suero de ratones NZBWF1 y MRL/lpr/lpr que se correlaciona con el desarrollo de SLE. El gráfico superior de la Figura 6A muestra la correlación de los niveles séricos de *ztnf4* con la edad, 68 ratones NZBWF1 con una edad que variaba de 10 a 40 semanas y ratones testigo NZB/B de 10 semanas y 30 semanas de edad. El gráfico central muestra la correlación con proteinuria en tres intervalos, indicios a 20 mg/dl (I-30), 100-300 mg/dl y 2.000 mg/dl en ratones NZBWF1, comparada con la de ratones NZB/B testigo. El gráfico inferior muestra niveles de *ztnf4* con diversos títulos de anticuerpo anti-dsDNA en ratones NZBWF1, comparados con los de ratones NZB/B testigo.

La Figura 6B muestra las mismas correlaciones realizadas en 23 ratones MRL/lpr/lpr con una edad que variaba de 18 a 24 semanas y 10 ratones MRL/MpJ testigo de 11 semanas de edad.

La Figura 7 muestra resultados de urianálisis. Se consideró que los ratones tenían proteinuria si la lectura de la tira reactiva era ≥ 100 mg/dl. (A) PBS; (B) FC de IgG humano, 100 mg; (C) FC de IgG humano, 20 mg; (D) TACI-IgG humano, 100 mg; y (E) TACI-IgG humano, 20 mg. Los ratones tratados con la fusión TACI-IgG soluble mostraron un reducción de proteinuria.

El análisis de la sangre periférica de los animales tratados reveló que las cuentas de glóbulos blancos y linfocitos estaban reducidas en los ratones tratados con TACI-FC (20 y 100 mg) en comparación con las de los ratones tratados con FC (20 y 100 mg) y con PBS, 2 semanas después del inicio del tratamiento. El análisis por FACS (selección de

ES 2 204 502 T3

linfocitos) de sangre periférica extraída seis semanas después de que empezara el tratamiento (dos semanas después de que se administrara el último tratamiento) mostró una drástica reducción del porcentaje de células B presentes en las muestras. Los niveles de células B continuaron menguando a las cinco semanas después de que se administrara el último tratamiento, aunque no tan drásticamente. La Tabla 9 proporciona la media (y la desviación estándar) para los ratones de cada grupo de tratamiento. La reducción del porcentaje de células B en sangre periférica también se observó a las dos semanas de tratamiento.

TABLA 9

Tratamiento	Semana 2		Semana 5
	% de células B	% de células T	% de células B
PBS	26,05 (6,52)	67,05 (6,80)	20,83 (3,14)
100 mg de FC	23,34 (5,77)	68,23 (7,30)	25,04 (8,07)
20 mg de FC	24,09 (6,26)	65,27 (7,18)	18,96 (6,42)
100 mg de TACI-FC	11,07 (5,03)	79,06 (6,71)	14,79 (4,76)
20 mg de TACI-FC	16,37 (7,27)	69,72 (8,90)	19,14 (5,27)

Ejemplo 14

TACI-Ig soluble en ratones normales

Se administró TACI-FC a ratones Balb/C para determinar su efecto sobre ratones normales. Sesenta hembras de ratón Balb/C (HSD) de 8 semanas de edad fueron divididas en 12 grupos de 5 ratones. Antes del tratamiento, se pesaron los ratones y se les extrajo sangre para CBC y depósito de suero. Los grupos 1-9 recibieron inyecciones intraperitoneales (ip) de vehículo solo (PBS) o IgG-FC humano (proteína testigo) o TACI-FC4 (proteína de ensayo) diariamente durante 12 días y fueron sacrificados el día 14. Los grupos 10 y 11 recibieron inyecciones ip tres veces por semana durante dos semanas y fueron sacrificados el día 14.

Grupo (5 ratones cada uno)	Tratamiento	Dosis
1	TACI-FC4 humano	200 mg
2	TACI-FC4 humano	100 mg
3	TACI-FC4 humano	20 μ g
4	TACI-FC4 humano	5 μ g
5	FC4 humano	200 μ g
6	FC4 humano	100 mg
7	FC4 humano	20 mg
8	FC4 humano	5 mg
9	vehículo solo	tal cual
10	TACI-FC4 humano	100 mg
11	FC4 humano	100 mg
12	testigo no tratado	

Se recogió sangre los días 7 y 12. Se recogió sangre y se determinó el peso corporal en el momento de la eutanasia. Se obtuvieron los pesos del bazo, timo y cerebro. Se dividieron el bazo y el timo para análisis por FACS e histología. También se recogieron piel, bazo, cadena de ganglios linfáticos mesentéricos, glándulas salivales submandibulares, ovario, útero, cervix, vejiga, lóbulo hepático con vesícula biliar, ciego e intestino grueso, estómago, intestino delgado, páncreas, riñón derecho, glándula suprarrenal, lengua con tráquea y esófago, corazón, timo, músculo del muslo, fémures izquierdo y derecho y cerebro para histología.

Como antes se describió en el Ejemplo 13, se vio una reducción significativa del porcentaje de células B los días 7 (por CBC) y 12 (usando FACS) en las células de sangre periférica obtenidas de todas las muestras tratadas con TACI-FC4, en comparación con las tratadas con FC4 o PBS solos y analizadas por CBC o FACS. Además, el día 14 hubo una disminución de células B de casi el 50% en los bazo obtenidos de animales tratados con TACI-FC4, en comparación con los de ratones tratados con FC4.

Ejemplo 15

ELISA anti-dsDNA

La autoinmunidad se caracteriza por niveles elevados de anticuerpos anti-DNA de doble cadena. Para medir los niveles de anticuerpos anti-dsDNA tanto en los ratones transgénicos que sobreexpresan *ztnf4* como en los ratones NZBW, se desarrolló un ensayo ELISA. Una placa de microtitulación de 96 pocillos fue revestida con poli-L-lisina (Sigma; 20 µl/ml en tampón de Tris 0,1 M, pH de 7,3) en una cantidad de 75 µl/pocillo y fue incubada durante la noche a temperatura ambiental. Las placas fueron luego lavadas en H₂O destilada y fueron revestidas con poli-dAdT (Sigma; 20 µl/ml en tampón de Tris 0,1 M, pH de 7,3) en una cantidad de 75 µl/pocillo y fueron incubadas a temperatura ambiental durante 60 minutos. Las placas fueron luego lavadas con H₂O destilada y fueron bloqueadas con BSA (Sigma) al 2% en tampón de Tris durante 30 minutos a temperatura ambiental, lo que fue seguido de un lavado final en H₂O destilada.

Se obtuvieron muestras de suero de los ratones transgénicos en cuanto a *ztnf4* descritos en el Ejemplo 10 y de los ratones NZBW descritos en el Ejemplo 11. Las muestras de suero fueron diluidas a 1:50 en BSA al 1%/gamma-globulina bovina (BGG; del inglés, bovine gamma globulin) al 2% (Calbiochem) en tampón de Tris. Las muestras diluidas fueron luego tituladas en la placa revestida a 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1.600, 1:3.200 y 1:6.400 (50 µl/pocillo) y fueron incubadas durante 90 minutos a temperatura ambiental.

Luego se lavaron las placas en H₂O destilada y se añadió anti- IgG-Fc de ratón-HRP, generado en cabra (Cappel), diluido a 1:1.000 en BSA al 1%/BGG al 2%, en una cantidad de 50 µl/pocillo. Las placas fueron incubadas durante 60 minutos a temperatura ambiental. Las placas fueron lavadas 5 veces en H₂O destilada y fueron desarrolladas con OPD, 1 tableta/10 ml de Novo D, añadida en una cantidad de 100 µl/pocillo. El revelador fue detenido con H₂SO₄ 1 N, 100 µl/pocillo, y la densidad óptica (OD; del inglés, optical density) fue leída a 492 nm.

La Figura 8 muestra los niveles de anti-dsDNA en dos ratones transgénicos en cuanto a *ztnf4* (23 semanas de edad) y dos compañeros de camada no transgénicos, en comparación con los niveles detectados en el suero de ratones NZBWF1 (32 semanas de edad) y MRL/lpr/lpr (19 semanas de edad).

Ejemplo 16

TACI-Ig soluble en un modelo espontáneo de encefalomiелitis alérgica experimental

Veinticinco hembras de ratón PLxSJL F1 (12 semanas de edad, Jackson Labs) recibieron una inyección subcutánea de 125 µg/ratón de antígeno [proteína proteolípida (PLP; del inglés, proteolipid protein) de la mielina, restos 139-151], formulada en adyuvante completo de Freund. Los ratones son divididos en 5 grupos de 5 ratones. Los días 0 y 2 se administran inyecciones intraperitoneales de toxina pertussis (400 ng). Los grupos recibirán una dosis 1x, 10x o 100x de TACI, BCMA o BR43x2, un grupo sólo recibirá vehículo y un grupo no recibirá tratamiento alguno. La terapia de prevención comenzará el día 0; la terapia de intervención comenzará el día 7 o al inicio de los síntomas clínicos. Los síntomas de enfermedad, pérdida de peso y parálisis se manifiestan en aproximadamente 10-14 días y duran aproximadamente 1 semana. Los animales son evaluados diariamente obteniendo sus pesos corporales y asignándoles una calificación clínica que corresponda al grado de sus síntomas. Los síntomas clínicos de la EAE aparecen a los 10-14 días de la inoculación y persisten durante aproximadamente 1 semana. Al final del estudio, todos los animales son sometidos a eutanasia por sobredosis de gas y a necropsia. El cerebro y la columna vertebral son recogidos para histología o son congelados para análisis de mRNA. Los datos de peso corporal y calificación clínica son representados gráficamente por individuo y por grupo.

Calificación clínica

- | | |
|-----|--|
| 0 | normal |
| 0,5 | débil, el tono de la cola puede estar reducido pero no ausente |
| 1 | cola flácida (el ratón no puede elevar la cola cuando es cogido por la base de la cola) |
| 2 | cola flácida, patas débiles (no puede elevar la cola, puede permanecer derecho sobre las patas traseras pero las patas están temblorosas). |
| 3 | paresia (no puede sentarse con las patas bajo el cuerpo, anda echando las patas hacia los lados y hacia atrás) |
| 4 | parálisis (no puede mover las patas traseras, arrastra las patas cuando intenta andar) |

- 5 cuadruplejia (parálisis en las patas delanteras o andadura siguiendo un patrón circular; puede tener la cabeza ladeada)
- 6 moribundo (completamente paralizado, no puede alcanzar la comida ni el agua; animal para sacrificar)

5 Ejemplo 17

TACI-FC y el modelo “artritis provocada por colágeno” para artritis reumatoide

10 Se dividen machos de ratón DBA/1J (Jackson Labs) de ocho semanas de edad en grupos de 5 ratones/grupo y se les administran dos inyecciones subcutáneas de 50-100 μ l de colágeno (procedente de pollo o bovino) en concentración de 1 mg/ml, en intervalos de 3 semanas. Un testigo no recibirá inyecciones de colágeno. La primera inyección es formulada en adyuvante completo de Freund y la segunda inyección es formulada en adyuvante incompleto de Freund. Se administrará profilácticamente TACI-FC en el momento, o antes, de la segunda inyección, o una vez que el animal ha desarrollado una calificación clínica de 2 o más que persiste al menos 24 horas. Los animales comienzan a mostrar síntomas de artritis después de la segunda inyección de colágeno, normalmente en 2-3 semanas. El grado de enfermedad es evaluado en cada pata utilizando un calibre para medir el grosor de las patas y asignar una calificación clínica (0-4) a cada pata; calificación clínica: 0 normal, 1 punta(s) de la(s) pata(s) inflamada(s), 2 ligera inflamación de las patas, 3 moderada inflamación de las patas, y 4 grave inflamación de las patas. Los animales fueron sometidos a eutanasia una vez que se hubo establecido la enfermedad durante un determinado periodo de tiempo, normalmente 20 7 días. Se recogen las patas para histología o análisis de mRNA y se recoge suero para ensayos de inmunoglobulinas y citoquinas.

Ejemplo 18

25 *Anticuerpos neutralizantes hacia TACI*

Se prepararon anticuerpos policlonales antipeptídicos al inmunizar 2 hembras de conejo blanco de Nueva Zelanda con el péptido, huztnf4-1 SAGIAKLEE- GPELQLAIPRE (ID. SEC. n° 59) o huztnf4-2 SFKRGSAALEEKENKELV-KET (ID. SEC. n° 60). Los péptidos fueron sintetizados usando un sintetizador peptídico Applied Biosystems Model 30 431A (Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los péptidos fueron luego conjugados con el vehículo proteico, hemocianina de *Fissurella* (KLH), mediante activación con maleimida. Cada conejo recibió una inyección intraperitoneal (ip) inicial de 200 μ g de péptido en adyuvante completo de Freund, seguida de inyecciones ip de refuerzo de 100 μ g de péptido en adyuvante incompleto de Freund cada tres semanas. Siete a diez días después de la administración de la segunda inyección de refuerzo (3 inyecciones en total), 35 se realizó una sangría a los animales y se recogió el suero. Los animales fueron luego reforzados y sangrados cada tres semanas.

Los sueros de conejo específicos del péptido ztnf4 fueron caracterizados mediante una determinación del título por ELISA usando 1 μ g/ml de los péptidos usados para preparar el anticuerpo (ID. SEC. n°s 59 y 60) como una diana del anticuerpo. Los sueros de 2 conejos hacia el péptido huztnf4-1 (ID. SEC. n° 59) tenían título hacia su péptido específico en una dilución de 1:1E5 (1:100.000). Los sueros de 2 conejos hacia el péptido huztnf4-2 (ID. SEC. n° 60) tenían título hacia su péptido específico en una dilución de 1:5E6 y hacia proteínas recombinantes de longitud completa [ztnf4 N-terminalmente etiquetado con FLAG, preparado en baculovirus (huztnf4s- NF-Bv), y ztnf4 C-terminalmente etiquetado con FLAG, preparado en células BHK] en una dilución de 1:5E6. 40 45

Los anticuerpos policlonales específicos del péptido ztnf4 fueron purificados del suero de conejo por afinidad usando columnas de proteína-CNBr- SEPHAROSE 4B (Farmacia LKB) que fueron preparadas usando 10 mg de los péptidos específicos (ID. SEC. n°s 59 y 60) por gramo de CNBr-SEPHAROSE, seguido de diálisis 20x en PBS durante la noche. Los anticuerpos específicos de ztnf4 fueron caracterizados mediante una determinación del título por ELISA usando 1 μ g/ml del apropiado antígeno peptídico o proteína recombinante de longitud completa (huztnf4s- NF-Bv) como dianas del anticuerpo. El límite inferior de detección (LLD; del inglés, lower limit of detection) del anticuerpo de conejo anti-huztnf4-1, purificado por afinidad, con respecto a su antígeno específico (péptido huztnf4-1, ID. SEC. n° 59) es una dilución de 5 ng/ml. El LLD del anticuerpo de conejo anti-huztnf4-2, purificado por afinidad, con respecto a su antígeno específico (péptido huztnf4-2, ID. SEC. n° 60) es una dilución de 0,5 ng/ml. El LLD del anticuerpo de conejo anti-huztnf4-2 purificado por afinidad con respecto a la proteína recombinante huztnf4s- NF-Bv es una dilución de 5 ng/ml. 50 55

También se generaron anticuerpos monoclonales de ratón, y se seleccionaron en cuanto a la inhibición de la inhibición de ztnf4 soluble marcado con biotina. Ninguno de los anticuerpos monoclonales hacia TACI (248.14, 248.23, 248.24 y 246.3) bloquea la unión de ztnf4 a BCMA. El anticuerpo monoclonal 248.23 reduce la unión de 10 ng/ml de ztnf4-biotina a aproximadamente 50% cuando medio acondicionado es diluido hasta 1:243 y reduce la unión hasta aproximadamente 2x en medio no diluido. El anticuerpo monoclonal 246.3 reduce la unión de 10 ng/ml de ztnf4-biotina a aproximadamente 50% entre unas diluciones de 1:243 y 1:181 de medio acondicionado y reduce la unión 5x en medio no diluido. 60 65

El invento no está limitado salvo por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BR43x2 (ID. SEC. nº 2);
 - b) un polipéptido soluble que comprende el dominio extracelular de TACI;
 - c) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BCMA;
 - d) un polipéptido que comprende la secuencia de ID. SEC. nº 10;
 - e) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 2;
 - f) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 4;
 - g) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 6;
 - h) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 8;
 - i) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 10;
 - k) un polipéptido de ID. SEC. nº 4;
 - l) los restos de aminoácido 1-166 de la ID. SEC. nº 6;
 - m) los restos de aminoácido 8-37 de la ID. SEC. nº 8; y
 - n) los restos de aminoácido 1-48 de la ID. SEC. nº 8,
- en la fabricación de un medicamento para inhibir la actividad de ztnf4 en un mamífero.

2. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en el que dicho mamífero es un primate.

3. Uso de un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BR43x2 (ID. SEC. nº 2);
- b) un polipéptido soluble que comprende el dominio extracelular de TACI;
- c) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BCMA;
- d) un polipéptido que comprende la secuencia de ID. SEC. nº 10;
- e) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 2;
- f) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 4;
- g) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 6;
- h) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 8;
- i) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 10;
- j) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 18;
- k) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. nº 20;
- l) un polipéptido de ID. SEC. nº 4;
- m) los restos de aminoácido 1-166 de la ID. SEC. nº 6;
- n) los restos de aminoácido 8-37 de la ID. SEC. nº 8; y
- o) los restos de aminoácido 1-48 de la ID. SEC. nº 8,

en la fabricación de un medicamento para inhibir el acoplamiento del receptor BR43x2, TACI o BCMA-ztnf4.

ES 2 204 502 T3

4. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 1-3, en el que dicho compuesto es una proteína de fusión que consiste en una primera porción y una segunda porción unidas por un enlace peptídico, primera porción que comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende la secuencia de ID. SEC. nº 8;
 - b) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 25-58 de la ID. SEC. nº 2;
 - c) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 34-66 de la ID. SEC. nº 6;
 - d) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 71-104 de la ID. SEC. nº 6;
 - e) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 25-104 de la ID. SEC. nº 6;
 - f) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 8-37 de la ID. SEC. nº 8;
 - g) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 41-88 de la ID. SEC. nº 8; y
 - h) un polipéptido que comprende los restos de aminoácido 8-58 de la ID. SEC. nº 8;
- y segunda porción que comprende otro polipéptido.

5. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 4, en el que dicha primera porción comprende además un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:

- a) los restos de aminoácido 59-120 de la ID. SEC. nº 2;
- b) los restos de aminoácido 105-166 de la ID. SEC. nº 6; y
- c) los restos de aminoácido 89-150 de la ID. SEC. nº 8.

6. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 4, en el que dicha primera porción es seleccionada del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BR43x2 (ID. SEC. nº 2);
- b) un polipéptido soluble que comprende el dominio extracelular de TACI; y
- c) un polipéptido que comprende el dominio extracelular de BCMA;

7. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 4, en el que dicha primera porción es seleccionada del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido de ID. SEC. nº 4;
- b) los restos de aminoácido 1-154 de la ID. SEC. nº 6; y
- c) los restos de aminoácido 1-48 de la ID. SEC. nº 8.

8. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 4-7, en el que dicha segunda porción es una región constante de cadena pesada inmunoglobulínica.

9. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 8, en el que dicha región constante de cadena pesada inmunoglobulínica es una región constante de cadena pesada inmunoglobulínica humana.

10. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 9, en el que dicha región constante de cadena pesada inmunoglobulínica humana es una región constante de cadena pesada inmunoglobulínica humana de IgG1.

11. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho medicamento comprende un multímero de dichas proteínas de fusión.

12. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 11, en el que dicho medicamento comprende una región constante de cadena pesada inmunoglobulínica que contiene dos dominios de región constante y carece de la región variable.

13. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 1-12, en el que el medicamento es para el tratamiento de linfocitos B.

14. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 13, en el que los linfocitos B son linfocitos B activados.

ES 2 204 502 T3

15. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 13, en el que los citados linfocitos B son linfocitos B en reposo.

16. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 1-15, en el que el medicamento es para inhibir la producción de anticuerpos.

17. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 16, en el que dicha producción de anticuerpos está asociada con una enfermedad autoinmune.

18. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 17, en el que dicha enfermedad autoinmune es lupus sistémico eritematoso, miastenia gravis, esclerosis múltiple o artritis reumatoide.

19. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 1-18, para el tratamiento del asma, bronquitis, enfisema e insuficiencia renal de fase terminal.

20. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 19, en el que dicha enfermedad renal es glomerulonefritis, vasculitis, nefritis o pielonefritis.

21. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 1-20, para el tratamiento de neoplasias renales, mielomas múltiples, linfomas, neuropatía de cadenas ligeras o amiloidosis.

22. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 1-21, para inhibir células T efectoras.

23. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 22, para moderar la respuesta inmune.

24. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 22, en el que dicha inhibición comprende además inmunosupresión.

25. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 24, en el que dicha inmunosupresión está asociada con rechazo de injertos, enfermedad del injerto contra el huésped, enfermedad autoinmune o inflamación.

26. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 17, en el que dicha enfermedad autoinmune es diabetes mellitus dependiente de insulina o la enfermedad de Crohn.

27. Un uso de acuerdo con las Reivindicaciones 1-26, para el tratamiento de la inflamación.

28. Un uso de acuerdo con la Reivindicación 27, en el que dicha inflamación está asociada con dolor articular, hinchazón, anemia o shock séptico.

29. Una molécula polinucleotídica aislada que codifica un polipéptido de ID. SEC. n° 2.

30. Una molécula polinucleotídica aislada de ID. SEC. n° 1.

31. Un vector de expresión que comprende los siguientes elementos operativamente enlazados:

un promotor de transcripción;

una molécula polinucleotídica de acuerdo con la Reivindicación 29; y

un terminador de transcripción.

32. Una célula en cultivo en la que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 31, célula en cultivo que expresa dicho polipéptido codificado por dicha molécula polinucleotídica.

33. Un método para producir un polipéptido, que comprende:

cultivar una célula en la que se ha introducido un vector de expresión de acuerdo con la Reivindicación 31, mediante lo cual dicha célula expresa dicho polipéptido codificado por dicha molécula polinucleotídica; y

recuperar dicho polipéptido expresado.

34. Un polipéptido aislado que tiene la secuencia de ID. SEC. n° 2.

35. Un polipéptido de acuerdo con la Reivindicación 34, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

36. Una composición farmacéutica que comprende:

a) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. n° 2;

ES 2 204 502 T3

- b) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. n° 4;
- c) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. n° 6;
- 5 d) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. n° 8; o
- e) un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de ID. SEC. n° 10;

y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 37. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 36, en la que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en:

- 15 a) anticuerpo policlonal;
- b) anticuerpo monoclonal murino;
- c) anticuerpo humanizado procedente de b); y
- 20 d) anticuerpo monoclonal humano.

38. Una composición de acuerdo con las Reivindicaciones 36 y 37, en la que dicho fragmento de anticuerpo es seleccionado del grupo que consiste en F(ab'), Fab, Fv y scFv.

25
30
35
40
45
50
55
60

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.

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

TacI	-----	-----	-----	-----	MSG LGRSRRG
BR43X1	-----	-----	-----	-----	----GRSRRG
BR43X2	-----	-----	-----	-----	MSG LGRSRRG
BCMA	-----	-----	-----	-----	-----

TacI	GRSRVDQEER	FPQGLWTGVA	MRSCPEEQYW	DPLL-GTCMS	CKTICNHQSQ
BR43X1	GRSRVDQEER	FPQGLWTGVA	MRSCPEEQYW	DPLL-GTCMS	CKTICNHQSQ
BR43X2	GRSRVDQEER	-----	-----	-----	-----
BCMA	-----	-----MLQM	AGQCSQNEYF	DSLL-HACIP	CQLRCSSNTP

<--- 1ª repetición de cys -----

TacI	-RTCAAFCRS	L-----SC	RKEQGKFYDH	LL-RD-CISC	ASICGQHPKQ
BR43X1	-RTCAAFCRS	L-----SC	RKEQGKFYDH	LL-RD-CISC	ASICGQHPKQ
BR43X2	-----WS	L-----SC	RKEQGKFYDH	LL-RD-CISC	ASICGQHPKQ
BCMA	PLTCQRYCNA	SVTNSVKGTN	AILWTCLGLS	LIISLAVFVL	MFLLRKISSE

-----> <----- 2ª repetición de cys -----

TacI	CAYFCENKLR	SPVNLPELR	RQRSGEVENN	SDNSGRYQGL	EHRGSEASPA
BR43X1	CAYFCENKLR	SPVNLPELR	RQRSGEVENN	SDNSGRYQGL	EHRGSEASPA
BR43X2	CAYFCENKLR	SPVNLPELR	RQRSGEVENN	SDNSGRYQGL	EHRGSEASPA
BCMA	PLKDEFKNTG	SGLLGMANID	LEKSRTGDEI	ILPRGLEYTV	EECTCEDCIK

----->

TacI	LPGLKLSADQ	VALVYSTLGL	CLCAVLCCFL	VAVACFLKKR	GDP CSCQPRS
BR43X1	LPGLKLSADQ	VALVYSTLGL	CLCAVLCCFL	VAVACFLKKR	GDP CSCQPRS
BR43X2	LPGLKLSADQ	VALVYSTLGL	CLCAVLCCFL	VAVACFLKKR	GDP CSCQPRS
BCMA	SKPKVDSHC	FPLPAMEEGA	TILVTTKTND	YCKSLPAALS	ATEIEKSISA

<--TM de TACI/BR43----->

TacI	RPRQSPAKSS	QDHAMEAGSP	VSTSPEPVET	CSFCFPECRA	PTQESAVTPG
BR43X1	RPRQSPAKSS	QDHAMEAGSP	VSTSPEPVET	CSFCFPECRA	PTQESAVTPG
BR43X2	RPRQSPAKSS	QDHAMEAGSP	VSTSPEPVET	CSFCFPECRA	PTQESAVTPG
BCMA	R-----	-----	-----	-----	-----

TacI	TPDPTCAGRW	GCHTRTTVLQ	PCPHIPDSGL	GIVCVPAQEG	GPGA-----
BR43X1	TPDPTCAGRW	GCHTRTTVLQ	PCPHIPDSGL	GIVCVPAQEG	GPGA-----
BR43X2	TPDPTCAGRW	GCHTRTTVLQ	PCPHIPDSGL	GIVCVPAQEG	GPGA-----
BCMA	-----	-----	-----	-----	-----

FIGURA 1

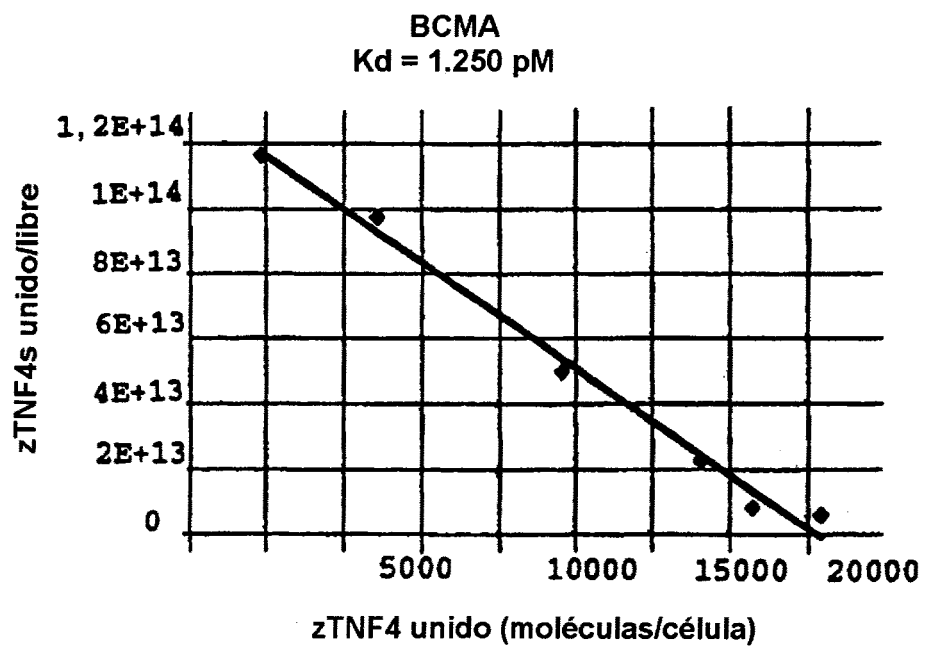
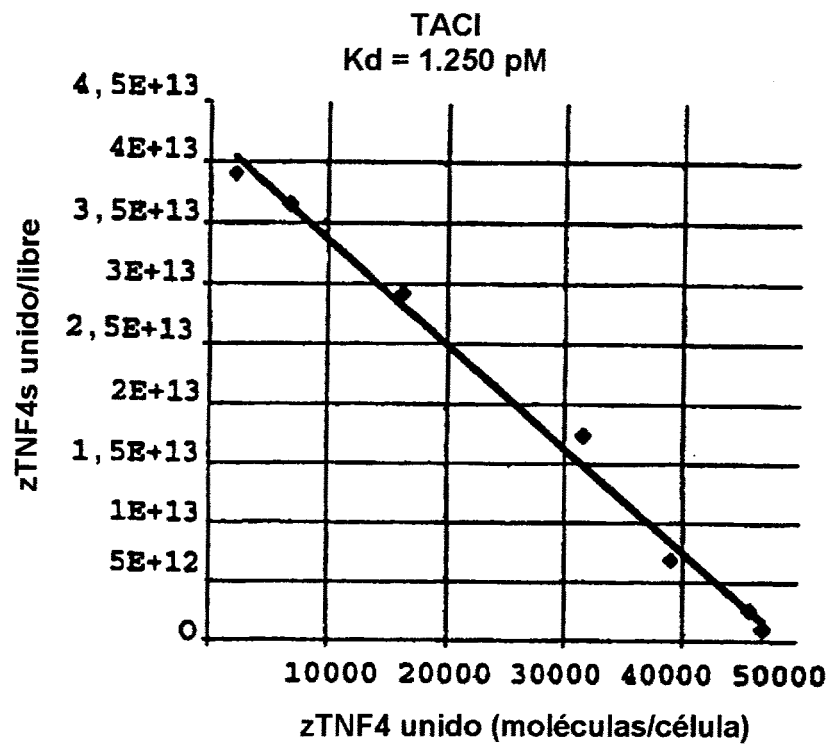


FIGURA 2

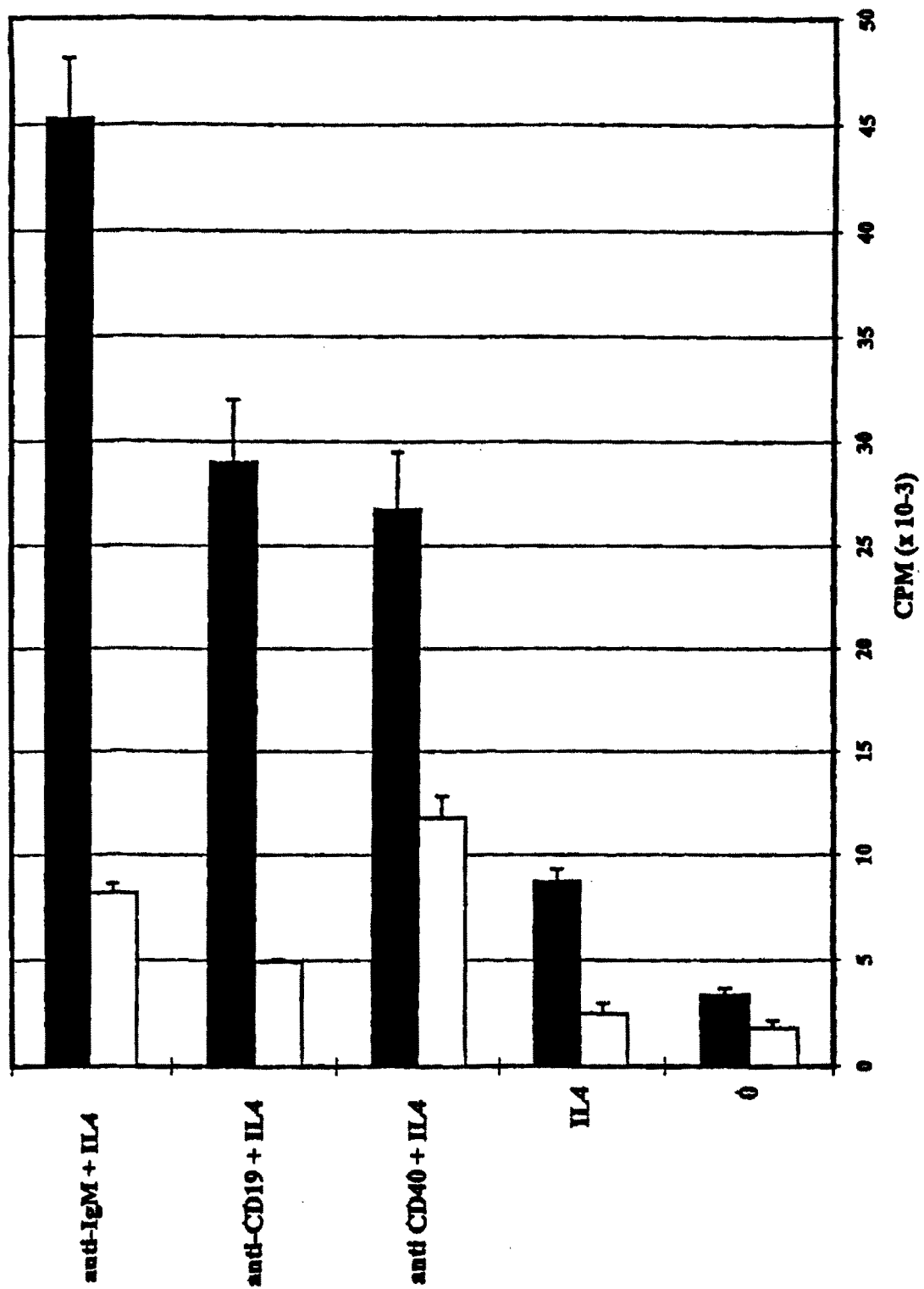


FIGURA 3A

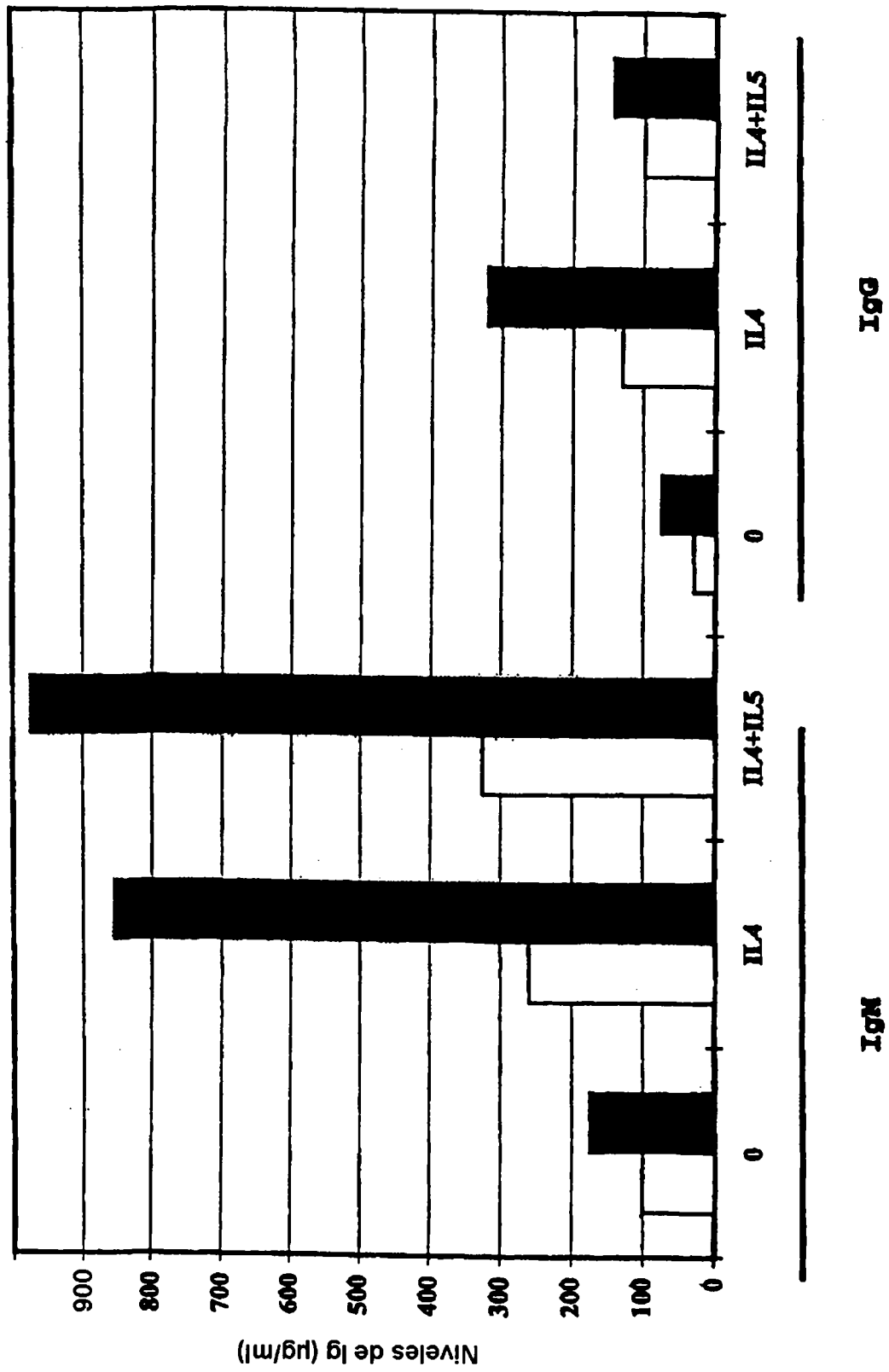


FIGURA 3B

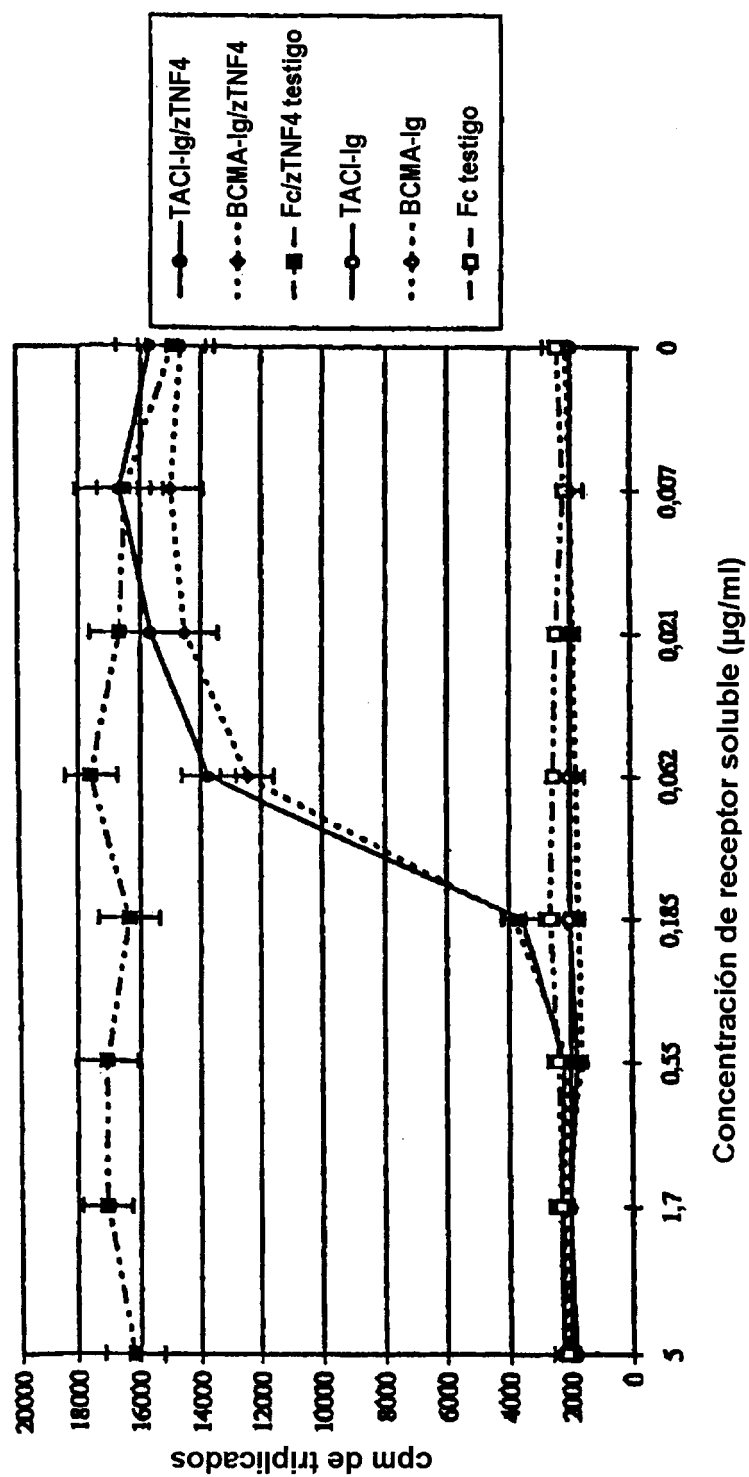


FIGURA 4

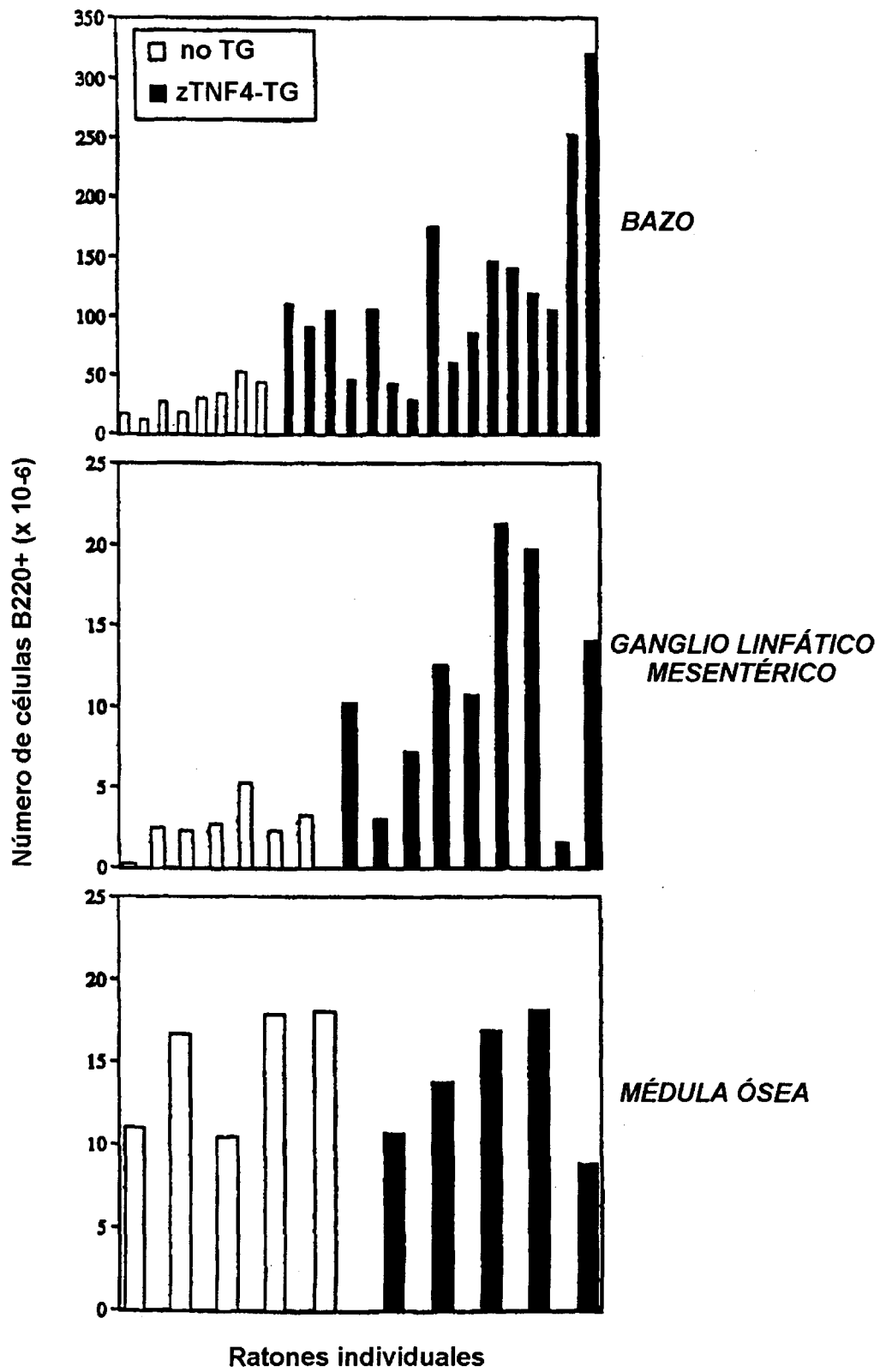


FIGURA 5A

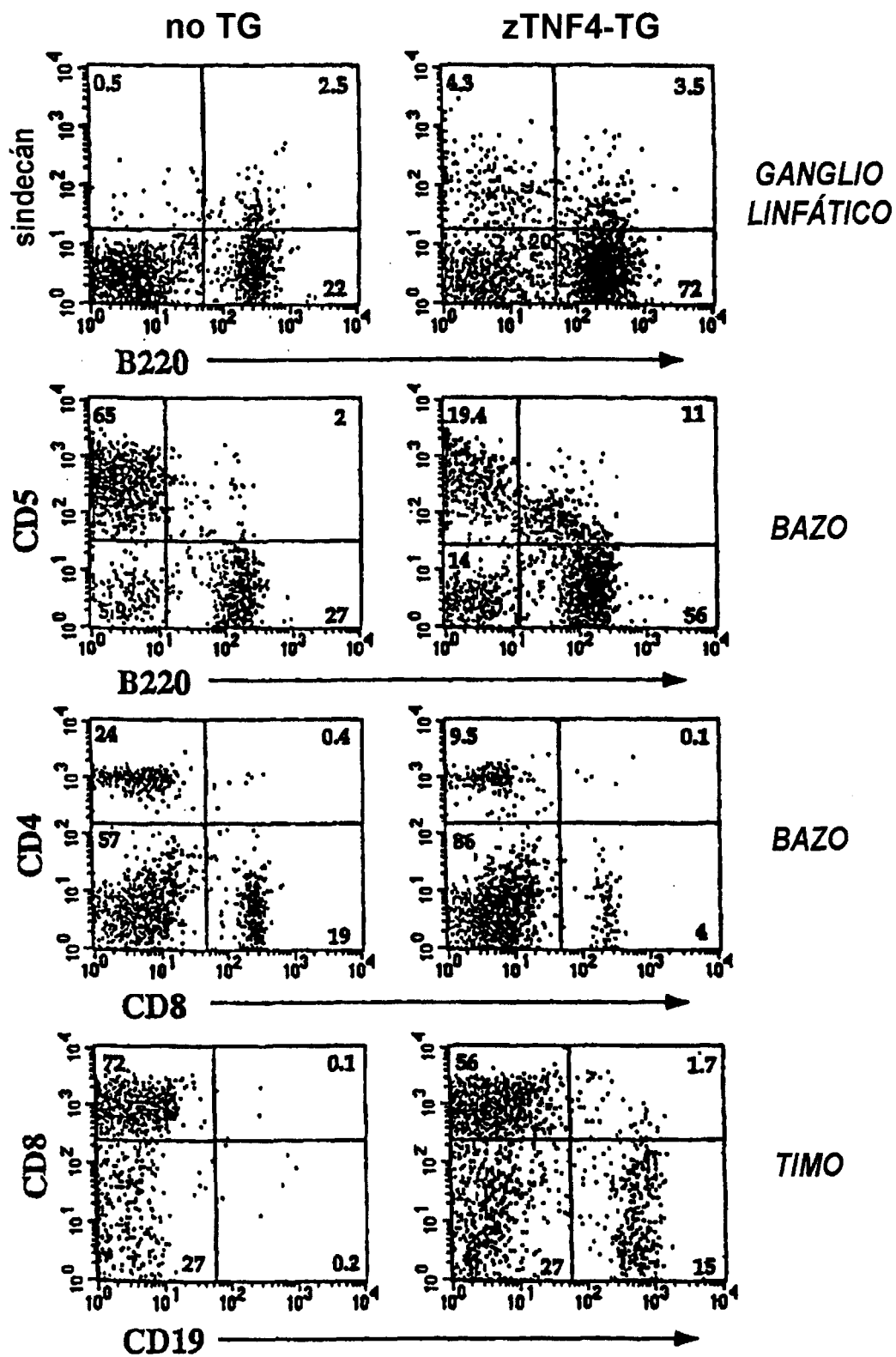


FIGURA 5B

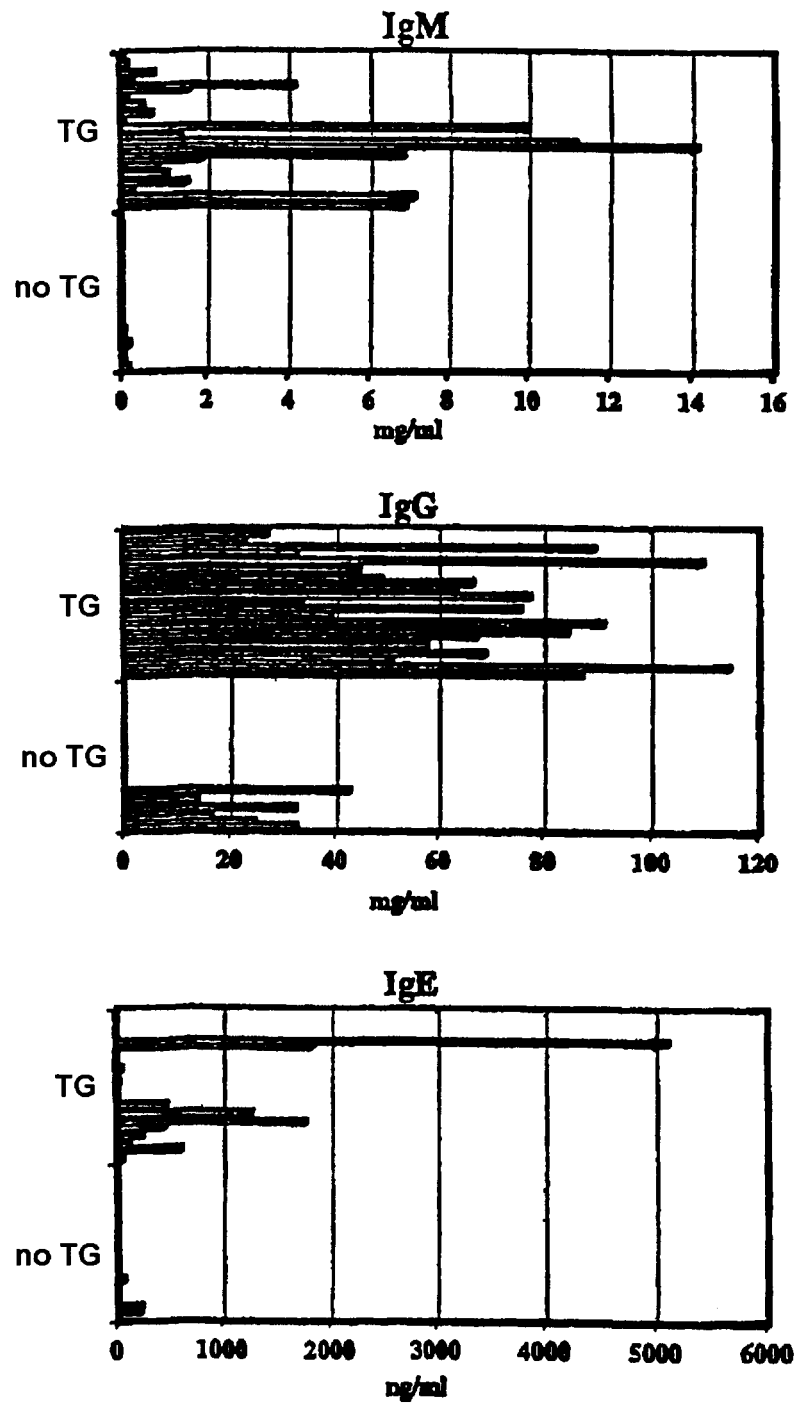


FIGURA 5C

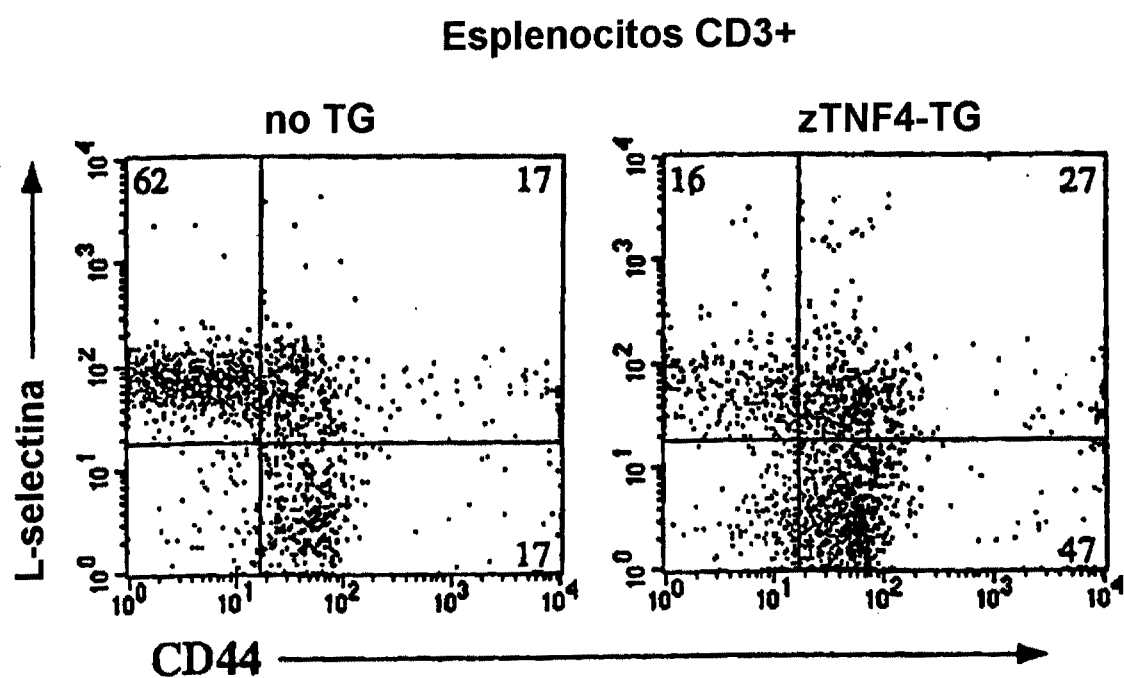


FIGURA 5E

NZBWF1

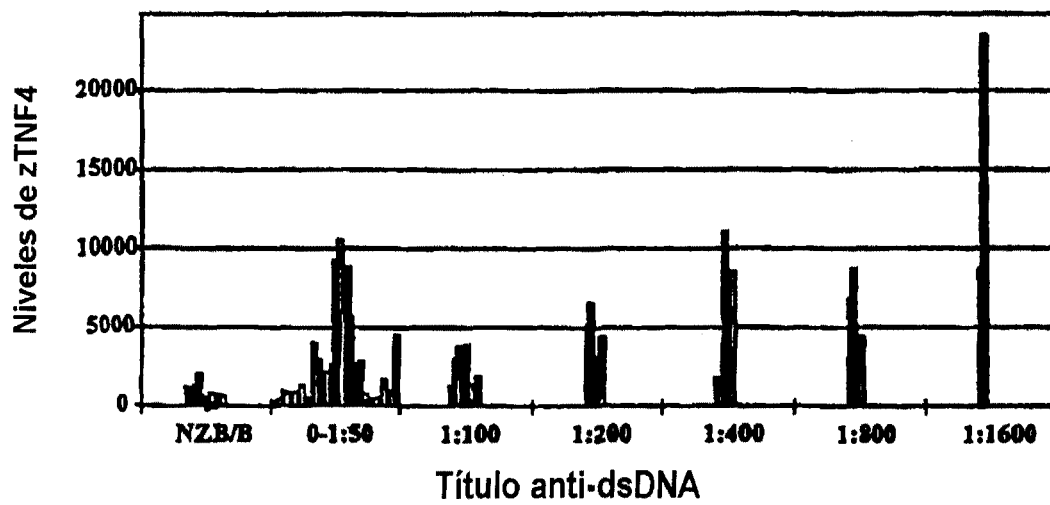
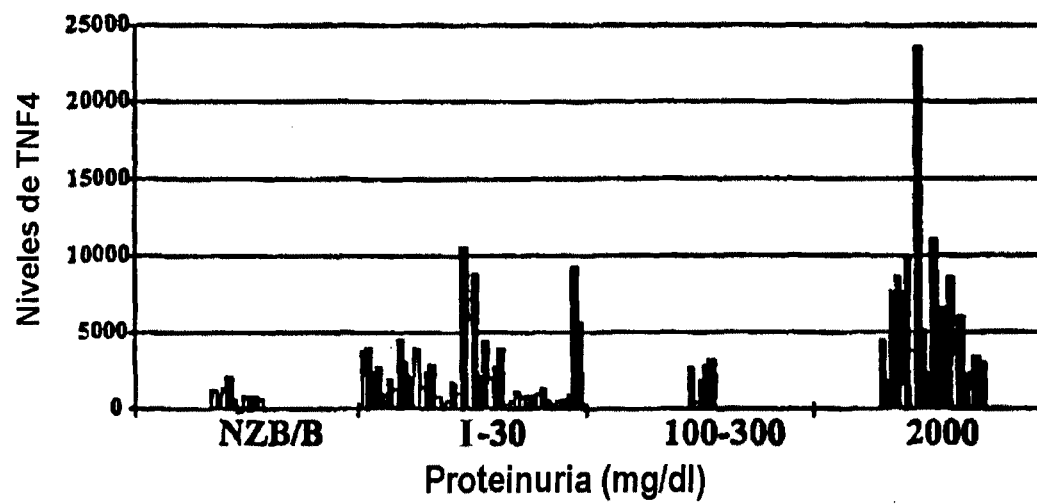
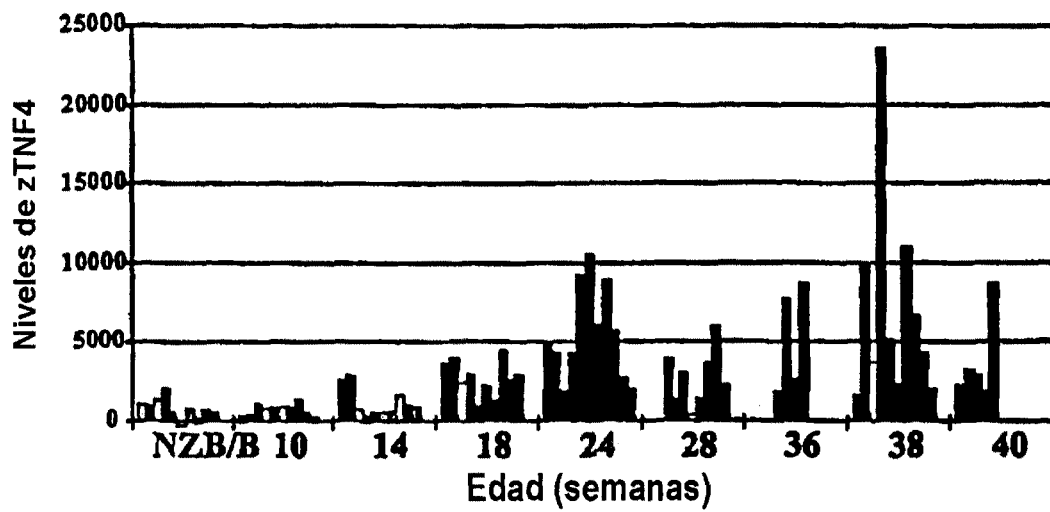


FIGURA 6A

MRL-lpr/lpr

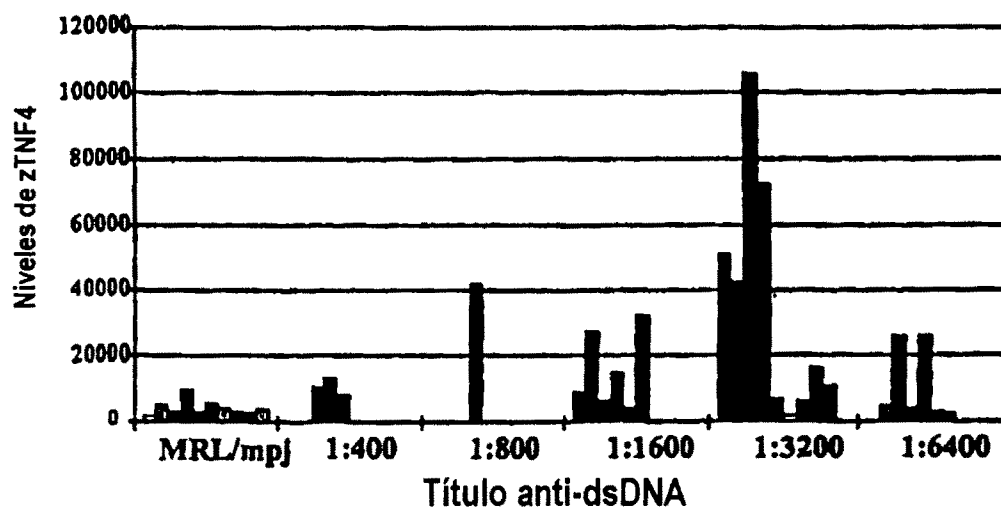
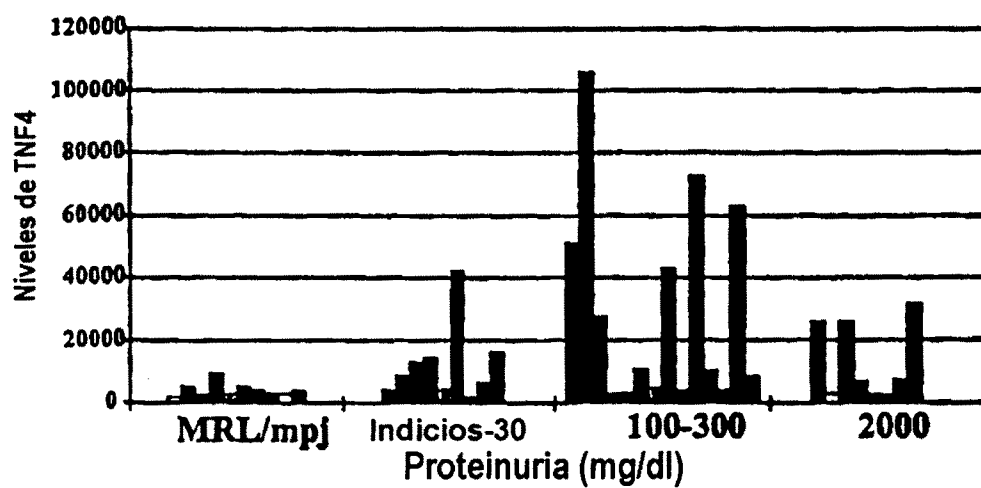
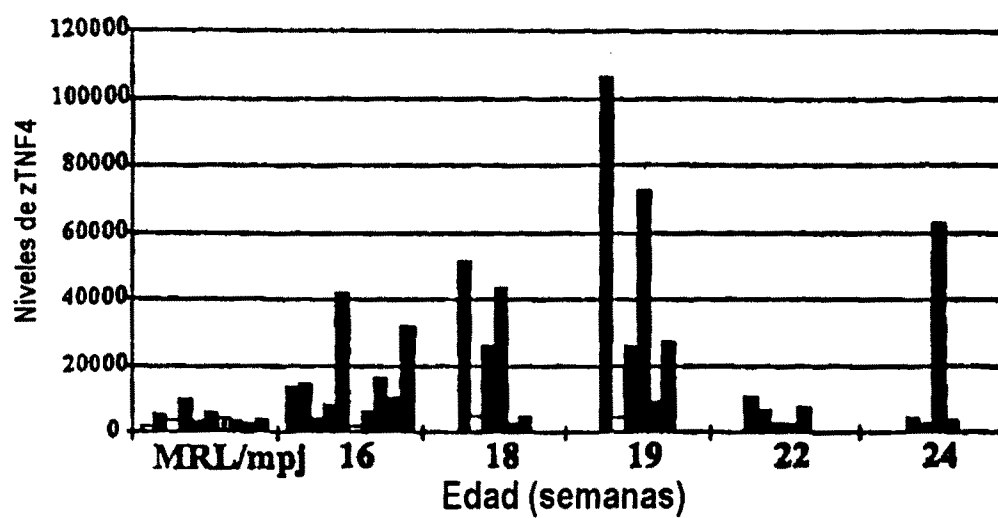


FIGURA 6B

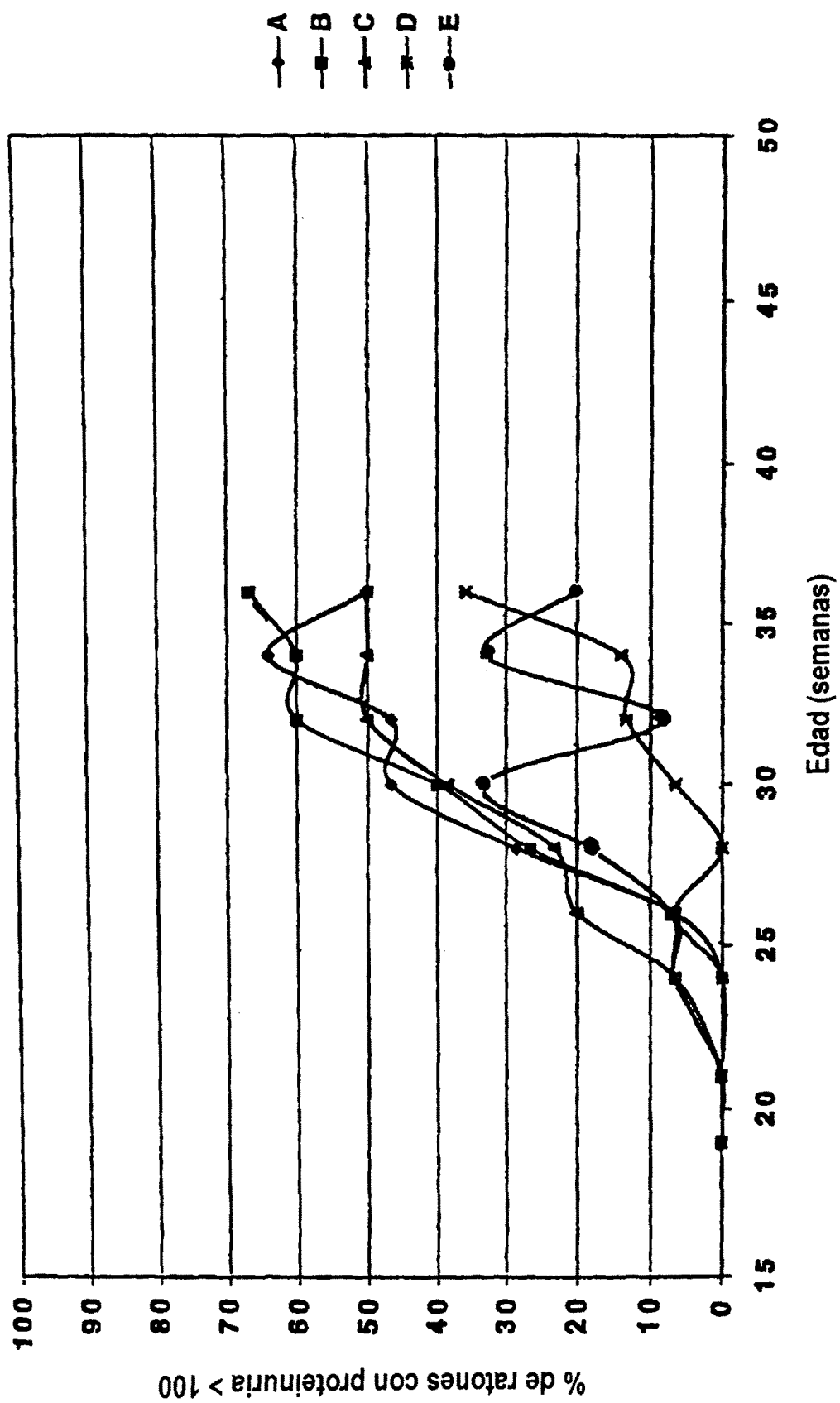


FIGURA 7

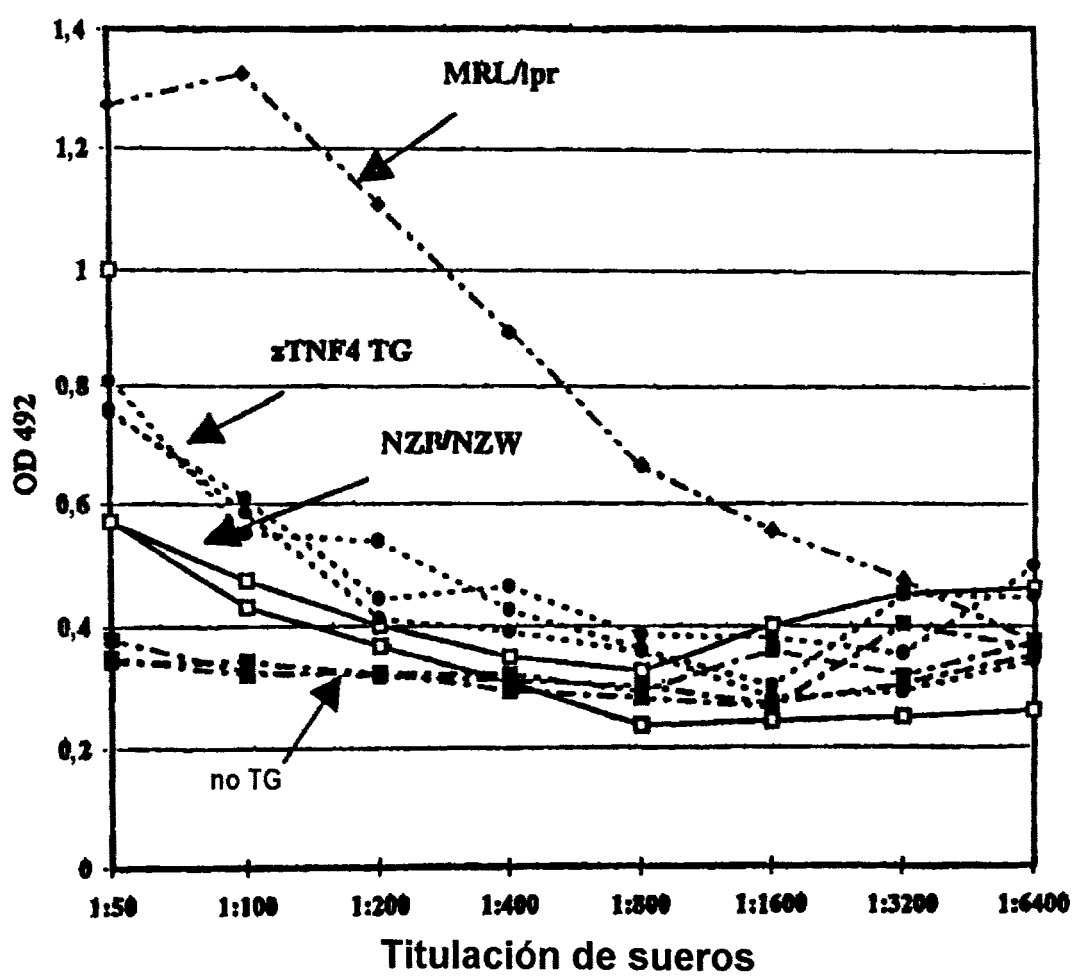


FIGURA 8

ES 2 204 502 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> ZymoGenetics, Inc.	
	<120> RECEPTOR SOLUBLE BR43X2 Y MÉTODOS DE USO	
10	<130> 98-75	
	<150> 09/226.533	
	<151> 1.999-01-07	
15	<160> 60	
	<170> FastSEQ para Windows, versión 3.0	
20	<210> 1	
	<211> 1.192	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
25	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (6)...(746)	
30	<400> 1	
	gagta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg agc cgt gtg	50
35	Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val	
	1 5 10 15	
	gac cag gag gag cgc tgg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc aag	98
40	Asp Gln Glu Glu Arg Trp Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys	
	20 25 30	
	ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc tgt	146
45	Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys	
	35 40 45	
	gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc agg	194
50	Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg	
	50 55 60	
	agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga gaa	242
55	Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu	
	65 70 75	
60		
65		

ES 2 204 502 T3

5	ggt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag cac Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His 80 85 90 95	290
10	aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt gca Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala 100 105 110	338
15	gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt gcc Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala 115 120 125	386
20	gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag agg Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg 130 135 140	434
25	ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt ccg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro 145 150 155	482
30	gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg agc Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser 160 165 170 175	530
35	aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag tgc Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys 180 185 190	578
40	agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac ccc Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro 195 200 205	626
45	act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg cag Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln 210 215 220	674
50	cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg cct Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro 225 230 235	722
55	gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taaatggggg tcaggaggagg aaaggaggag Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala 240 245	776

ES 2 204 502 T3

```

ggagagagat ggagaggagg ggagagagaa agagaggtgg ggagagggga gagagatatg 836
aggagagaga gaCagaggag gcagagaggg agagaaacag aggagacaga gagggagaga 896
gagacagagg gagagagaga cagaggggaa gagaggcaga gagggaaaga ggcagagaag 956
5 gaaagaggca gagagggaga gaggcagaga gggagagagg cagagagaca gagagggaga 1016
gagggacaga gagagataga gcaggaggtc ggggcactct gagtcccagt tcccagtga 1076
gctgtaggtc gtcacacct aaccacacgt gcaataaagt cctcgtgcct gctgctcaca 1136
10 gccccgaga gccctcctc ctggagaata aaacctttgg cagctgcctt tcctca 1192

```

<210> 2

<211> 247

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

```

245

<210> 3

65 <211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

ES 2 204 502 T3

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(360)

5

<400> 3

10	atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg agc cgt gtg gac	48
	Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp	
	1 5 10 15	
15	cag gag gag cgc tgg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc aag ttc	96
	Gln Glu Glu Arg Trp Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe	
	20 25 30	
20	tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc tgt gga	144
	Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly	
	35 40 45	
25	cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc agg agc	192
	Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser	
	50 55 60	
30	cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga gaa gtt	240
	Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val	
	65 70 75 80	
35	gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag cac aga	288
	Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg	
	85 90 95	
40	ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt gca gat	336
	Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp	
	100 105 110	
45	cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg	360
	Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr	
	115 120	

50 <210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<400> 4

60

65

ES 2 204 502 T3

5 Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp
 1 5 10 15
 Gln Glu Glu Arg Trp Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe
 20 25 30
 Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly
 35 40 45
 10 Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser
 50 55 60
 Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val
 65 70 75 80
 15 Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg
 85 90 95
 Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp
 100 105 110
 20 Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr
 115 120

<210> 5
 25 <211> 1.377
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> CDS
 <222> (14)...(895)

35 <400> 5

agcatcctga gta atg agt ggc ctg ggc cgg agc agg cga ggt ggc cgg 49
 Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg
 1 5 10
 40 agc cgt gtg gac cag gag gag cgc ttt cca cag ggc ctg tgg acg ggg 97
 Ser Arg Val Asp Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly
 15 20 25
 gtg gct atg aga tcc tgc ccc gaa gag cag tac tgg gat cct ctg ctg 145
 Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu
 30 35 40

55

60

65

ES 2 204 502 T3

5	ggt acc tgc atg tcc tgc aaa acc att tgc aac cat cag agc cag cgc Gly Thr Cys Met Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg 45 50 55 60	193
10	acc tgt gca gcc ttc tgc agg tca ctc agc tgc cgc aag gag caa ggc Thr Cys Ala Ala Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly 65 70 75	241
15	aag ttc tat gac cat ctc ctg agg gac tgc atc agc tgt gcc tcc atc Lys Phe Tyr Asp His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile 80 85 90	289
20	tgt gga cag cac cct aag caa tgt gca tac ttc tgt gag aac aag ctc Cys Gly Gln His Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu 95 100 105	337
25	agg agc cca gtg aac ctt cca cca gag ctc agg aga cag cgg agt gga Arg Ser Pro Val Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly 110 115 120	385
30	gaa gtt gaa aac aat tca gac aac tcg gga agg tac caa gga ttg gag Glu Val Glu Asn Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu 125 130 135 140	433
35	cac aga ggc tca gaa gca agt cca gct ctc ccg ggg ctg aag ctg agt His Arg Gly Ser Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser 145 150 155	481
40	gca gat cag gtg gcc ctg gtc tac agc acg ctg ggg ctc tgc ctg tgt Ala Asp Gln Val Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys 160 165 170	529
45	gcc gtc ctc tgc tgc ttc ctg gtg gcg gtg gcc tgc ttc ctc aag aag Ala Val Leu Cys Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys 175 180 185	577
50	agg ggg gat ccc tgc tcc tgc cag ccc cgc tca agg ccc cgt caa agt Arg Gly Asp Pro Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser 190 195 200	625
55	ccg gcc aag tct tcc cag gat cac gcg atg gaa gcc ggc agc cct gtg Pro Ala Lys Ser Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val 205 210 215 220	673

ES 2 204 502 T3

5	agc aca tcc ccc gag cca gtg gag acc tgc agc ttc tgc ttc cct gag Ser Thr Ser Pro Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu 225 230 235	721
10	tgc agg gcg ccc acg cag gag agc gca gtc acg cct ggg acc ccc gac Cys Arg Ala Pro Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp 240 245 250	769
15	ccc act tgt gct gga agg tgg ggg tgc cac acc agg acc aca gtc ctg Pro Thr Cys Ala Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu 255 260 265	817
20	cag cct tgc cca cac atc cca gac agt ggc ctt ggc att gtg tgt gtg Gln Pro Cys Pro His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val 270 275 280	865
25	cct gcc cag gag ggg ggc cca ggt gca taa atgggggtca gggagggaaa Pro Ala Gln Glu Gly Gly Pro Gly Ala * 285 290	915
30	ggaggagggga gagagatgga gaggagggga gagagaaaga gaggtgggga gaggggagag agatatgagg agagagagac agaggaggca gaaagggaga gaaacagagg agacagagag ggagagagag acagagggag agagagacag aggggaagag aggcagagag ggaaagaggc agagaaggaa agagacaggc agagaaggag agaggcagag agggagagag gcagagaggg agagaggcag agagacagag agggagagag ggacagagag agatagagca ggaggtcggg gcactctgag tcccagttcc cagtgcagct gtaggtcgtc atcacctaac cacacgtgca ataaagtcct cgtgcctgct gctcacagcc cccgagagcc cctcctcctg gagaataaaa cctttggcag ctgcccttcc tcaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	975 1035 1095 1155 1215 1275 1335 1377
40	<210> 6 <211> 293 <212> PRT <213> Homo sapiens	
45	<400> 6	
50	Met Ser Gly Leu Gly Arg Ser Arg Arg Gly Gly Arg Ser Arg Val Asp 1 5 10 15 Gln Glu Glu Arg Phe Pro Gln Gly Leu Trp Thr Gly Val Ala Met Arg 20 25 30 Ser Cys Pro Glu Glu Gln Tyr Trp Asp Pro Leu Leu Gly Thr Cys Met 35 40 45 Ser Cys Lys Thr Ile Cys Asn His Gln Ser Gln Arg Thr Cys Ala Ala 50 55 60 Phe Cys Arg Ser Leu Ser Cys Arg Lys Glu Gln Gly Lys Phe Tyr Asp 65 70 75 80	

ES 2 204 502 T3

5 His Leu Leu Arg Asp Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ile Cys Gly Gln His
 85 90 95
 Pro Lys Gln Cys Ala Tyr Phe Cys Glu Asn Lys Leu Arg Ser Pro Val
 100 105 110
 Asn Leu Pro Pro Glu Leu Arg Arg Gln Arg Ser Gly Glu Val Glu Asn
 115 120 125
 10 Asn Ser Asp Asn Ser Gly Arg Tyr Gln Gly Leu Glu His Arg Gly Ser
 130 135 140
 Glu Ala Ser Pro Ala Leu Pro Gly Leu Lys Leu Ser Ala Asp Gln Val
 145 150 155 160
 15 Ala Leu Val Tyr Ser Thr Leu Gly Leu Cys Leu Cys Ala Val Leu Cys
 165 170 175
 Cys Phe Leu Val Ala Val Ala Cys Phe Leu Lys Lys Arg Gly Asp Pro
 180 185 190
 20 Cys Ser Cys Gln Pro Arg Ser Arg Pro Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser
 195 200 205
 Ser Gln Asp His Ala Met Glu Ala Gly Ser Pro Val Ser Thr Ser Pro
 210 215 220
 25 Glu Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys Phe Pro Glu Cys Arg Ala Pro
 225 230 235 240
 Thr Gln Glu Ser Ala Val Thr Pro Gly Thr Pro Asp Pro Thr Cys Ala
 245 250 255
 30 Gly Arg Trp Gly Cys His Thr Arg Thr Thr Val Leu Gln Pro Cys Pro
 260 265 270
 His Ile Pro Asp Ser Gly Leu Gly Ile Val Cys Val Pro Ala Gln Glu
 275 280 285
 35 Gly Gly Pro Gly Ala
 290

40 <210> 7
 <211> 995
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

45 <220>
 <221> CDS
 <222> (219)...(773)

50 <400> 7

aagactcaaa cttagaaact tgaattagat gtggtattca aatccttacg tgccgcgaag 60
 acacagacag cccccgtaag aaccacgaa gcaggcgaag ttcattgttc tcaacattct 120
 55 agctgctctt gctgcatttg ctctggaatt cttgtagaga tattacttgt ccttccaggc 180
 tgttctttct gtagctccct tgttttcttt ttgtgatc atg ttg cag atg gct ggg 236
 Met Leu Gln Met Ala Gly
 1 5

60

65

ES 2 204 502 T3

5	cag tgc tcc caa aat gaa tat ttt gac agt ttg ttg cat gct tgc ata Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp Ser Leu Leu His Ala Cys Ile 10 15 20	284
10	cct tgt caa ctt cga tgt tct tct aat act cct cct cta aca tgt cag Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln 25 30 35	332
15	cgt tat tgt aat gca agt gtg acc aat tca gtg aaa gga acg aat gcg Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala 40 45 50	380
20	att ctc tgg acc tgt ttg gga ctg agc tta ata att tct ttg gca gtt Ile Leu Trp Thr Cys Leu Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val 55 60 65 70	428
25	ttc gtg cta atg ttt ttg cta agg aag ata agc tct gaa cca tta aag Phe Val Leu Met Phe Leu Leu Arg Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys 75 80 85	476
30	gac gag ttt aaa aac aca gga tca ggt ctc ctg ggc atg gct aac att Asp Glu Phe Lys Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile 90 95 100	524
35	gac ctg gaa aag agc agg act ggt gat gaa att att ctt ccg aga ggc Asp Leu Glu Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly 105 110 115	572
40	ctc gag tac acg gtg gaa gaa tgc acc tgt gaa gac tgc atc aag agc Leu Glu Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser 120 125 130	620
45	aaa ccg aag gtc gac tct gac cat tgc ttt cca ctc cca gct atg gag Lys Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu 135 140 145 150	668
50	gaa ggc gca acc att ctt gtc acc acg aaa acg aat gac tat tgc aag Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys Lys 155 160 165	716
55	agc ctg cca gct gct ttg agt gct acg gag ata gag aaa tca att tct Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu Ile Glu Lys Ser Ile Ser 170 175 180	764

ES 2 204 502 T3

gct agg taa ttaaccattt cgactcgagc agtgccactt taaaaatctt 813
Ala Arg *

5

ttgtcagaat	agatgatgtg	tcagatctct	ttaggatgac	tgtatttttc	agttgccgat	873
acagcttttt	gtcctctaac	tgtggaaact	ctttatgtta	gatatatattc	tctagggttac	933
tgttggggagc	ttaatggtag	aaacttcctt	ggtttcatga	ttaaagtctt	tttttttctt	993
ga						995

<210> 8

<211> 184

15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

20

Met 1	Leu	Gln	Met	Ala 5	Gly	Gln	Cys	Ser	Gln 10	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asp 15	Ser
Leu	Leu	His	Ala 20	Cys	Ile	Pro	Cys	Gln 25	Leu	Arg	Cys	Ser	Ser	Asn 30	Thr
Pro	Pro	Leu 35	Thr	Cys	Gln	Arg	Tyr 40	Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Thr	Asn	Ser
Val	Lys 50	Gly	Thr	Asn	Ala	Ile 55	Leu	Trp	Thr	Cys	Leu 60	Gly	Leu	Ser	Leu
Ile 65	Ile	Ser	Leu	Ala	Val 70	Phe	Val	Leu	Met	Phe 75	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile 80
Ser	Ser	Glu	Pro	Leu 85	Lys	Asp	Glu	Phe	Lys 90	Asn	Thr	Gly	Ser	Gly 95	Leu
Leu	Gly	Met	Ala 100	Asn	Ile	Asp	Leu	Glu 105	Lys	Ser	Arg	Thr	Gly	Asp 110	Glu
Ile	Ile	Leu 115	Pro	Arg	Gly	Leu	Glu 120	Tyr	Thr	Val	Glu	Glu	Cys	Thr	Cys
Glu 130	Asp	Cys	Ile	Lys	Ser	Lys 135	Pro	Lys	Val	Asp	Ser	Asp	His	Cys	Phe
Pro 145	Leu	Pro	Ala	Met	Glu	Glu 150	Gly	Ala	Thr	Ile 155	Leu	Val	Thr	Thr	Lys 160
Thr	Asn	Asp	Tyr	Cys 165	Lys	Ser	Leu	Pro	Ala 170	Ala	Leu	Ser	Ala	Thr	Glu
Ile	Glu	Lys	Ser 180	Ile	Ser	Ala	Arg								

<210> 9

55

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

60

<400> 9

65

ES 2 204 502 T3

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

45 <210> 10

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Motivo que describe el dominio de seudorrepeticiones ricas en cisteína

55 <221> VARIANTE

<222> (1)...(2)

<223> Cada Xaa es independientemente cualquier resto de aminoácido salvo cisteína, o está ausente.

60 <221> VARIANTE

<222> (4)...(4)

<223> Xaa es cualquier resto de aminoácido salvo cisteína.

65 <221> VARIANTE

<222> (5)...(5)

<223> Xaa es glutamina, ácido glutámico o lisina.

ES 2 204 502 T3

<221> VARIANTE

<222> (6)...(6)

<223> Xaa es glutamina, ácido glutámico, lisina, asparagina, arginina, ácido aspártico, histidina o serina.

5

<221> VARIANTE

<222> (7)...(7)

<223> Xaa es glutamina o ácido glutámico.

10

<221> VARIANTE

<222> (8)...(9)

<223> Cada Xaa es independientemente cualquier resto de aminoácido salvo cisteína, o está ausente.

15

<221> VARIANTE

<222> (10)...(11)

<223> Xaa es tirosina, fenilalanina o triptófano.

20

<221> VARIANTE

<222> (13)...(13)

<223> Xaa es cualquier resto de aminoácido salvo cisteína.

25

<221> VARIANTE

<222> (16)...(17)

<223> Cada Xaa es independientemente cualquier resto de aminoácido salvo cisteína.

30

<221> VARIANTE

<222> (19)...(19)

<223> Xaa es isoleucina, metionina, leucina o valina.

35

<221> VARIANTE

<222> (20)...(20)

<223> Xaa es cualquier resto de aminoácido salvo cisteína.

40

<221> VARIANTE

<222> (22)...(24)

<223> Cada Xaa es independientemente cualquier resto de aminoácido salvo cisteína.

45

<221> VARIANTE

<222> (26)...(31)

<223> Cada Xaa es independientemente cualquier resto de aminoácido salvo cisteína.

50

<221> VARIANTE

<222> (32)...(33)

<223> Cada Xaa es independientemente cualquier resto de aminoácido salvo cisteína, o está ausente.

55

<221> VARIANTE

<222> (35)...(36)

<223> Cada Xaa es independientemente cualquier resto de aminoácido salvo cisteína.

60

<221> VARIANTE

<222> (37)...(37)

<223> Xaa es tirosina o fenilalanina.

65

ES 2 204 502 T3

<221> VARIANTE

<222> (39)...(40)

<223> Cada Xaa es independientemente cualquier resto de aminoácido salvo cisteína, o está ausente.

5

<400> 10

	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Asp	Xaa	Leu	Leu	Xaa
	1			5				10					15		
10	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
			20					25					30		
	Xaa	Cys	Xaa	Xaa	Xaa	Cys	Xaa	Xaa							
15			35				40								

<210> 11

<211> 360

<212> DNA

20 <213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia oligonucleotídica degenerada que codifica el polipéptido de ID. SEC. nº 4.

<221> Variación

<222> (1)...(360)

<223> Cada N es independientemente A, T, G o C.

30

<400> 11

	atgwsnggny	tnggnmgnws	nmgnmgnggn	ggnmgnwsnm	gngtngayca	rgargarmgn	60
35	tggswnytrw	sntgymgnaa	rgarcarggn	aarttytayg	aycayytnyt	nmngaytgy	120
	athwsntgyg	cnwsnathtg	yggncarcay	ccnaarcart	gygcntaytt	ytgygaraay	180
	aarytnmgnw	sncngtnaa	yytnccnccn	garytnmgnm	gncarmgnws	ngngargtn	240
	garaayaayw	sngayaayws	nggnmgntay	carggnytn	arcaymgngg	nwsngargcn	300
40	wsnccngcny	tnccnggny	naarytnwsn	gcngaycarg	tngcnytngt	ntaywsnacn	360

<210> 12

<211> 741

45 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Secuencia oligonucleotídica degenerada que codifica un polipéptido de ID. SEC. nº 2.

<221> Variación

<222> (1)...(741)

55 <223> Cada N es independientemente A, T, G o C.

<400> 12

60

65

ES 2 204 502 T3

	atgwsnggny tnggnmgnws nmgnmgnggn ggnmgnwsnm gngtngayca rgargarmgn	60
	tggwsnytrw sntgymgnaa rgarcarggn aarttytayg aycayytnyt nmngaytgy	120
	athwsntgyg cnwsnathtg yggncarcay ccnaarcart gygcntaytt ytgygaraay	180
5	aarytnmgnw snccngtnaa yytnccnccn garytnmgnm gncarmgnws ngngargtn	240
	garaayaayw sngayaayws nggnmgntay carggnytn g arcaymgngg nwsngargcn	300
	wsnccngcny tnccnggnyt naarytnwsn gcngaycarg tngcnytngt ntaywsnacn	360
10	ytnggnytn gyytnngygc ngtnytnngy tgyttytn g tngcngtngc ntgyttytn	420
	aaraarmng gngayccntg ywsntgyca ccmgnwsnm gncnmgnc rwsnccngcn	480
	aarwsnwsnc argaycaygc natggargcn ggnwsnccng trwsnacnws nccngarccn	540
	gtngaracnt gywsnttytg yttyccngar tgymgngcnc cnacncarga rwsngcngtn	600
15	acnccnggna cncngaycc nacntgygc ggnmgntgg gntgycayac nmgnacnacn	660
	gtnytnarc cntgyccnca yathccngay wsnggnytn gnathtntg ygtncngcn	720
	cargargng gncngngc n	741

20 <210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Etiqueta FLAG.

30 <400> 13
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys
 1 5

35 <210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Etiqueta Glu-Glu.

45 <400> 14
 Glu Glu Tyr Met Pro Met Glu
 1 5

50 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido ZC19980.

60 <400> 15
 cgaagagcag tactgggatc ctct

65 <210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

ES 2 204 502 T3

<220>

<223> Oligonucleótido ZC19981.

5 <400> 16

gccaaaggcca ctgtctggga tgt

23

<210> 17

10 <211> 1.149

<212> DNA

<213> Homo sapiens

15 <220>

<221> CDS

<222> (236)...(1.027)

20 <400> 17

gaattcggca	cgaggcagaa	aggagaaaat	tcaggataac	tctcctgagg	ggtgagccaa	60
gccctgccat	gtagtgcacg	caggacatca	acaaacacag	ataacaggaa	atgatccatt	120
ccctgtggtc	acttattcta	aaggcccaaa	ccttcaaagt	tcaagtagtg	atatggatga	180
ctccacagaa	agggagcagt	cacgccttac	ttcttgcctt	aagaaaagag	aagaa atg	238
					Met	
					1	

aaa	ctg	aag	gag	tgt	gtt	tcc	atc	ctc	cca	cgg	aag	gaa	agc	ccc	tct	286
Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Val	Ser	Ile	Leu	Pro	Arg	Lys	Glu	Ser	Pro	Ser	
		5						10				15				

gtc	cga	tcc	tcc	aaa	gac	gga	aag	ctg	ctg	gct	gca	acc	ttg	ctg	ctg	334
Val	Arg	Ser	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	
		20					25					30				

gca	ctg	ctg	tct	tgc	tgc	ctc	acg	gtg	gtg	tct	ttc	tac	cag	gtg	gcc	382
Ala	Leu	Leu	Ser	Cys	Cys	Leu	Thr	Val	Val	Ser	Phe	Tyr	Gln	Val	Ala	
	35					40					45					

gcc	ctg	caa	ggg	gac	ctg	gcc	agc	ctc	cgg	gca	gag	ctg	cag	ggc	cac	430
Ala	Leu	Gln	Gly	Asp	Leu	Ala	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Gly	His	
	50				55				60					65		

cac	gcg	gag	aag	ctg	cca	gca	gga	gca	gga	gcc	ccc	aag	gcc	ggc	ctg	478
His	Ala	Glu	Lys	Leu	Pro	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro	Lys	Ala	Gly	Leu	
			70					75						80		

gag	gaa	gct	cca	gct	gtc	acc	gcg	gga	ctg	aaa	atc	ttt	gaa	cca	cca	526
Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Val	Thr	Ala	Gly	Leu	Lys	Ile	Phe	Glu	Pro	Pro	
			85					90					95			

gct	cca	gga	gaa	ggc	aac	tcc	agt	cag	aac	agc	aga	aat	aag	cgt	gcc	574
Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	Asn	Lys	Arg	Ala	
		100					105							110		

ES 2 204 502 T3

	gtt cag ggt cca gaa gaa aca gtc act caa gac tgc ttg caa ctg att	622
	Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys Leu Gln Leu Ile	
	115 120 125	
5		
	gca gac agt gaa aca cca act ata caa aaa gga tct tac aca ttt gtt	670
	Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe Val	
	130 135 140 145	
10		
	cca tgg ctt ctc agc ttt aaa agg gga agt gcc cta gaa gaa aaa gag	718
	Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu	
	150 155 160	
15		
	aat aaa ata ttg gtc aaa gaa act ggt tac ttt ttt ata tat ggt cag	766
	Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Gly Gln	
	165 170 175	
20		
	gtt tta tat act gat aag acc tac gcc atg gga cat cta att cag agg	814
	Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln Arg	
	180 185 190	
25		
	aag aag gtc cat gtc ttt ggg gat gaa ttg agt ctg gtg act ttg ttt	862
	Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu Phe	
	195 200 205	
30		
	cga tgt att caa aat atg cct gaa aca cta ccc aat aat tcc tgc tat	910
	Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys Tyr	
	210 215 220 225	
35		
	tca gct ggc att gca aaa ctg gaa gaa gga gat gaa ctc caa ctt gca	958
	Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu Ala	
	230 235 240	
40		
	ata cca aga gaa aat gca caa ata tca ctg gat gga gat gtc aca ttt	1006
	Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr Phe	
	245 250 255	
45		
	ttt ggt gca ttg aaa ctg ctg tgacctactt acaccatgtc tgtagctatt	1057
	Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu	
	260	
50		
	ttcctccctt tctctgtacc tctaagaaga aagaatctaa ctgaaaatac caaaaaaaaa	1117
	aaaaaaaaaa aaaaaaccct cgagcgccg cc	1149
55		

<210> 18

<211> 264

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 204 502 T3

5 Met Lys Leu Lys Glu Cys Val Ser Ile Leu Pro Arg Lys Glu Ser Pro
 1 5 10 15
 Ser Val Arg Ser Ser Lys Asp Gly Lys Leu Leu Ala Ala Thr Leu Leu
 20 25 30
 Leu Ala Leu Leu Ser Cys Cys Leu Thr Val Val Ser Phe Tyr Gln Val
 35 40 45
 10 Ala Ala Leu Gln Gly Asp Leu Ala Ser Leu Arg Ala Glu Leu Gln Gly
 50 55 60
 His His Ala Glu Lys Leu Pro Ala Gly Ala Gly Ala Pro Lys Ala Gly
 65 70 75 80
 15 Leu Glu Glu Ala Pro Ala Val Thr Ala Gly Leu Lys Ile Phe Glu Pro
 85 90 95
 Pro Ala Pro Gly Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asn Ser Arg Asn Lys Arg
 100 105 110
 20 Ala Val Gln Gly Pro Glu Glu Thr Val Thr Gln Asp Cys Leu Gln Leu
 115 120 125
 Ile Ala Asp Ser Glu Thr Pro Thr Ile Gln Lys Gly Ser Tyr Thr Phe
 130 135 140
 25 Val Pro Trp Leu Leu Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys
 145 150 155 160
 Glu Asn Lys Ile Leu Val Lys Glu Thr Gly Tyr Phe Phe Ile Tyr Gly
 165 170 175
 30 Gln Val Leu Tyr Thr Asp Lys Thr Tyr Ala Met Gly His Leu Ile Gln
 180 185 190
 Arg Lys Lys Val His Val Phe Gly Asp Glu Leu Ser Leu Val Thr Leu
 195 200 205
 35 Phe Arg Cys Ile Gln Asn Met Pro Glu Thr Leu Pro Asn Asn Ser Cys
 210 215 220
 Tyr Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Asp Glu Leu Gln Leu
 225 230 235 240
 40 Ala Ile Pro Arg Glu Asn Ala Gln Ile Ser Leu Asp Gly Asp Val Thr
 245 250 255
 45 Phe Phe Gly Ala Leu Lys Leu Leu
 260

<210> 19

<211> 1.430

50 <212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

55 <221> CDS

<222> (102)...(848)

<400> 19

60

65

ES 2 204 502 T3

	ttggcgcagg agcgtgcgta ggattgctcg ctcacaacag gcacctgact ggtattgaaa	60
	gccgagtctt cccttcctct ttaaaggatt ggtgaccagg c atg gct atg gca ttc	116
5	Met Ala Met Ala Phe 1 5	
	tgc ccc aaa gat cag tac tgg gac tcc tca agg aaa tcc tgt gtc tcc	164
10	Cys Pro Lys Asp Gln Tyr Trp Asp Ser Ser Arg Lys Ser Cys Val Ser 10 15 20	
	tgt gca ctg acc tgc agc cag agg agc cag cgc acc tgt aca gac ttc	212
15	Cys Ala Leu Thr Cys Ser Gln Arg Ser Gln Arg Thr Cys Thr Asp Phe 25 30 35	
	tgc aaa ttc atc aat tgc cga aaa gag caa ggc agg tac tac gac cat	260
20	Cys Lys Phe Ile Asn Cys Arg Lys Glu Gln Gly Arg Tyr Tyr Asp His 40 45 50	
	ctc ctg ggg gcc tgc gtc agc tgt gac tcc acc tgc aca cag cac cct	308
25	Leu Leu Gly Ala Cys Val Ser Cys Asp Ser Thr Cys Thr Gln His Pro 55 60 65	
	cag cag tgt gcc cac ttc tgt gag aaa agg ccc aga agc cag gcg aac	356
30	Gln Gln Cys Ala His Phe Cys Glu Lys Arg Pro Arg Ser Gln Ala Asn 70 75 80 85	
	ctc cag ccc gag ctc ggg aga cca cag gcc ggg gag gtg gaa gtc agg	404
35	Leu Gln Pro Glu Leu Gly Arg Pro Gln Ala Gly Glu Val Glu Val Arg 90 95 100	
	tca gac aac tca gga agg cac cag gga tct gag cat ggt cca gga ttg	452
40	Ser Asp Asn Ser Gly Arg His Gln Gly Ser Glu His Gly Pro Gly Leu 105 110 115	
	agg cta agt agc gac cag ctg act ctc tac tgc aca ctg ggg gtc tgc	500
45	Arg Leu Ser Ser Asp Gln Leu Thr Leu Tyr Cys Thr Leu Gly Val Cys 120 125 130	
	ctc tgc gcc atc ttc tgc tgt ttc ttg gtg gcc ttg gcc tcc ttc ctc	548
50	Leu Cys Ala Ile Phe Cys Cys Phe Leu Val Ala Leu Ala Ser Phe Leu 135 140 145	
55		
60		
65		

ES 2 204 502 T3

5	agg cgt aga gga gag cca cta ccc agc cag cct gcc ggg cca cgt ggg Arg Arg Arg Gly Glu Pro Leu Pro Ser Gln Pro Ala Gly Pro Arg Gly 150 155 160 165	596
10	tca caa gca aac tct ccc cac gcc cac cgc ccc gtg aca gag gct tgc Ser Gln Ala Asn Ser Pro His Ala His Arg Pro Val Thr Glu Ala Cys 170 175 180	644
15	gac gag gtg acc gcg tca ccc cag cct gtg gaa acg tgt agc ttc tgc Asp Glu Val Thr Ala Ser Pro Gln Pro Val Glu Thr Cys Ser Phe Cys 185 190 195	692
20	ttc ccg gag cgc agt tct ccc act cag gag agc gcg ccg cgt tgc ctc Phe Pro Glu Arg Ser Ser Pro Thr Gln Glu Ser Ala Pro Arg Ser Leu 200 205 210	740
25	ggg ata cac ggc ttc gcg ggc act gcc gcc ccg cag ccc tgt atg cgt Gly Ile His Gly Phe Ala Gly Thr Ala Ala Pro Gln Pro Cys Met Arg 215 220 225	788
30	gca aca gta ggc ggc ctg ggt gtc ctg cgc gca tcc act ggg gac gct Ala Thr Val Gly Gly Leu Gly Val Leu Arg Ala Ser Thr Gly Asp Ala 230 235 240 245	836
35	cgt ccg gca act tgacagcccg aaaaataaaa aagacaattt agaggatgga Arg Pro Ala Thr	888
40	gtgacagagg gggaaagga tggagaagag acagatgaag acacgataaa ggaagcccgg ctgcacccac gcagagcaac aaagcaacca cctgcagcgc ccacgttccc agcaccgcct gtgcctgccc ctgtgtccta tactttccag agcagtcaac ctgtgccttt tttctttagt cgagaaagat ggagaatgac cggcacctag cattaccctt acaattctta caaacaagtg gtctttccta tggccttagg cagatagctg agtgcagtgt ggatgtattt gtgatttaag taacttgtat gtgtatgtgc agattcgggg ttatgtcata tgtgcatgta tacgtgagtt gtgtgtctgt atgagttgtg tgtatatgtg cgcctataaa tatgtgtgtg aattctgtgc atgcagatgt gtgtgtacat atgtgtctgg ctgatgtggt atagccagaa agatgagggc ccttctaggt gaaggccaaa catctaaaaa ccatctaggt gatgggtgct cgtgccgaat tc	948 1008 1068 1128 1188 1248 1308 1368 1428 1430
50	<210> 20 <211> 249 <212> PRT <213> Mus musculus	
55	<400> 20	
60		
65		

ES 2 204 502 T3

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

45 <210> 21
 <211> 473
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Sonda para transferencia Northern

55 <400> 21
 ctgtggacgg ggggtggctat gagatcctgc cccgaagagc agtactggga tcctctgctg 60
 ggtacctgca tgtcctgcaa aaccatttgc aaccatcaga gccagcgac ctgtgcagcc 120
 ttctgcaggt cactcagctg ccgcaaggag caaggcaagt tctatgacca tctcctgagg 180
 gactgcatca gctgtgcctc catctgtgga cagcacccta agcaatgtgc atacttctgt 240
 gagaacaagc tcaggagccc agtgaacctt ccaccagagc tcaggagaca gcggagtgga 300
 gaagttgaaa acaattcaga caactcggga aggtaccaag gattggagca cagaggetca 360
 gaagcaagtc cagctctccc ggggctgaag ctgagtgcag atcaggtggc cctggtctac 420
 agcacgctgg ggctctgcct gtgtgccgct ctctgctgct tcctggtggc ggt 473

ES 2 204 502 T3

<210> 22
 <211> 25
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> ZC20061
 10 <400> 22

 ctgtggacag ggggtggctat gagat 25
 15 <210> 23
 <211> 25
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido ZC20062
 25 <400> 23

 accgccacca ggaagcacag aggac 25
 30 <210> 24
 <211> 256
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Sonda para transferencia Northern
 40 <400> 24

tgcgattctc tggacctgtt tgggactgag cttaataatt tctttggcag ttttcgtgct 60
aatgtttttg ctaaggaaga taagctctga accattaaag gacgagtta aaaacacagg 120
 45 **atcaggcttc ctgggcatgg ctaacattga cctggaaaag agcaggactg gtgatgaaat 180**
tattcttccg agaggcctcg agtacacggt ggaagaatgc acctgtgaag actgcatcaa 240
gagcaaaccg aaggtc 256
 50 <210> 25
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Oligonucleótido ZC21065
 60 <400> 25

 tgcgattctc tggacctgtt tg 22
 65

ES 2 204 502 T3

	<210> 26	
	<211> 22	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC21067	
10	<400> 26	
	gaccttcggt ttgctctga tg	22
15	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC24200	
25	<400> 27	
	acactggggg tctgcctctg	20
30	<210> 28	
	<211> 17	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC24201	
40	<400> 28	
	gcgaagccgt gtatccc	17
45	<210> 29	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC24198	
55	<400> 29	
	tctacagcac gctgggg	17
60	<210> 30	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC24199	

ES 2 204 502 T3

	<400> 30		
	gcacaagtgg ggtcgg		16
5	<210> 31		
	<211> 19		
	<212> DNA		
10	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido ZC24271		
15	<400> 31		
	ttattgtaat gcaagtgtg		19
20	<210> 32		
	<211> 17		
	<212> DNA		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido ZC24272		
30	<400> 32		
	tagctgggag tggaaag		17
35	<210> 33		
	<211> 20		
	<212> DNA		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido ZC24495		
45	<400> 33		
	tccaagcgtg accagttcag		20
50	<210> 34		
	<211> 18		
	<212> DNA		
55	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido ZC24496		
60	<400> 34		
	agttggcttc tccatccc		18
65			

ES 2 204 502 T3

<210> 35
 <211> 1.090
 <212> DNA
 5 <213> Homo sapiens

<400> 35

10	taactctcct	gaggggtgag	ccaagccctg	ccatgtagtg	cacgcaggac	atcaacaaac	60
	acagataaca	ggaaatgata	cattccctgt	ggtcacttat	tctaaaggcc	ccaaccttca	120
	aagttcaagt	agtgatatgg	atgactccac	agaaaggag	cagtcacgcc	ttacttcttg	180
	ccttaagaaa	agagaagaaa	tgaaactgaa	ggagtgtgtt	tccatcctcc	cacggaagga	240
15	aagcccctct	gtccgatact	ccaaagacgg	aaagctgctg	gctgcaacct	tgctgctggc	300
	actgctgtct	tgctgcctca	cggtggtgtc	tttctaccag	gtggccgccc	tgcaaggagg	360
	cctggccagc	ctccgggcag	agctgcaggg	ccaccacgcg	gagaagctgc	cagcaggagc	420
	aggagccccc	aaggccggcc	tggagggaag	tccagctgtc	accgcgggac	tgaaaatctt	480
20	tgaaccacca	gctccaggag	aaggcaactc	cagtcagaac	agcagaaata	agcgtgccgt	540
	tcagggtcca	gaagaaacag	tcactcaaga	ctgcttgcaa	ctgattgcag	acagtgaaac	600
	accaactata	caaaaaggat	cttacacatt	tgttccatgg	cttctcagct	ttaaaagggg	660
	aagtgcccta	gaagaaaaag	agaataaaat	attggtcaaa	gaaactgggt	acttttttat	720
25	atatggtcag	gttttatata	ctgataagac	ctacgccatg	ggacatctaa	ttcagaggaa	780
	gaagggtccat	gtctttgggg	atgaattgag	tctggtgact	ttgtttcgat	gtattcaaaa	840
	tatgcctgaa	acactaccca	ataattcctg	ctattcagct	ggcattgcaa	aactggaaga	900
	aggagatgaa	ctccaacttg	caataccaag	agaaaatgca	caaatatcac	tggatggaga	960
30	tgtcacattt	tttgggtgat	tgaaactgct	gtgacctact	tacaccatgt	ctgtagctat	1020
	tttcctccct	ttctctgtac	ctctaagaag	aaagaatcta	actgaaaata	ccaaaaaaaa	1080
	aaaaaaaaaa						1090

35 <210> 36
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido

45 <400> 36

cgcgcggttt aaacgccacc atggatgact ccaca

35

50 <210> 37
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligonucleótido

60 <400> 37

gtatacggcg cgctcacag cagtttcaat gc

32

65

ES 2 204 502 T3

	<210> 38	
	<211> 25	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC17251	
10	<400> 38	
	tctggacgtc ctctgctgg tatag	25
15	<210> 39	
	<211> 25	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC17252	
25	<400> 39	
	ggtatggagc aaggggcaag ttggg	25
30	<210> 40	
	<211> 27	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC17156	
40	<400> 40	
	gagtggcaac ttccagggcc aggagag	27
45	<210> 41	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC17157	
55	<400> 41	
	cttttgetag cctcaaccct gactatc	27
60	<210> 42	
	<211> 813	
	<212> DNA	
	<213> Homo sapiens	
65	<400> 42	

ES 2 204 502 T3

5 ggcacagcac ggggcgatgg gcgcgtttcg ggccctgtgc ggcctggcgc tgctgtgcgc 60
 gctcagcctg ggtcagcgcc ccaccggggg tcccgggtgc ggccctgggc gcctcctgct 120
 tgggacggga acggacgcgc gctgctgccg gggtcacacg acgcgctgct gccgcgatta 180
 cccgggagag gagtgcgtgt ccgagtggga ctgcatgtgt gtccagcctg aattccactg 240
 cggagaccct tgctgcacga cctgccggca ccacccttgt ccccagggcc aggggggtaca 300
 gtcccagggg aaattcagtt ttggcttcca gtgtatcgac tgtgcctcgg ggaccttctc 360
 10 cggggggccac gaaggccact gcaaaccctg gacagactgc acccagttcg ggtttctcac 420
 tgtgttccct gggaacaaga cccacaacgc tgtgtgcgtc ccagggtccc cgccggcaga 480
 gccgcttggg tggctgaccg tcgtcctcct ggccgtggcc gcctgcgtcc tcctcctgac 540
 ctccggcccag ctggactgc acatctggca gctgaggagt cagtgcattg ggccccgaga 600
 15 gaccagctg ctgctggagg tgccgcccgc gaccgaagac gccagaagct gccagttccc 660
 cgaggaagag cggggcgagc gatcggcaga ggagaagggg cggctgggag acctgtgggt 720
 gtgagcctgg ctgtcctccg gggccaccga ccgcagccag cccctcccca ggagctcccc 780
 20 aggccgcagg gctctgcgtt ctgctctggg ccg 813

<210> 43

<211> 44

<212> DNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC10134

30

<400> 43

atcagcggaa ttcagatctt cagacaaaac tacacaatgc ccac

44

35 <210> 44

<211> 35

<212> DNA

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido ZC10135

45 <400> 44

ggcagtcctc agatcattta cccggagaca gggag

35

50 <210> 45

<211> 768

<212> DNA

55 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (7)...(759)

60 <223> Secuencia de Fc de Ig

<400> 45

65

ES 2 204 502 T3

5	ggatcc atg aag cac ctg tgg ttc ttc ctc ctg ctg gtg gcg gct ccc Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Val Ala Ala Pro 1 5 10	48
10	aga tgg gtc ctg tcc gag ccc aga tct tca gac aaa act cac aca tgc Arg Trp Val Leu Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys 15 20 25 30	96
15	cca ccg tgc cca gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu 35 40 45	144
20	ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu 50 55 60	192
25	gtc aca tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys 65 70 75	240
30	ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys 80 85 90	288
35	ccg cgg gag gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu 95 100 105 110	336
40	acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys 115 120 125	384
45	gtc tcc aac aaa gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys 130 135 140	432
50	gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser 145 150 155	480
55	cgg gat gag ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys 160 165 170	528
60	ggc ttc tat ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln 175 180 185 190	576

ES 2 204 502 T3

5	ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly 195 200 205	624
10	tcc ttc ttc ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln 210 215 220	672
15	cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn 225 230 235	720
20	cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taatctaga His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys 240 245 250	768
25	<210> 46 <211> 52 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido ZC15345	
35	<400> 46 ccgtgccag cacctgaagc cgagggggca cgtcagtct tctcttccc cc	52
40	<210> 47 <211> 31 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido ZC15347	
50	<400> 47 ggattctaga tttataccc ggagacaggg a	31
55	<210> 48 <211> 55 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido ZC15517	
65	<400> 48 ggtggcggct cccagatggg tctgtccga gccagatct tcagacaaaa ctcac	55

ES 2 204 502 T3

	<210> 49	
	<211> 18	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC15530	
10	<400> 49	
	tgaggaggct ttgttga	18
15	<210> 50	
	<211> 42	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC15518	
25	<400> 50	
	tccaacaaag ccctcccatc ctccatcgag aaaaccatct cc	42
30	<210> 51	
	<211> 57	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido ZC15516	
40	<400> 51	
	ggatggatcc atgaagcacc tgtgttctt cctctgctg gtggcgctc ccagatg	57
45	<210> 52	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	
55	<400> 52	
	ctcagccagg aaatccatgc cgagttgaga cgttccgta gaatgagtgg cctgggccg	59
60	<210> 53	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Cebador oligonucleotídico	

ES 2 204 502 T3

<400> 53

gcacgtgtga gttttgtctg aagatctggg ctccttcagc cccgggag

48

5

<210> 54

<211> 59

<212> DNA

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

15

<400> 54

ctcagccagg aaatccatgc cgagttgaga cgcttccgta gaatgagtgg cctgggccc

59

20

<210> 55

<211> 59

<212> DNA

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

30

<400> 55

gcacggggg catgtgtgag tttgtctga agatctgggc tccttcagcc ccgggagag

59

35

<210> 56

<211> 60

<212> DNA

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

45

<400> 56

gcacagaggc tcagaagcaa gtccagctct cccggggctg aaggagccca gatcttcaga

60

50

<210> 57

<211> 56

<212> DNA

55 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador oligonucleotídico

60

<400> 57

gggggtgggta caacccaga gctgttttaa tctagattat ttacccggag acaggg

56

65

ES 2 204 502 T3

<210> 58
 <211> 59
 <212> DNA
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador oligonucleotídico
 10
 <400> 58

 ctaacatgtc agcggtattg taatgcaagt gtgaccaatt cagagcccag atcttcaga 59
 15
 <210> 59
 <211> 20
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Anticuerpo peptídico
 25
 <400> 59

 Ser Ala Gly Ile Ala Lys Leu Glu Glu Gly Pro Glu Leu Gln Leu Ala
 1 5 10 15
 30 Ile Pro Arg Glu
 20

 <210> 60
 35 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Anticuerpo peptídico

 <400> 60
 45 Ser Phe Lys Arg Gly Ser Ala Leu Glu Glu Lys Glu Asn Lys Glu Leu
 1 5 10 15
 Val Lys Glu Thr
 20
 50

 55

 60

 65