



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 264 127**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **95926279 .1**

86 Fecha de presentación : **14.07.1995**

87 Número de publicación de la solicitud: **0773997**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.05.1997**

54 Título: **Ligando de Htk.**

30 Prioridad: **20.07.1994 US 277722**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.12.2006

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.12.2006

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
460 Point San Bruno Boulevard
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Bennett, Brian, D. y**
Matthews, William

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 264 127 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

Ligando de Htk.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 La presente invención hace referencia en general a un ligando del receptor de proteína tirosina quinasa (rPTK). En particular, la invención hace referencia a un nuevo ligando que se une a, y activa, el receptor quinasa transmembrana de hepatoma (Htk) (también conocido como el receptor HpTK 5) y al aislamiento y producción recombinante del mismo.

Descripción de la técnica relacionada

15 La transducción de señales que regulan el crecimiento y la diferenciación celular está controlada en parte por la fosforilación de diversas proteínas celulares. Las proteínas tirosina quinasas son enzimas que catalizan este proceso. Los miembros de la familia de proteínas tirosina quinasas pueden ser reconocidos por la presencia de algunas regiones aminoacídicas conservadas en el dominio catalítico de tirosina quinasa (Hanks y col., Science 241:42-52 [1988]). El dominio de tirosina quinasa está implicado en las vías de transducción de señales de la mitogénesis, la transformación y la diferenciación celular. Ciertas tirosinas quinasas estimulan predominantemente el crecimiento y la diferenciación celular, mientras que otras tirosina quinasas detienen el crecimiento celular y promueven la diferenciación. Además, dependiendo del entorno celular en el que se expresan, la misma tirosina quinasa puede estimular, o inhibir, la proliferación celular. Véase Schlessinger y col., Neuron 9:383-391 [1992].

25 Los receptores de proteína tirosina quinasa (rPTKs) transmiten las señales extracelulares a las vías de señalización intracelular y en consecuencia controlan la proliferación y diferenciación celular. Estos rPTKs comparten una estructura similar, con una parte catalítica intracelular, un dominio transmembrana y un dominio de unión al ligando extracelular. (Schlessinger y col., *supra*). Los dominios extracelulares (ECDs), que son responsables de la unión al ligando y de la transmisión de señales biológicas, han mostrado estar compuestos de diversos motivos estructurales distintos. El dominio intracelular comprende una proteína catalítica tirosina quinasa.

30 Los receptores tirosina quinasa se dividen en diversas clases, de acuerdo con su secuencia y similitudes estructurales. Por ejemplo, los receptores de Clase V tienen regiones ricas en cisteína y fibronectina de Tipo III en el dominio extracelular e incluyen los receptores EPH, ELK, ERK, EEK, ECK y HEK. Para una revisión de las diversas clases de receptores tirosina quinasas y sus funciones, véase, por ejemplo, Hanks y col., *supra* y Schlessinger y col., *supra*.

40 Los ligandos proteicos para los receptores de proteína tirosina quinasa se unen al dominio extracelular de sus receptores dobles en la superficie celular y de este modo estimulan la fosforilación de tirosinas. Algunos de estos ligandos son factores de crecimiento o citoquinas, tales como el factor de crecimiento 1 de tipo insulina (IGF-1), el factor de crecimiento epitelial (EGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento nervioso (NGF). Los ligandos para diversos receptores tirosina quinasa han demostrado que funcionan en el sistema hematopoyético. Por ejemplo, el ligando para el receptor tirosina quinasa flt3/flk-2 murino, clonado recientemente, estimula la proliferación de células hematopoyéticas primitivas de ratón y las de médula ósea CD-34 positivas humanas. Lyman y col., Cell 75:1157-1167 (1993).

50 Un ligando proteico que estimula la fosforilación del receptor ECK se ha clonado recientemente y se ha expresado en células CHO. Bartley y col., Nature 368:558-560 (1994). Este ligando de ECK se halló que era idéntico a B61, una molécula aislada con anterioridad por Holzman y col., Mol. Cell. Biol. 10:5830-5838 (1990).

55 Recientemente, se ha identificado y clonado un receptor tirosina quinasa a partir de una línea de células de carcinoma hepatocelular humanas, Hep 3B. Este receptor, denominado receptor "Htk" o receptor "HpTK 5", se cree que pertenece a la Clase V o a la subfamilia EPH o rPTKs. Véase Bennett y col., J. Biol. Chem., 269 (19):14211-14218 (1994).

60 El análisis de transferencia de Northern de los tejidos fetales humanos demostró que la expresión del ácido nucleico del receptor de Htk tiene lugar en el corazón, pulmón, hígado, cerebro y riñón. En el tejido humano adulto, no se detectó ninguna señal en el cerebro, mientras que sí se observó una señal especialmente intensa en la placenta, seguido por el riñón, hígado, pulmón y páncreas. El músculo esquelético y el corazón presentaron una señal de menor intensidad. Véase Bennett y col., *supra*.

65 La expresión del ácido nucleico del receptor Htk en las líneas celulares de tumores humanos también se analizó por transferencia de Northern. Las líneas celulares derivadas del hígado, mama (MCF-7), colon (Colo 205), pulmón (NCI 69), melanocitos (HM-1) y cérvix (HeLa) presentaron señales detectables de tamaño adecuado. Se observó la presencia de RNA mensajero en líneas celulares seleccionadas de origen hematopoyético. K562 (una célula mielocítica primitiva multipotente), THP-1 (una célula monocitoide), U937 (una línea celular mielomonocítica), Hep3B (una línea celular de hepatocarcinoma humano), y CMK (de origen megacariocítico) fueron todas positivas para el RNA mensajero

del receptor Htk, pero las células linfoides (H9, Jurkat, JH-1, Raji, Ramos) u otras células mieloides seleccionadas (KG-1-o KMT2) no presentaron un transcrito detectable por transferencia de Northern. Véase Bennett y col., *supra*.

5 El homólogo murino del receptor Htk, denominado “myk-1”, se aisló a partir del epitelio de glándulas mamarias. Véase Andres y col., *Oncogene* 9:1461-1467 (1994). Andres y col., publicaron que myk-1 se induce durante la proliferación del epitelio de mamíferos y se inhibe durante su diferenciación. Además, la expresión no regulada del receptor se considera que representa potencialmente un suceso temprano en la carcinogénesis de la glándula mamaria (véase Andres y col., *supra*).

10 Sin embargo, se cree que el ligando proteico para el receptor Htk no se ha descubierto todavía. En consecuencia, es un objetivo de la presente invención proporcionar un ligando para el receptor Htk.

Es otro objetivo de la invención proporcionar el ácido nucleico que codifica el ligando de Htk para que éste pueda generarse mediante tecnología de ADN recombinante.

15 Éstos y otros objetivos serán evidentes para un experto en la materia tras considerar la memoria globalmente.

Descripción resumida de la invención

20 Estos objetivos se consiguen, en un aspecto, proporcionando el ligando de Htk aislado que puede ser antigénica o biológicamente activo. En una realización, la invención proporciona una forma soluble del ligando con al menos la región transmembrana eliminada. Generalmente, el dominio citoplasmático también estará ausente.

25 Un ejemplo de forma soluble del ligando de Htk es una inmunoadhesina, la cual es una fusión del dominio extracelular del ligando de Htk y una secuencia de inmunoglobulina.

La invención también abarca otras quimeras que comprenden el ligando de Htk (o una fracción del mismo) fusionado con otro polipéptido. Un ejemplo de dicha quimera es un ligando de Htk etiquetado epítópicamente.

30 En otro aspecto, la invención proporciona una composición que comprende el ligando de Htk biológicamente activo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, el ligando de Htk está presente en una forma soluble en la composición farmacéutica.

35 La invención también proporciona secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican el ligando de Htk y quimeras del ligando de Htk.

40 En una realización de la invención, se puede proporcionar el ácido nucleico en un vector replicable que puede transformarse en un célula huésped. También se proporciona un procedimiento para utilizar el ácido nucleico que codifica el ligando de Htk para realizar la fabricación de la nueva proteína, el cual comprende la expresión del ácido nucleico en un cultivo de células huésped transformadas y la recuperación de la proteína del cultivo de células huésped.

La invención también proporciona un procedimiento que implica el contacto del receptor Htk con el ligando de Htk con el fin de provocar la fosforilación del dominio quinasa del mismo.

45 La invención también proporciona un anticuerpo monoclonal que se une al ligando de Htk, que puede utilizarse para detectar la presencia del ligando de Htk en una muestra biológica sospechosa de contener el ligando, por ejemplo.

Descripción resumida de las figuras

50 Las Figuras 1A-1B muestran una alineación de la secuencia nucleotídica (SEC ID NO:1) y de la secuencia aminoácídica deducida (SEC ID NO:2) del ligando de Htk murino que se describe en la presente.

55 La Figura 2 muestra una alineación de la secuencia nucleotídica (SEC ID NO:3) y de la secuencia aminoácídica (SEC ID NO:4) del ligando de Htk humano que se describe aquí.

60 La Figura 3 muestra una alineación de las secuencias aminoácídicas del ligando de Htk murino (muHtkL) y del ligando de Htk humano (humHtkL) (SEC ID Nos: 2 y 4, respectivamente). Los residuos idénticos están encuadrados. El área sombreada representa un dominio transmembrana. El dominio extracelular y el intracelular son N-terminal y C-terminal al dominio transmembrana, respectivamente. El aminoácido predicho como sitio de corte para el péptido señal está indicado por una flecha. Los sitios de N-glicosilación están marcados con un (*) y las cisteínas conservadas están marcadas con un (▼).

65 La Figura 4 muestra la secuencia nucleotídica (SEC ID NO:5) y la secuencia aminoácídica deducida (SEC ID NO:6) del receptor Htk humano descrito en Bennett y col., *supra*. El aminoácido predicho como sitio de corte para el péptido señal se indica con una flecha. Los residuos cisteína conservados entre los miembros de la familia ELK están marcados con un círculo y la región transmembrana está subrayada.

Las Figuras 5A-5B muestran las curvas de competición por la unión de Htk-Fc con la línea celular SV40MES 13 (Figura 5A) o el ligando de Htk murino recombinante expresado en las células COS-7 (Figura 5B). La representación de Scatchard de cada curva de unión se muestra en el interior de las figuras e indica las Kds de 3 nM y 0,5 nM, respectivamente.

5

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

10 Al describir la presente invención, se utilizarán los siguientes términos, los cuales deben definirse tal como se indica a continuación.

El ligando “Htk” se define en la presente como cualquier secuencia polipeptídica que se une a y activa rPTK, preferentemente se une a un dominio extracelular del receptor Htk y en consecuencia activa el dominio tirosina quinasa intracelular del mismo. La activación del rPTK puede medirse mediante la autofosforilación de residuos tirosina en el dominio intracelular de rPTK. Véase el ejemplo 4 de la presente como ejemplo de técnica para medir la autofosforilación del receptor. El ligando de Htk también puede presentar otras propiedades biológicas de un polipéptido natural, que tenga cualquiera de las secuencias aminoacídicas que se muestran en la Figura 3.

20 Una “propiedad biológica” con propósitos de la presente invención quiere decir una función efectora o antigénica *in vivo* o una actividad que se realice directa o indirectamente por el ligando de Htk, tal como se muestra por las secuencias en la Figura 3 (bien en su conformación nativa o desnaturalizada). Una función efectora principal es la capacidad del ligando de Htk para unirse a, y activar, un rPTK, tal como el receptor Htk (también conocido como el receptor HpTK 5), descrito en Bennett y col., *supra*. El receptor de Htk es un rPTK de la Clase V o de la subfamilia EPH de rPTKs. La secuencia nucleotídica y aminoacídica del receptor Htk se muestran en la Figura 4. Por lo general, el ligando se unirá al dominio extracelular del receptor Htk y en consecuencia activará el dominio tirosina quinasa intracelular del mismo. Consecuentemente, la unión del ligando con el receptor puede dar como resultado el aumento o inhibición de la proliferación y/o diferenciación y/o la activación de células que tengan un receptor para el ligando de Htk *in vivo* o *in vitro*. La unión del ligando con el receptor Htk puede determinarse utilizando técnicas convencionales, que incluyen los procedimientos de unión competitiva, tales como el RIA, ELISA, y otros ensayos de unión competitiva. Los complejos ligando/receptor pueden identificarse utilizando procedimientos de separación como filtración, centrifugación, citometría de flujo (véase, por ejemplo., Lyman y col., *Cell* 75:1157-1167 [1993]; Urdal y col., *J. Biol. Chem.* 263:2870-2877 [1988]; y Gearing y col., *EMBO J* 8:3667-3676 [1989]), y similares. Los resultados de los estudios de unión se pueden analizar utilizando cualquier representación gráfica convencional de los datos de la unión, tal como el análisis de Scatchard (Scatchard, *Ann. NY. Acad. Sci.* 51:660-672 [1949]; y Goodwin y col., *Cell* 73:447-456 [1993]), y similares. Ya que el ligando de Htk induce la fosforilación del receptor Htk, los ensayos convencionales de fosforilación de tirosinas, tal como el ensayo descrito en el ejemplo 4 de la presente, también pueden utilizarse como una indicación de la formación del complejo receptor Htk/ligando. Otras funciones efectoras incluyen la transducción de señal, cualquier actividad enzimática o la actividad moduladora de la enzima (por ejemplo., actividad tirosina quinasa), o cualquier función estructural, por ejemplo, las funciones efectoras no incluyen la posesión de un epítipo o sitio antigénico que sea capaz de reaccionar de forma cruzada con los anticuerpos desarrollados contra el ligando de Htk. Una función antigénica implica la posesión de un epítipo o sitio antigénico que sea capaz de reaccionar de forma cruzada con los anticuerpos desarrollados contra la secuencia polipeptídica de un polipéptido natural que comprende cualquiera de las secuencias de la Figura 3.

45 Un ligando de Htk “biológicamente activo” se define en la presente como un polipéptido que comparte una función efectora del ligando de Htk y que puede (aunque no es indispensable) tener además una función antigénica. Una función efectora conocida principal del ligando de Htk es su capacidad para provocar la fosforilación proteica del receptor Htk.

50 Un ligando de Htk “antigénicamente activo” se define como un polipéptido que posee una función antigénica de ligando de Htk y que puede (aunque no es indispensable) poseer además una función efectora.

En realizaciones preferidas, el ligando de Htk activo antigénicamente es un polipéptido que se une con una afinidad de al menos aproximadamente 10^6 l/mol a un anticuerpo capaz de unirse al ligando de Htk. Generalmente, el polipéptido se une con una afinidad de al menos 10^7 l/mol. El anticuerpo aislado capaz de unirse al ligando de Htk es un anticuerpo que se identifica y separa a partir de un componente del entorno natural en donde puede estar presente. Más preferentemente, el ligando de Htk antigénicamente activo es un polipéptido que se une a un anticuerpo capaz de unirse al ligando de Htk en su conformación nativa. El ligando de Htk en su conformación nativa es el ligando de Htk que se halla en la naturaleza que no ha sido desnaturalizado por agentes caotrópicos, el calor, u otro tratamiento que modifique sustancialmente su estructura tridimensional según se determina, por ejemplo, mediante la migración en geles por tamaño no reductores y no desnaturalizantes. Generalmente, el ligando de Htk activo antigénicamente tendrá una secuencia aminoacídica con al menos el 75% de identidad de secuencia aminoacídica con las secuencias aminoacídicas del ligando de Htk maduro que se muestran en la Figura 3, más preferentemente de al menos el 80%, más preferentemente de al menos el 85%, más preferentemente de al menos el 90% y más preferentemente de al menos el 95%. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en la presente como el porcentaje de residuos aminoacídicos en la secuencia candidata que son idénticos con los residuos del ligando de Htk, después de la alineación de las secuencias e introducción de huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de

identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones, o inserciones N- y C-terminales o internas en la secuencia del ligando de Htk debe considerarse si afecta la identidad u homología de secuencia.

5 De este modo, los polipéptidos del ligando de Htk antigénicamente activos y biológicamente activos que son materia de la presente invención incluyen el polipéptido representado por la secuencia nucleotídica traducida completa del ligando de Htk (incluyendo la secuencia señal del mismo); el ligando de Htk maduro con la secuencia señal cortada; los fragmentos que consisten esencialmente del dominio intracelular o del dominio transmembrana del ligando de Htk; los fragmentos del ligando de Htk que tienen una secuencia consecutiva de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, ó 40 residuos
10 de aminoácidos del ligando de Htk; las variantes de secuencia aminoacídica del ligando de Htk en donde un residuo aminoacídico se ha insertado en el extremo N- o C-terminal, o internamente, el ligando de Htk o su fragmento tal como se definió anteriormente; las variantes de secuencia aminoacídica del ligando de Htk o su fragmento, tal como se definió anteriormente, en donde un residuo aminoacídico del ligando de Htk o su fragmento tal como se definió anteriormente se ha sustituido por otro residuo, incluyendo mutaciones predeterminadas por ejemplo, mutagénesis dirigida o por PCR; ligando de Htk de diversas especies animales como el conejo, rata, cerdo, primates no humanos, equinos, murinos y ovinos y alelos u otras variantes naturales de los anteriores y del ligando de Htk humano; derivados del ligando de Htk o sus fragmentos tal como se definió anteriormente en donde el ligando de Htk o sus fragmentos se han modificado covalentemente, por sustitución, modificación química, enzimática u otros medios adecuados, con una fracción distinta a la aminoacídica natural; y las variantes de glicosilación del ligando de Htk (inserción de un
20 sitio de glicosilación o alteración de cualquier sitio de glicosilación por deleción, inserción, o sustitución de residuos adecuados). El ligando de Htk preferido es el ligando de Htk humano, especialmente el ligando de Htk nativo que tiene la secuencia de la Figura 2.

En una realización preferida, el ligando de Htk comprende el ligando de Htk soluble. Por “ligando de Htk soluble” se hace referencia al ligando de Htk que está esencialmente libre de al menos el dominio transmembrana y, opcionalmente, el dominio intracelular del ligando de Htk nativo. Por “esencialmente libre” se indica que la secuencia del ligando de Htk tiene menos de un 2% de dominio transmembrana, preferentemente del 1,0-0% del dominio transmembrana, y más preferentemente del 0,5-0% de este dominio. Los dominios transmembrana de las secuencias aminoacídicas murinas y humanas nativas se describen en la Figura 3, es decir, los residuos 228 a 253 para el ligando de Htk murino y los residuos 225 a 250 para el ligando de Htk humano. Dichos ligandos de Htk solubles pueden tener ventajas desde un punto de vista terapéutico porque son generalmente solubles en la circulación sanguínea del paciente, por ejemplo. De forma similar, dichos ligandos solubles pueden ser particularmente útiles como diagnóstico ya que se espera que presenten una tendencia reducida a incorporarse en la membrana celular.

35 Un ejemplo de una forma soluble del ligando de Htk es una “inmunoadhesina”. El término “inmunoadhesina” se utiliza de forma intercambiable con la expresión “quimera de inmunoglobulina-ligando de Htk” y hace referencia a una molécula quimérica que combina el dominio extracelular (ECD) del ligando de Htk con una secuencia de inmunoglobulina. La secuencia de inmunoglobulina es, preferentemente, pero no necesariamente un dominio constante. La fracción de inmunoglobulina en las quimeras de la presente invención puede obtenerse de los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4; de IgA, IgE, IgD o IgM, pero preferentemente IgG-1 o IgG-3.
40

La expresión “dominio extracelular” o “ECD” cuando se utiliza aquí hace referencia a cualquier secuencia polipeptídica que comparte una función de unión del receptor del dominio extracelular del ligando de Htk natural descrito aquí. La función de unión del receptor hace referencia a la capacidad del polipéptido para unir el dominio extracelular de un rPTK, como el receptor Htk, y, opcionalmente, activar el receptor. Según ello, no es necesario incluir el dominio extracelular completo ya que generalmente segmentos menores son adecuados para la unión del receptor. El término ECD abarca las secuencias polipeptídicas en las que el dominio citoplasmático y la secuencia transmembrana hidrofóbica (y, opcionalmente, de 1-20 aminoácidos del extremo amino-terminal al dominio transmembrana) del ligando de Htk maduro se han delecionado. El dominio extracelular del ligando de Htk está indicado en la Figura 3 (es decir, es amino-terminal respecto al dominio transmembrana).
50

El término “epitopo etiquetado” cuando se utiliza aquí hace referencia a un polipéptido quimérico que comprende el ligando de Htk, o una fracción de lo mismo, fusionado con un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epitopo contra el que puede generarse un anticuerpo, y es lo suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del ligando de Htk. El polipéptido etiqueta también ha de ser lo bastante único para que el anticuerpo contra éste no reaccione de forma cruzada con otros epitopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen al menos 6 residuos aminoacídicos y generalmente entre 8-50 residuos aminoacídicos (preferentemente de 9-30 residuos).
55

60 Un compuesto terapéutico “exógeno” se define como un compuesto terapéutico que es foráneo al paciente mamífero, u homólogo a un compuesto hallado en el paciente mamífero pero que se produce fuera del paciente mamífero.

“Aislado”, cuando se utiliza para describir las diversas proteínas aquí descritas, hace referencia a la proteína que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que pueden interferir con las utilizaciones diagnósticas o terapéuticas de la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, la proteína se purificará (1) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia aminoacídica interna o N-terminal utilizando un secuenciador *spinning cup*, o (2) a homogeneidad con SDS-PAGE en condiciones reductoras o
65

ES 2 264 127 T3

no-reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción de plata. La proteína aislada incluye la proteína *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del ligando de Htk no estará presente. Por lo general, la proteína aislada se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

5 Proteína “esencialmente pura” significa una composición que comprende al menos el 90% en peso de la proteína, según el peso total de la composición y preferentemente al menos el 95% en peso. Proteína “esencialmente homogénea” quiere decir una composición que comprende al menos el 99% en peso de la proteína, según el peso total de la composición.

10 De acuerdo con la presente invención, “ácido nucleico del ligando de Htk” o una “molécula de ácido nucleico del ligando de Htk” es el RNA o el DNA que contiene más de 10 bases que codifican un ligando de Htk activo biológica o antigénicamente, que es complementario con la secuencia de ácido nucleico que codifica el ligando de Htk, o hibrida con la secuencia de ácido nucleico que codifica dicho ligando de Htk y permanece unido establemente en condiciones astringentes. El ácido nucleico incluye opcionalmente las regiones de las secuencias de ácido nucleico de la Figura 1A y la Figura 2 que codifican las secuencias señal. En una realización, la secuencia de ácido nucleico se selecciona a partir de:

(a) las regiones codificantes de las secuencias de ácido nucleico de la Figura 1A o la Figura 2;

20 (b) una secuencia correspondiente con las secuencias de (a) dentro del ámbito del código genético de degeneración;

o
(c) una secuencia que hibrida con una secuencia complementaria con las secuencias de (a) o (b) en condiciones astringentes y que codifica para un ligando de Htk biológicamente activo.

25 En una realización preferida, se ha delecionado la fracción correspondientes a la región transmembrana, y opcionalmente la región citoplasmática del polipéptido, en el ácido nucleico que codifica el ligando de Htk soluble.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico del ligando de Htk codifica un polipéptido que comparte al menos el 75% de identidad de secuencia, más preferentemente el 80%, todavía más preferentemente al menos el 85%, aún más preferentemente al menos el 90% y todavía más preferentemente el 95%, con cualquiera de las secuencias aminoacídicas del ligando de Htk que se muestra en la Figura 3. Preferentemente, la molécula de ácido nucleico del ligando de Htk que hibrida con la secuencia de ácido nucleico que codifica el ligando de Htk contiene al menos 20 bases, más preferentemente 40, y todavía más preferentemente 90 bases.

35 “Condiciones astringentes” son aquellas que (1) utilizan una fuerza iónica baja y elevada temperatura para el lavado, por ejemplo, NaCl 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M, NaDodSO al 1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturante como la formamida, por ejemplo, la formamida al 50% (vol/vol) con albúmina sérica bovina al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5xSSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de 5XDenhardts, DNA de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2XSSC y SDS al 0,1%.

45 Una molécula de ácido nucleico del ligando de Htk “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que generalmente está asociada en la fuente natural del ácido nucleico del ligando de Htk. Una molécula de ácido nucleico del ligando de Htk es distinta en su forma o ajuste de la que se halla en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico del ligando de Htk se distinguen en consecuencia de la molécula de ácido nucleico del ligando de Htk que existe en las células de forma natural. Sin embargo, una molécula aislada de ácido nucleico del ligando de Htk incluye las moléculas de ácido nucleico del ligando de Htk contenidas en las células que generalmente expresan el ligando de Htk si, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se halla en una localización cromosómica distinta de la natural.

50 El polipéptido del ligando de Htk aislado, el ácido nucleico del ligando de Htk, o el anticuerpo del ligando de Htk pueden marcarse con propósitos diagnósticos y para ser utilizados como sondas, mediante un marcaje que se describe y define más adelante en la discusión sobre las utilidades de los anticuerpos del ligando de Htk.

55 Las “secuencias control” de la expresión hacen referencia a secuencias de DNA necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped determinado. Las secuencias control adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, un sitio de unión a ribosomas, y posiblemente, otras secuencias todavía no bien conocidas. Las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación e intensificadores de la transcripción.

60 El ácido nucleico está “unido operativamente” cuando se le coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente al DNA para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o intensificador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado para facilitar la traducción. Por lo general, “unido operativamente” hace referencia a que las secuencias de DNA a unir son contiguas y, en el caso

de un líder secretor, contiguas y en la misma fase de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen porque ser contiguos. La unión se logra mediante ligación en las dianas de restricción adecuadas. Si no existieran dichas dianas, se utilizarían adaptadores oligonucleotídicos o engarces sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

5 El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales anti-ligando de Htk (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) y composiciones de anticuerpos anti-ligando de Htk con especificidad poliepitópica.

10 El término “anticuerpo monoclonal” tal como se utiliza aquí hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que ocurren de forma natural y que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, ya que están dirigidos contra un sitio antigénico específico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes diferentes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal está
15 dirigido contra un determinante único en el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos recombinantes producidos por ajuste de un dominio variable (incluyendo el hipervariable) de un anticuerpo anti-ligando de Htk con un dominio constante (p.ej., “anticuerpos humanizados”), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una
20 cadena de otras especies, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente del origen de la especie, o de la clase o subclase de la inmunoglobulina, así como de los fragmentos de anticuerpo (p.ej., Fab, F(ab')₂ y Fv), siempre que presenten la actividad biológica deseada. [Véase, p.ej., la patente americana U.S. 4.816.567 y Mage & Lamoyi, en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 79-97 (Marcel Dekker, Inc., New York (1987)).

25 El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo como el obtenido de una población homogénea de anticuerpos, y no debe considerarse que se requiera un procedimiento particular para la producción del anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar, de acuerdo con la presente invención, pueden generarse por el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler & Milstein, Nature 256:495 (1975), o mediante procedimientos del DNA recombinante (patente americana U.S. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también
30 pueden aislarse a partir de librerías de fagos generadas con técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty y col., Nature 348:552-554 (1990).

Las formas “humanizadas” de los anticuerpos no-humanos (p.ej., murinos) son inmunoglobulinas quiméricas específicos, cadenas o fragmentos de inmunoglobulinas (como Fv, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión al antígeno
35 de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no-humana. En la mayoría de los casos, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una CDR o de una especie no-humana (anticuerpo donante) como el ratón, rata o conejo con la capacidad, afinidad y especificidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de entramado Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por residuos no-humanos. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se hallan
40 ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias CDR o de entramado importadas. Estas modificaciones se realizan para redefinir y optimizar la generación del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá todos, o al menos uno y generalmente dos dominios variables, en los que todas las regiones CDR corresponden con las de una inmunoglobulina no-humana y todas o casi todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también al menos una fracción de una región constante de
45 inmunoglobulina (Fc), generalmente de una inmunoglobulina humana.

II. Modos para la práctica de la invención

50 La presente invención está basada en el descubrimiento de un nuevo ligando de Htk que se une a, y activa, el receptor de Htk.

La secuencia del cDNA del ligando de Htk murino se describe en la Figura 1A-B. El peso molecular predicho de la proteína después del corte del péptido señal es de 34 KD con un pI estimado de 8,9. De forma similar, el ligando
55 de Htk humano se ha identificado y aislado. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas del ligando de Htk humano se muestran en la Figura 2. Los ligandos murinos y humanos muestran un 96% de homología a nivel aminoacídico, lo que demuestra un grado elevado de conservación entre especies. A continuación, se ofrece una descripción de la preparación del ligando de Htk y de sus variantes.

60 1. Preparación del ligando de Htk de secuencia natural y de sus variantes

La mayor parte de la discusión hace referencia a la producción del ligando de Htk mediante el cultivo de células transformadas con un vector que contiene el ácido nucleico del ligando de Htk y la recuperación del polipéptido del cultivo de células. Se prevé además que el ligando de Htk de esta invención pueda producirse mediante recombinación
65 homóloga, tal como se indica en la patente internacional WO 91/06667, publicada el 16 de Mayo en 1991.

En resumen, este procedimiento implica la transformación de células de mamífero que contienen el gen del ligando de Htk endógeno (p.ej., células humanas si el ligando de Htk deseado es el humano) con una construcción (es decir, el

vector) que comprende un gen amplificable [como la dihidrofolato reductasa (DHFR)] u otros discutidos más adelante], y por lo menos una región flanqueante de una longitud de al menos unos 150 pb homóloga con una secuencia de DNA en el locus de la región codificante del gen del ligando de Htk para la amplificación del gen del ligando de Htk. El gen amplificable debe estar en un sitio que no interfiera con la expresión del gen del ligando de Htk. La transformación se realiza de forma que la construcción se integra de forma homóloga en el genoma de las células primarias para definir una región amplificable.

Las células primarias que comprenden la construcción se seleccionan gracias a su gen amplificable u otro marcador presente en la construcción. La presencia del gen marcador determina la existencia e integración de la construcción en el genoma del huésped. No es necesario realizar una selección posterior de las células primarias, ya que la selección se realizará en el segundo huésped. Si se desea, la ocurrencia del suceso de recombinación homóloga puede determinarse utilizando la PCR y secuenciando las secuencias de DNA amplificadas o determinando la longitud adecuada del fragmento de PCR cuando esté presente el DNA de los integrantes homólogos correctos y en consecuencia se propagarán únicamente aquellas células que contengan dichos fragmentos. También, si se desea, las células seleccionadas pueden amplificarse en este punto estresando las células con el agente de amplificación adecuado (como el metotrexato si el gen amplificable es el DHFR), de modo que se obtienen múltiples copias del gen diana. Preferentemente, sin embargo, la etapa de amplificación no se realiza hasta después de la segunda transformación descrita más adelante.

Después de la etapa de selección, las porciones de DNA del genoma, suficientemente grandes para incluir toda la región amplificable, se aíslan de las células primarias seleccionadas. Las células huésped de expresión en mamífero secundarias se transforman a continuación con estas fracciones de DNA genómico y se clonan. A continuación, se seleccionan los clones que contienen la región amplificable. Dicha región se amplifica con un agente de amplificación si no se ha amplificado todavía en las células primarias. Por último, las células huésped de expresión secundarias que contienen ahora copias múltiples de la región amplificable que incluye el ligando de Htk se cultivan y crecen para expresar el gen y producir la proteína.

A. Aislamiento del DNA que codifica el ligando de Htk

El DNA que codifica el ligando de Htk puede obtenerse a partir de cualquier librería de cDNA preparada del tejido que supuestamente contiene mRNA del ligando de Htk y que lo expresa a un nivel detectable. Según ello, el DNA del ligando de Htk humano puede obtenerse de forma adecuada a partir de una librería de cDNA preparada de tejido del pulmón o del cerebro fetal humano. El DNA del ligando de Htk murino puede derivarse de una librería de cDNA de la línea celular SV40MES 13, por ejemplo. El gen del ligando de Htk también puede obtenerse a partir de una librería genómica o por síntesis oligonucleotídica.

Las librerías se rastrean con sondas (como los anticuerpos contra el ligando de Htk o los oligonucleótidos de aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por éste. El rastreo de la librería de cDNA o genómica con la sonda seleccionada puede realizarse utilizando procedimientos estándares como los descritos en los capítulos 10-12 de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el ligando de Htk es utilizar la metodología de la PCR, tal como se describe en la sección 14 de Sambrook y col., *supra*.

Un procedimiento preferido para la práctica de esta invención es utilizar las secuencias oligonucleotídicas seleccionadas cuidadosamente para rastrear las librerías de cDNAs de tejidos diversos, preferentemente de líneas de pulmón o cerebro fetal humano, más preferentemente, de líneas celulares de pulmón o cerebro fetal humano. Las secuencias oligonucleotídicas seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y lo suficientemente no ambiguas para minimizar la presencia de falsos positivos.

El oligonucleótido debe seleccionarse de modo que pueda detectarse tras hibridación con el DNA en la librería que se rastrea. El procedimiento preferido de marcaje es utilizar ATP marcado con P³² por la polinucleótido quinasa, tal como se conoce en la materia, para marcar isotópicamente el oligonucleótido. Sin embargo, pueden utilizarse otros procedimientos para marcar el oligonucleótido, incluyendo, pero sin limitarse a, el marcaje enzimático biotinilador.

De particular interés es el ácido nucleico del ligando de Htk que codifica un polipéptido de tamaño completo. En algunas realizaciones preferidas, la secuencia de ácido nucleico incluye la secuencia señal del ligando de Htk. El ácido nucleico que tiene toda la secuencia codificante de la proteína se obtiene mediante rastreo de librerías de cDNA o genómicas seleccionadas utilizando la secuencia aminoacídica deducida que se describe aquí por primera vez, y si es necesario, utilizando los procedimientos de extensión de cebador convencionales tal como se describen en la sección 7.79 de Sambrook y col., *supra*, para detectar precursores e intermediarios de procesamiento del mRNA que no se han retro-transcrito a cDNA.

B. Variantes de secuencia aminoacídica del ligando de Htk nativo

Las variantes de secuencia aminoacídica del ligando de Htk se prepararon mediante cambios nucleotídicos adecuados en el DNA del ligando de Htk, o mediante síntesis del polipéptido del ligando de Htk deseado. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos en las secuencias aminoacídicas que se muestran para los ligandos de Htk en la Figura 3. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución se realiza para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Los

cambios aminoacídicos también pueden alterar los procesos post-traduccionales del ligando de Htk, como el cambio en el número o posición de los sitios de glicosilación, alterando las características de anclaje en la membrana, y/o la localización intracelular del ligando de Htk mediante inserción, delección o afectando la secuencia líder del ligando de Htk.

5

Para el diseño de las variantes aminoacídicas del ligando de Htk, la localización del sitio de mutación y de la naturaleza de la mutación dependerá de las características del ligando de Htk a modificar. Los sitios a mutar pueden modificarse individualmente o en series, p.ej., mediante (1) sustitución en primer lugar con aminoácidos conservadores y luego con selecciones más radicales dependiendo de los resultados logrados, (2) delección del residuo diana, o (3) inserción de los residuos de la misma o distinta clase adyacente al sitio específico, o combinaciones de las opciones 1-3.

10

Un procedimiento de utilidad para identificar ciertos residuos o regiones del polipéptido del ligando de Htk que son sitios preferidos para la mutagénesis se denomina “mutagénesis por cribado de alaninas”, tal como se describe por Cunningham y Wells, *Science*, 244:1081-1085 (1989). En dicho procedimiento, se identifica un residuo o grupo de residuos diana (p.ej., residuos cargados como la Arg, Asp, His, Lys, y Glu) y ser reemplazan por un aminoácido neutro o cargado negativamente (más preferentemente la alanina o la polialanina) para modificar la interacción de los aminoácidos con el entorno acuoso que lo rodea dentro o fuera de la célula. Aquellos dominios que demuestran una sensibilidad funcional a las sustituciones, son reajustados introduciendo además otras variantes en los residuos de sustitución. Así, mientras que el sitio para la introducción de una variación de secuencia aminoacídica está predeterminado, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para optimizar la realización de una mutación en un sitio determinado, el cribado por alaninas o la mutagénesis aleatoria se realiza en el codón o región diana y a continuación se criban las variantes del ligando de Htk expresadas para la combinación óptima de actividad deseada.

25

Existen dos variables principales en la construcción de variantes de secuencia aminoacídica: la localización del sitio de mutación y la naturaleza de la mutación. Estas son variantes de las secuencias de la Figura 3, y pueden representar alelos naturales (que no requerirán manipulación del DNA del ligando de Htk) o formas mutantes predeterminadas generadas mediante mutación del DNA, para lograr un alelo o variante que no se halle en la naturaleza. Por lo general, la localización y la naturaleza de la mutación elegida dependerá de la característica del ligando de Htk a modificar. Obviamente, dichas variaciones que, por ejemplo, convierten el ligando en un ligando conocido de receptor proteintirosina quinasa no están incluidos dentro del ámbito de la presente invención.

30

Las delecciones de secuencia aminoacídica se hallan por lo general en el intervalo de 1-30 residuos, más preferentemente de 1-10 residuos y típicamente son contiguas. Las delecciones contiguas se generan normalmente en números pares de residuos, aunque delecciones de un sólo residuo o números impares también se hallan dentro del ámbito de la invención. Las delecciones pueden introducirse en regiones de baja homología entre el ligando de Htk y ligandos de Htk conocidos (que comparten la máxima identidad de secuencia con la secuencia aminoacídica del ligando de Htk humano) para modificar la actividad del ligando de Htk. Las delecciones del ligando de Htk en áreas de homología importante con las proteínas del ligando de Htk homólogo modificarán seguramente la actividad biológica del ligando de Htk de forma más significativa. El número de delecciones consecutivas se seleccionará en función del mantenimiento de la estructura terciaria del ligando de Htk en el dominio afectado, p.ej., hoja beta o hélice alfa.

35

40

Una variante delecional preferida es el ligando de Htk soluble aquí definido. Esta variante del ligando de Htk tiene los dominios transmembrana, y opcionalmente los intracelulares, delecionados mediante técnicas de generación de variantes delecionales.

45

Las inserciones de secuencia aminoacídica incluyen las fusiones amino y/o carboxi-terminales desde un residuo hasta polipéptidos que contienen un centenar o más residuos, así como inserciones intrasecuencia de residuos aminoacídicos sencillos o múltiples. Las inserciones intrasecuencia (es decir, las inserciones dentro de la secuencia del ligando de Htk maduro) pueden ser generalmente de 1 a 10 residuos, más preferentemente de 1 a 5, más preferentemente de 1 a 3. Las inserciones son preferentemente de números pares de residuos, pero no es imprescindible. Ejemplos de inserciones terminales incluyen el ligando de Htk con un residuo N-terminal de metionina, un artefacto de la expresión directa del ligando de Htk maduro en el cultivo de células recombinantes, y la fusión de una secuencia señal N-terminal de la molécula del ligando de Htk madura para facilitar la secreción del ligando de Htk maduro de los huéspedes recombinantes. Dichas secuencias señal se obtendrán generalmente de, y por tanto son homólogas a, las especies de células huésped destinadas. Las secuencias adecuadas incluyen el factor STII o el lpp para *E. coli*, el factor alfa o la invertasa de levaduras y las señales virales como gD de herpes para células de mamífero.

55

Otras variantes de inserción de la molécula del ligando de Htk incluyen la fusión con el extremo N- o C-terminal del ligando de Htk de los polipéptidos inmunogénicos, p.ej., los polipéptidos bacterianos como la beta-lactamasa o una enzima codificada por el locus *trp* de *E. coli*, o la proteína de levadura y las fusiones C-terminales con proteínas que tienen una vida media larga al igual que las regiones constantes de inmunoglobulina (y otras regiones de inmunoglobulina), la albúmina, o la ferritina, tal como se describe en la patente internacional WO 89/02922 publicada el 6 de Abril de 1989.

60

65

Un tercer grupo de variantes son las variantes de sustitución de aminoácidos. En estas variantes se ha eliminado por lo menos un residuo aminoacídico en la molécula del ligando de Htk y en su lugar se ha insertado un residuo

ES 2 264 127 T3

distinto. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen los sitios identificados como sitios activos del ligando de Htk y los sitios en donde los aminoácidos hallados en los análogos conocidos son esencialmente distintos en términos de volumen, carga, o hidrofobicidad de cadena lateral, pero en donde también existe un elevado grado de identidad de secuencia del sitio seleccionado en los ligandos de Htk de diversas especies animales. Otros sitios de interés son aquellos en los que residuos determinados del ligando de Htk obtenido de especies distintas son idénticos. Estos sitios, especialmente aquellos que se hallan dentro de una secuencia de al menos 3 sitios conservados de forma idéntica, se sustituyen de forma relativamente conservadora. Dichas sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios, denominados ejemplos de sustituciones en la Tabla 1, o como se describe más adelante respecto a las clases de aminoácidos, y luego se rastrean.

TABLA 1

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

Se lograron modificaciones importantes en función de la identidad inmunológica del ligando de Htk mediante selección de las sustituciones que difieran significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del armazón polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una configuración en hoja o en hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que ocurren de forma natural se dividen en grupos basados en las propiedades comunes de las cadenas laterales:

- (1) aminoácido hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) aminoácido hidrofílico neutro: cys, ser, thr
- (3) aminoácido ácido: asp, glu
- (4) aminoácido básico: asn, gln, his, lys, arg
- (5) residuos que influyen la orientación de la cadena lateral: gly, pro; y
- (6) aminoácidos aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservadoras implicarán el cambio de un miembro de una de estas clases por otro. Dichos residuos de sustitución también pueden introducirse en sitios de sustitución conservadores o, más preferentemente, en los sitios restantes (no-conservadores).

ES 2 264 127 T3

En una realización de la invención, es deseable inactivar uno o más sitios de corte de proteasas internos que están presentes en la molécula. Estos sitios se identifican mediante inspección de la secuencia aminoacídica, en el caso del residuo tripsina, p.ej., por un residuo arginil o lisinil. Cuando se identifican los sitios de corte de proteasas, se inactivan mediante corte proteolítico sustituyendo el residuo diana por otro residuo, preferentemente un residuo básico como el residuo glutamina o uno hidrofóbico como la serina; delecionando el residuo; o insertando un residuo prolil inmediatamente después del residuo.

En otra realización, cualquiera de los residuos distintos al residuo de inicio metionil de la secuencia señal, o cualquier residuo localizado entre los tres residuos N- o C-terminal de cada uno de los residuos metionil, se sustituye por otro residuo (preferentemente de acuerdo con la Tabla 1) o se deleciona. Alternativamente, se insertan de 1-3 residuos adyacentes a dichos sitios.

También puede sustituirse cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación propia del ligando de Htk, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir las uniones aberrantes.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes de secuencia aminoacídica del ligando de Htk se preparan mediante diversos procedimientos conocidos en la materia. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia aminoacídica naturales) o la preparación mediante oligonucleótidos o mutagénesis (dirigida), PCR-mutagénesis, y mutagénesis por casete de una variante o una versión variante del ligando de Htk preparada con anterioridad.

La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un procedimiento preferido para preparar variantes de sustitución, deleción e inserción del DNA del ligando de Htk. Esta técnica es bien conocida en la materia, tal como se describe por Adelman y col., DNA, 2:183 (1983). En resumen, el DNA del ligando de Htk se altera hibridando un oligonucleótido que codifica una mutación deseada con un molde de DNA, en donde el molde se halla en la forma de cadena sencilla de un plásmido o bacteriófago que contiene la secuencia de DNA inalterada o nativa del ligando de Htk. Después de la hibridación, se utiliza una DNA polimerasa para sintetizar una segunda cadena complementaria que incorporará el cebador oligonucleotídico, y codificará la alteración seleccionada en el DNA del ligando de Htk.

Por lo general, se utilizan oligonucleótidos de al menos 25 nucleótidos de longitud. Un oligonucleótido óptimo tendrá de 12 a 15 nucleótidos que serán completamente complementarios al molde en cada lado del o los nucleótidos codificantes de la mutación. Ello asegura que el oligonucleótido hibridará de forma adecuada con una molécula de DNA molde de cadena sencilla. Los oligonucleótidos se sintetizan fácilmente utilizando técnicas conocidas en la materia como las descritas por Crea y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5765 (1978).

El molde de DNA puede generarse por aquellos vectores que o bien se derivan de vectores del bacteriófago M13 (disponibles comercialmente como el M13mp18 y el M13mp19), o aquellos que contienen un origen de replicación de fago de cadena sencilla tal como se describe por Viera y col., Meth. Enzymol. 153:3 (1987). De este modo, el DNA a mutar se puede insertar en uno de estos vectores para generar el molde adecuado. La producción del molde de cadena sencilla se describe en las Secciones 4.21-4.41 de Sambrook y col., *supra*.

Alternativamente, el molde de DNA de cadena sencilla puede generarse desnaturalizando el DNA plasmídico de cadena doble (u otro) mediante técnicas estándares.

Para la alteración de la secuencia de DNA nativo (para generar las variantes de secuencia aminoacídica, por ejemplo), el oligonucleótido se hibrida con el molde de cadena sencilla en condiciones de hibridación adecuadas. Una enzima polimerizante del DNA, generalmente el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, se añade para sintetizar la cadena complementaria del molde utilizando el oligonucleótido como un cebador para la síntesis. Se forma una molécula de heterodúplex de modo que una cadena de DNA codifica la forma mutada del ligando de Htk, y la otra cadena (el molde original) codifica la secuencia inalterada o nativa del ligando de Htk. Esta molécula heterodúplex se transforma en una célula huésped adecuada, generalmente un procarionte como *E. coli*, JM101. Después de crecer las células, éstas se siembran en placas de agarosa y se realiza un cribado utilizando el cebador oligonucleotídico marcado radioactivamente con P³² para identificar las colonias bacterianas que contienen el DNA mutado. A continuación, la región mutada se extrae y se coloca en un vector adecuado para la síntesis proteica, generalmente el vector de expresión del tipo utilizado comúnmente para la transformación de un huésped adecuado.

El procedimiento descrito anteriormente puede modificarse con el fin de generar una molécula heterodúplex en donde ambas cadenas del plásmido contengan la(s) mutación(es). Las modificaciones son las siguientes: el oligonucleótido de cadena sencilla se anilla con el molde de cadena sencilla tal como se describió anteriormente. Se combina una mezcla de los tres desoxiribonucleótidos, desoxiriboadenosina (dATP), desoxiriboguanosina (dGTP) y desoxiribotimidina (dTTP) con un complejo tio-desoxiribocitosina denominado dCTP-(aS) (disponibles por Amersham Corporation). Esta mezcla se añade al complejo molde-oligonucleótido. Tras la adición de la DNA polimerasa a la mezcla, se genera una cadena de DNA idéntica al molde excepto por las bases mutadas. Además, esta nueva cadena de DNA contendrá dCTP (aS) en lugar de dCTP, que sirve para protegerlo de la digestión por endonucleasas de restricción.

Después de que la cadena molde del heterodúplex de cadena doble sea mellada por una enzima de restricción adecuada, la cadena molde puede digerirse con la nucleasa ExoIII u otra nucleasa adecuada que contenga la diana o

ES 2 264 127 T3

dianas a mutar. La reacción se para a continuación para dejar una molécula que es sólo parcialmente de cadena sencilla. Un homodúplex de DNA de cadena doble completa se forma a continuación utilizando la DNA polimerasa en presencia de los 4 desoxiribonucleótidos trifosfatos, ATP y DNA ligasa. Esta molécula homodúplex puede transformarse en una célula huésped adecuada como *E. coli* JM101, tal como se describió anteriormente.

5 El DNA que codifica los mutantes del ligando de Htk con más de un aminoácido a sustituir puede generarse de diversas maneras. Si los aminoácidos están localizados juntos en una cadena polipeptídica, se pueden mutar simultáneamente con un oligonucleótido que codifique las sustituciones aminoacídicas deseadas. En cambio si los aminoácidos se localizan a cierta distancia unos de otros (separados por más de 10 aminoácidos), es más difícil generar
10 un solo oligonucleótido que codifique todos los cambios deseados. En su lugar, es posible utilizar uno o de los dos procedimientos alternativos.

En el primer procedimiento, se genera por separado un oligonucleótido para cada uno de los aminoácidos a sustituir. Los oligonucleótidos se anillan a continuación con el DNA molde de cadena sencilla de forma simultánea, y de esta
15 manera la segunda cadena de DNA que se sintetiza a partir del molde codificará todas las sustituciones aminoacídicas deseadas.

El procedimiento alternativo, implica dos o más tandas de mutagénesis para producir el mutante deseado. La primera tanda es tal como se describe para los mutantes sencillos: se utiliza DNA de tipo salvaje como molde, un
20 oligonucleótido que codifica la primera sustitución o sustituciones aminoacídicas deseadas se anilla con este molde, y a continuación se genera la molécula de DNA heterodúplex. La segunda tanda de mutagénesis utiliza el DNA mutado producido en la primera tanda de la mutagénesis como molde. Así, el molde ya contiene una o más mutaciones. El oligonucleótido que codifica la(s) sustitución(es) aminoacídica(s) deseada(s) adicional(es) se anilla a continuación con este molde, con lo que la cadena resultante de DNA codifica ahora las mutaciones procedentes de ambas tandas
25 de mutagénesis, la primera y la segunda. Este DNA resultante puede utilizarse como molde en una tercera tanda de mutagénesis y así sucesivamente.

La mutagénesis por PCR también es adecuada para producir variantes de aminoácidos del ligando de Htk. Mientras que la discusión siguiente hace referencia al DNA, se entenderá que la técnica también halla aplicaciones con el
30 RNA. La técnica de PCR hace referencia al procedimiento siguiente (véase Erlich, Science, 252:1643-1650 (1991), el capítulo de R. Higuchi, p. 61-70). Cuando se utilizan cantidades pequeñas de DNA molde como material de partida en una PCR, se pueden utilizar cebadores que difieran ligeramente en la secuencia de la región correspondiente del DNA molde como material de partida en una PCR. Los cebadores que difieren ligeramente en la secuencia de la región correspondiente del DNA molde pueden utilizarse para generar cantidades relativamente grandes de un fragmento
35 de DNA que difiera de la secuencia molde sólo en las posiciones en donde los cebadores difieren con el molde. Para introducir una mutación en un DNA plasmídico, uno de los cebadores se diseña para solapar la posición de la mutación y para contener la mutación; la secuencia del otro cebador debe ser idéntica a un tramo de la secuencia de la cadena opuesta del plásmido, pero esta secuencia puede localizarse en cualquier sitio a lo largo del DNA plasmídico, sin embargo es preferible que la secuencia del segundo cebador se localice en los 200 nucleótidos desde el inicio, de modo que al final pueda fácilmente secuenciarse toda la región amplificada de DNA flanqueada por los cebadores. La amplificación por PCR utilizando un par de cebadores como el descrito da como resultado una población de fragmentos de DNA que difieren en la posición de la mutación especificada por el cebador, y posiblemente en otras posiciones, ya que durante el copiado del molde se pueden producir errores.

45 Si el cociente del molde respecto a producto es extremadamente bajo, la mayor parte del producto de fragmentos de DNA incorpora la(s) mutación(es) deseada(s). Este material producido se utiliza para reemplazar la región correspondiente en el plásmido que sirve como molde de PCR utilizando tecnología del DNA estándar. Pueden introducirse simultáneamente mutaciones en posiciones separadas mediante un segundo cebador mutante, o realizando una segunda PCR con cebadores mutantes distintos y ligando los dos fragmentos de PCR resultantes simultáneamente con el
50 fragmento del vector en una ligación de tres (o más) etapas.

En un ejemplo específico de mutagénesis por PCR, el DNA plasmídico del molde (1 μ g) se lineariza mediante digestión con una endonucleasa de restricción que tiene una diana única de reconocimiento en el DNA plasmídico fuera de la región a amplificar. De este material, se añaden 100 ng a una mezcla de PCR que contiene el tampón de
55 PCR y los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos, tal como se proporcionan por el equipo GeneAmp[®] (obtenidos de Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT y Emeryville, CA), y 25 pmoles de cada uno de los cebadores oligonucleotídicos, a un volumen final de 50 μ l. La mezcla de reacción se cubre con 35 μ l de aceite mineral. La mezcla de reacción se desnaturaliza durante 5 minutos a 100°C, se coloca brevemente en hielo y luego se añade 1 μ l de la DNA polimerasa de *Thermus Aquaticus* (Taq) (5 unidades/ μ l, obtenida de Perkin-Elmer Cetus) debajo de la capa de aceite mineral.
60 La mezcla de reacción se coloca en un Termociclador de DNA (de Perkin-Elmer Cetus) programado de la manera siguiente:

2 min, 55°C

65 30 s, 72°C, luego 19 ciclos de lo siguiente:

30 s, 94°C

30 s, 55°C y

30 s, 72°C

5 Al término del programa, el vial de reacción se retira del termociclador y la fase acuosa se transfiere a un nuevo vial, se extrae con fenol/cloroformo (50:50) y se precipita con etanol. A continuación se recupera el DNA mediante procedimientos estándares y se somete este material a tratamientos adecuados para la inserción en un vector.

Otro procedimiento para la preparación de variantes, la mutagénesis de casete, se basa en la técnica descrita por
 10 Wells y col., Gene, 34:315 (1985). El material de partida es el plásmido (u otro vector) que contenga el DNA del ligando de Htk a mutar. En primer lugar, se identifican los codones en el DNA del ligando de Htk a mutar. Debe existir una diana única de endonucleasa de restricción en cada lado del sitio(s) de mutación. Si no existieran dianas de restricción, se podrían generar mediante el procedimiento de la mutagénesis mediada por oligonucleótidos para introducir las mutaciones en sitios adecuados en el DNA del ligando de Htk. Después de haber introducido
 15 las dianas de restricción en el plásmido, éste se corta por dichas dianas para linearizarlo. Utilizando procedimientos estándares, se sintetiza un oligonucleótido de cadena doble que codifica la secuencia del DNA entre las dianas de restricción, pero que contiene la mutación o mutaciones deseadas. Las dos cadenas se sintetizan separadamente y luego se hibridan juntas mediante técnicas estándares. El oligonucleótido de cadena doble se denomina casete. Este casete se diseña para tener extremos 3' y 5' compatibles con los extremos del plásmido linearizado, de modo
 20 que pueda ligarse directamente en el plásmido. Este plásmido contiene ahora la secuencia de DNA del ligando de Htk.

C. Inserción de ácido nucleico en el vector replicable

25 El ácido nucleico (p.ej., cDNA o DNA genómico) que codifica el ligando de Htk nativo o variante se inserta en un vector replicable para su posterior clonaje (amplificación del DNA) o para la expresión. En la actualidad existe una gran diversidad de vectores disponibles. Los componentes del vector incluyen por lo general, pero no se limitan a, uno o más de los componentes siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor, y una secuencia de finalización de la transcripción.

30

(I) Componente secuencia señal

Los ligandos de Htk de la presente invención pueden producirse de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que preferentemente es una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros.
 35 Por lo general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del DNA del ligando de Htk que se inserta en el vector. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que pueda ser reconocida y procesada por la célula huésped. Para las células huésped procariotas que no reconocen ni procesan la secuencia señal del ligando de Htk, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal seleccionada, por ejemplo, a partir del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o los líderes de la enterotoxina estable al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal nativa puede sustituirse por, p.ej., el líder de la invertasa de levaduras, el líder del factor alfa (incluyendo los líderes del factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la patente americana U.S. 5.010.182, publicada el 23 de Abril de 1991), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (patente europea EP 362, publicada el 4 de Abril de 1990), o la secuencia señal descrita en
 45 la patente internacional WO 90/13646 publicada el 15 de Noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero, la utilización de la secuencia señal nativa (p.ej., la presecuencia del ligando de Htk que normalmente dirige la secreción del ligando de Htk de células humanas *in vivo*) es satisfactoria, aunque otras secuencias señal de mamíferos también pueden ser adecuadas, como las secuencias señal de otros ligandos de Htk de animales, y las secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma o especies relacionadas, así como también los líderes secretores, por ejemplo, la
 50 señal gD del herpes simplex.

El DNA para dicha región precursora se liga en la misma pauta de lectura con el DNA que codifica el ligando de Htk maduro.

55 (II) Componente origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como de clonaje contienen una secuencia de ácido nucleico que permite la replicación del vector en una o más células huéspedes seleccionadas. Por lo general, en los vectores de clonaje dicha secuencia es aquella que permite la replicación del vector independientemente al DNA del cromosoma del huésped,
 60 e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónomas. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de Gram negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras, y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonaje en células de mamífero. Por lo general, el componente origen de replicación no es necesario para vectores de expresión en mamíferos, el origen de SV40 puede utilizarse de
 65 forma típica únicamente porque contiene el promotor temprano).

La mayoría de los vectores de expresión son vectores "lanzadera", es decir, son capaces de replicarse en al menos una clase de organismos pero pueden transfectarse en otro organismo para la expresión. Por ejemplo, un vector se

clona en *E. coli* y luego el mismo vector se transfecta en las células de levadura o de mamífero para la transfección, incluso si no es capaz de replicarse independientemente del cromosoma de la célula huésped.

El DNA también puede amplificarse mediante inserción en el genoma del huésped. Esto se logra utilizando especies de *Bacillus* como huéspedes, por ejemplo, incluyendo en el vector una secuencia que es complementaria con una secuencia hallada en el DNA genómico de *Bacillus*. La transfección de *Bacillus* con este vector da como resultado la recombinación homóloga con el genoma y la inserción del DNA del ligando de Htk. Sin embargo, la recuperación del DNA genómico que codifica el ligando de Htk es más compleja que la de un vector replicado exógenamente porque la digestión con enzimas de restricción es necesaria para cortar el DNA del ligando de Htk.

(III) Componente gen de selección

Los vectores de expresión y clonaje deberían contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de las células huésped transformadas que crecen en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contienen el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, p.ej., ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, (c) aportan nutrientes críticos no disponibles a partir del medio complejo, p.ej., el gen que codifica la racemasa de la D-alanina para *Bacilli*.

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para parar el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que se han transformado satisfactoriamente con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y por ello sobreviven al régimen de selección. Ejemplos de dicha selección dominante utilizan fármacos como la neomicina (Southern y col., J.Molec. Appl. Genet. 1:327 [1982]), el ácido micofenólico (Mulligan y col., Science 20:1422 [1980]) o la higromicina (Sugden y col., Mol. Cell. Biol., 5:410-413 [1985]). Los tres ejemplos proporcionados más arriba utilizan genes bacterianos bajo el control eucariótico para convertir la resistencia al fármaco adecuado G418 o neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico), o higromicina, respectivamente.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para incorporar el ácido nucleico del ligando de Htk, como el DHFR o la timidina quinasa. Los transformantes de células de mamífero se someten a presión de selección de modo que únicamente los transformantes adaptados sobreviven al haber incorporado el marcador. La presión de selección se impone al cultivar los transformantes en condiciones en las que la concentración del agente de selección en el medio se cambia de forma sucesiva, conduciendo en consecuencia a la amplificación tanto del gen de selección como del DNA que codifica el ligando de Htk. La amplificación es el proceso por el que los genes en mayor demanda de producción de una proteína crítica para el crecimiento están repetidos en tándem dentro de los cromosomas de generaciones sucesivas de células recombinantes. Cantidades aumentadas de ligando de Htk se sintetizan a partir del DNA amplificado. Otros ejemplo de genes de amplificación incluyen los genes de la metalotioneína-I y II, preferentemente las metalotioneínas de primates, la adenosina deaminasa, la ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección se identificaron en primer lugar cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped adecuada cuando se utiliza el DHFR es la línea celular de ovario de hámster Chino (CHO) deficiente en la actividad DHFR, preparada y propagada tal como se describió por Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980). Las células transformadas se exponen a continuación a niveles crecientes de metotrexato. Ello conduce a la síntesis de múltiples copias del gen DHFR y, consecuentemente, múltiples copias del otro DNA incluido en los vectores de expresión, como el DNA que codifica el ligando de Htk. La técnica de amplificación puede utilizarse con cualquier huésped adecuado, p.ej., ATCC o CCL61 CEO-K1, a pesar de la presencia de DHFR endógeno, por ejemplo, se utiliza un gen DHFR mutante que es altamente resistente a Mtx.

Alternativamente, células huésped [en particular huéspedes que contienen DHFR endógeno] transformadas o co-transformadas con secuencias de DNA que codifican el ligando de Htk, la proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable como la aminoglicósido-3'-fosfotransferasa (APH) puede seleccionarse mediante crecimiento celular en un medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable como un antibiótico aminoglicosídico, p.ej., la kanamicina, la neomicina, o G418. Véase la patente americana U.S. 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para utilizar es el gen *trp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7 (Stinchcomb y col., Nature 282:39 [1979]; Kingsman y col., Gene 7:141 [1979]; o Tschemper y col., Gene 10:157 [1980]). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cadena mutante de levaduras carentes de la capacidad de sintetizar triptófano, por ejemplo, ATCC 44706 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85:12 [1977]). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de células huésped de levaduras proporciona un entorno adecuado para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano. De forma similar, las cepas de levaduras deficientes *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan por plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

Además, los vectores derivados del plásmido pKD1 circular de 1,6 μ m pueden utilizarse para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. Bianchi y col., Curr. Genet. 12:185 (1987). Más recientemente, un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternera recombinante se publicó para *K. lactis*. Van den Berg, Bio/Technology 8:135 (1990). También se han descrito los vectores multicopias de expresión estable para la secreción

de seroalbúmina humana recombinante por cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer y col., *Bio/Technology* 9:968-975 (1991).

(IV) *Componente promotor*

5

Los vectores de expresión y clonaje contienen por lo general un promotor que se reconoce por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico del ligando de Htk. Los promotores son secuencias no transcritas localizadas cadena arriba (5') del codón de inicio de un gen estructural (de generalmente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de una secuencia de ácido nucleico particular, como la secuencia de ácido nucleico del ligando de Htk, con la que está unido operativamente. Dichos promotores se clasifican en dos categorías, los inducibles y los constitutivos. Los promotores inducibles son promotores que inician niveles aumentados de transcripción a partir del DNA bajo su control en respuesta a algunos cambios en las condiciones del cultivo, p.ej., la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura. En la actualidad, se conocen diversos promotores reconocidos por diferentes células huéspedes potenciales. Estos promotores se unen operativamente al DNA que codifica el ligando de Htk eliminando el promotor del DNA original mediante digestión con enzimas de restricción e inserción de la secuencia promotora aislada en el vector. Se pueden utilizar tanto la secuencia promotora del ligando de Htk nativas como muchos otros promotores heterólogos para amplificar directamente y/o expresar el DNA del ligando de Htk. Sin embargo, los promotores heterólogos son los preferidos, ya que permiten una mayor transcripción y rendimientos superiores del ligando de Htk en comparación con el promotor del ligando de Htk nativo.

20

Los promotores adecuados para utilizar con los huéspedes procariotas incluyen los sistemas de promotores de la β -lactamasa y la lactosa (Chang y col., *Nature* 275:615 [1975]; y Goeddel y col., *Nature* 281:544 [1979]), la fosfatasa alcalina, un sistema de promotor del triptófano (trp) (Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 [1980] y la patente europea EP 36.776) y los promotores híbridos como el promotor de la tac (deBoer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:21-25 [1983]). Sin embargo, también adecuados son otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, lo que permite a un experto en la materia ligarlos operativamente al DNA que codifica el ligando de Htk (Sienbenlist y col., *Cell* 20:269 [1980]) utilizando engarces o adaptadores para proporcionar cualquier diana de restricción necesaria. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contienen una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al DNA que codifica el ligando de Htk.

30

Las secuencias del promotor para los organismos eucariotas son conocidas. Virtualmente, todos los genes tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25 a 30 bases cadena arriba del sitio de inicio de la transcripción. Otra secuencia que se halla 70-80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CXCAAT en donde X puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas se halla una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en los vectores de expresión eucariotas.

35

Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para utilizar con huéspedes de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman y col., *J. Biol. Chem* 255:2073 [1980]) u otras enzimas glicolíticas (Hess y col., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7:149 [1968]; y Holland, *Biochemistry* 17:4900 [1978]), como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la triosafosfato isomerasa, la fosfoglucoasa isomerasa y la glucoquinasa.

40

Otros promotores de levaduras, que son inducibles por promotores tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, la isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa y las enzimas responsables de la utilización de la maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para utilizar en la expresión de levaduras se describen además en Hitzeman y col., patente europea EP 73.657A. Los intensificadores de la transcripción también se utilizan de forma ventajosa con los promotores de levaduras.

45

La transcripción del ligando de Htk de vectores en células huésped de mamíferos se controla, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus como el virus del poliovirus (patente inglesa UK 2.211.504, publicada el 5 de Julio de 1989), adenovirus (como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y más preferentemente el Virus 40 del Simio (SV40), de promotores heterólogos de mamífero, p.ej., el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, y del promotor normalmente asociado con la secuencia del ligando de Htk, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

55

Los promotores temprano y tardío del virus de SV40 se obtienen de forma adecuada como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen viral de replicación de SV40. Fiers y col., *Nature* 273:113 (1978); Mulligan y Berg, *Science* 209:1422-1427 (1980); Pavlakis y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7398-7402 (1981). El promotor inmediatamente temprano del citomegalovirus humano se obtiene de forma adecuada como un fragmento de restricción HindIII. Greenaway y col., *Gene* 18: 355-360 (1982). Un sistema para la expresión del DNA en huéspedes de mamífero que utiliza el virus del papiloma bovino como un vector se describe en la patente americana U.S. 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente americana U.S. 4.601.978. Véase también Gray y col., *Nature* 295:503-508 (1982) sobre la expresión de un cDNA que codifica el interferón inmune en células de

60

65

mono; Reyes y col., Nature 297:598-601 (1982) sobre la expresión del cDNA del β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus herpes simplex; Canaani y Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:5166-5170 (1982) sobre la expresión del gen del interferón β 1 en células de ratón y conejo cultivadas; y Goman y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6777-6781 (1982) sobre la expresión de secuencias CAT bacterianas en células de riñón de mono CV-1, fibroblastos de embrión de pollo, células de ovario de hámster chino, células HeLa y células NIH-3T3 utilizando la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

(V) *Elemento componente intensificador*

La transcripción de un DnA que codifica el ligando de Htk de la presente invención por los eucariotas superiores a menudo se intensifica mediante la inserción de una secuencia intensificadora de la transcripción en el vector. Los intensificadores son elementos del DNA que actúan en cis, de aproximadamente 10 a 300 pb, y que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los intensificadores son relativamente independientes en su orientación y posición, se han hallado en el extremo 5' (Laimins y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:993 [1981]) y en 3' (Lusky y col., Mol. Cell Biol., 3:1108 [1983]) respecto a la unidad de transcripción, dentro de un intrón (Banerji y col., Cell 33:729 [1983]), así como dentro de la propia región codificante (Osborne y col., Mol. Cell. Bio. 4:1293 [1984]). En la actualidad, se conocen muchas secuencias intensificadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, se utilizará de forma general un intensificador de un virus de célula eucariota. Por ejemplo, el intensificador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, el intensificador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, y los intensificadores del adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre los elementos intensificadores para la activación de promotores eucariotas. El intensificador puede ajustarse en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia codificante del ligando de Htk, pero localizada preferentemente en 5' del promotor.

(VI) *Componente de finalización de la transcripción*

Los vectores de expresión utilizados en las células eucariotas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para la estabilización del mRNA. Dichas secuencias están disponibles a partir de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de DNAs o cDNAs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos que se transcriben como fragmentos poliadenilados en la fracción no traducida del mRNA que codifica el ligando de Htk.

(VII) *Construcción y análisis de los vectores*

La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes enunciados anteriormente utiliza técnicas de ligación estándares. Los plásmidos aislados o fragmentos de DNA se cortan, se convierten sus extremos en romos, y se religan en la forma deseada para generar los plásmidos deseados.

Para confirmar que las secuencias son correctas en los plásmidos construidos, se utilizan mezclas de ligación para transformar la cepa 294 de *E. coli* (ATCC 31.446) y los transformantes satisfactorios se seleccionan por su resistencia a la ampicilina o tetraciclina cuando sea adecuado. Los plásmidos de los transformantes se preparan, analizan mediante digestión con endonucleasas de restricción, y/o se secuencian por el procedimiento de Messing y col, Nucleic Acids Res., 9:309 (1981) o por el procedimiento de Maxam y col., Methods in Enzymology 65:499 (1980).

(VIII) *Vectores de expresión transitoria*

Los vectores de expresión son de especial utilidad en la práctica de la presente invención ya que proporcionan la expresión transitoria en las células de mamíferos del DNA que codifica el ligando de Htk. Por lo general, la expresión transitoria implica la utilización de un vector de expresión que sea capaz de replicarse eficientemente en una célula huésped, para que dicha célula huésped acumula muchas copias del vector de expresión, y a la vez sintetice niveles elevados de un polipéptido deseado codificado por el vector de expresión. Sambrook y col., *supra*, pp. 16.17-16.22. Los sistemas de expresión transitoria, que comprenden un vector de expresión adecuado y una célula huésped, permiten la identificación positiva conveniente de los polipéptidos codificados por los DNAs clonados, así como el rastreo rápido de dichos polipéptidos por sus propiedades biológicas o fisiológicas. Por ello, los sistemas de expresión transitoria son de particular utilidad en la invención con propósitos de identificar análogos y variantes del ligando de Htk que son ligandos de Htk biológicamente activos.

(IX) *Ejemplos adecuados de vectores de células de vertebrados*

Otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del ligando de Htk en el cultivo de células de vertebrados se describe en Gething y col., Nature 293:620-625 (1981); Mantel y col., Nature 281:40-46 (1979); Levinson y col., patente europea EP 117.060; y patente europea EP 117.058. Un plásmido de especial utilidad para la expresión de células de mamífero en cultivo del ligando de Htk es el pRK5 (patente europea EP 307.247) o pSV16B (PCT pub. No. patente internacional WO 91/08291, publicada el 13 de Junio de 1991).

D. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para el clonaje o la expresión de vectores son las procariotas, levaduras o eucariotas superiores descritas anteriormente. Las procariotas adecuadas para este propósito incluyen las eubacterias, como los organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo. Las enterobacteriáceas como *Escherichia*, p.ej., *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, p.ej., *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, p.ej., *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli* como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (p.ej., *B. licheniformis* 41P descrito en la patente DD 26-6.710, publicada el 12 de Abril de 1989). *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Un huésped de clonaje de *E. coli* preferido es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque otras cepas como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) son adecuados. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferido porque es una cepa común para las fermentaciones del producto de DNA recombinante. Preferentemente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para tener una mutación genética en los genes que codifican proteasas, ejemplos de dichos huéspedes incluyen la cepa W3110 de *E. coli* 27C7. El genotipo completo de 27C7 es *tonAΔ ptr3 phoAΔE15 (argF-lac)169 ompTΔ degP41karf*. La cepa 27C7 se depositó el 30 de Octubre de 1991 en el American Type Culture Collection como ATCC No. 55.244. Alternativamente, se puede utilizar la cepa de *E. coli* que tiene una proteasa periplásmica mutante se describe en la patente americana U.A. 4.946.783, publicada el 7 de Agosto de 1990. También son adecuados los procedimientos de clonaje, p.ej., PCR u otras reacciones de la polimerasa de ácidos nucleicos.

Además de los microbios procariotas, los eucariotas como los hongos filamentosos o las levaduras son huéspedes de clonaje o expresión adecuados para los vectores que codifican el ligando de Htk. *Saccharomyces cerevisiae*, o la levadura del pan, es el microorganismo huésped eucariota más comúnmente utilizado. Sin embargo, otros genes, especies y cepas están disponibles y son de utilidad en la presente invención, como *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature 290:140 [1981]; patente europea EP 139.383, publicada el 2 de Mayo de 1985); huéspedes de *Kluyveromyces* (patente americana U.S. 4.943.529; Fler y col., *supra*) como, p.ej., *K. lactis* [MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 737 (1983)], *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., *supra*), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* [patente europea EP 402.226]; *Pichia pastoris* [patente europea EP183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol. 28:265-278 [1998]]; *Candida*; *Trichoderma reesia* [patente europea EP 244.234]; *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5259-5263 [1979]); *Schawanniomyces* como *Schawanniomyces occidentalis* (patente europea EP 394.538, publicada el 31 de Octubre de 1990); y hongos filamentosos como, p.ej., *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (patente internacional WO 91/00357 publicado el 10 de Enero de 1991), y huéspedes de *Aspergillus* como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-289 [1983]; Tilburn y col., Gene 26:205-221 [1983]; Yelton y col.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J. 4:475-479 [1985]).

Las células huésped adecuadas para la expresión del ligando de Htk glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Dichas células huésped son capaces de realizar procesamientos complejos y actividades de glicosilación. En principio, cualquier cultivo de célula eucariótica superior es manejable, bien sea un cultivo de células de vertebrados como de invertebrados. Ejemplos de células de invertebrados incluyen las células de plantas e insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células huésped de insectos permisivas como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Véase, p.ej., Luckow y col., Bio/Technology 6:47-55 (1988); Miller y col., en Genetic Engineering, Setlow y col., eds., vol. 8 (Plenum Publishing, 1986), pp. 277-279; y Maeda y col., Nature 315:592-594 (1985). Diversas cepas virales para la transfección son de disponibilidad pública, p.ej., la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden utilizarse como el virus de la presente invención, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Se pueden utilizar como huéspedes cultivos de células vegetales como el algodón, el maíz, la patata, la soja, la petunia, el tomate y el tabaco. En general, las células de plantas se transfectan por incubación con ciertas cepas de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, que ha sido previamente manipulado para contener el DNA del ligando de Htk. Durante la incubación del cultivo de células vegetales con *A. tumefaciens*, el DNA que codifica el ligando de Htk se transfiere al huésped de células vegetales al transfectarse, y en condiciones adecuadas expresará el DNA del ligando de Htk. Además, las secuencias reguladoras y señal compatibles con las células vegetales están disponibles, como por ejemplo el promotor de la nopalina sintasa y las secuencias señal de poliadenilación. Depicker y col., J. Mol. Appl. Gen. 1:561 (1982). Además, los segmentos de DNA aislados de la región cadena arriba del gen 780 del T-DNA son capaces de activar o aumentar la transcripción de genes que pueden expresarse en plantas en el tejido de la planta que contenga el DNA recombinante, véase la patente europea EP 321.196, publicada el 21 de Junio de 1989.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados, y la propagación de células (cultivo de tejidos) se ha convertido en una rutina en los últimos años (Tissue Culture, Academic Press, Kruse y Patterson, editores [1973]). Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero de utilidad son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651; la línea de riñón embrional humano (células 293 o células subclonadas para su crecimiento en el cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen. Virol. 36:59 [1977]); células de riñón de bebé hámser (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámser chino/- DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 [1980]); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 [1980]); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 79); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células

de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 3883:44-68 [1982]); células FS4; y la línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped se transfectan y transforman preferentemente con los vectores de expresión y clonaje de esta invención y se cultivan en medio nutritivo convencional modificado de forma conveniente para la inducción de promotores, selección de transformantes o amplificación de los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección hace referencia a la incorporación de un vector de expresión por una célula huésped independientemente de que se exprese cualquier secuencia. Numerosos procedimientos de transfección son conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, el método del CaPO_4 y la electroporación. Una transfección satisfactoria se reconoce por lo general cuando se manifiesta cualquier indicación de la operabilidad de este vector en la célula huésped.

La transformación hace referencia a la introducción de DNA en un organismo de modo que el DNA sea replicable, bien como un elemento extracromosómico o como un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándares adecuadas a dichas células. El tratamiento del calcio que utiliza cloruro cálcico, tal como se describe en la sección 1.82 de Sambrook y col., *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariontas u otras células que contienen barreras celulares. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células de plantas, tal como se describe por Shaw y col., Gene 23:315 (1983) y la patente internacional 89/0589 publicada el 29 de Junio de 1989. Además, las plantas pueden transfectarse mediante tratamiento por ultrasonidos tal como se describe en la patente internacional WO 91/00538 publicada el 10 de Enero de 1991.

Para las células de mamífero carentes de dichas paredes celulares, es preferible el procedimiento de la precipitación de fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transformaciones del sistema de células huésped de mamífero se ha descrito por Axel en la patente americana U.S. 4.399.216, publicada el 16 de Agosto de 1983. La transformación en levaduras se lleva a cabo de forma característica de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen y col., J. Bact. 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden utilizarse otros procedimientos para la introducción del DNA en las células, como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o los policones, p.ej., el polibreno, la poliornitina, etc. Para técnicas diversas de transformación de células de mamífero, véase Keown y col., Methods in Enzymology (1989), Keown y col., Methods in Enzymology 185:527-537 (1990), y Mansour y col., Nature 336:348-352 (1988).

E. Cultivo de células huésped

Las células procariontas utilizadas para producir el polipéptido del ligando de Htk de la presente invención se cultivan en medios adecuados tal como se describe en Sambrook y col., *supra*.

Las células huésped de mamífero utilizadas para producir el ligando de Htk de la presente invención pueden cultivarse en diversos medios. Los medios disponibles comercialmente como el Ham F10 (Sigma), el *Minimal Essential Medium* (MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma), y el *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) son adecuados para el cultivo de células huésped. Además, cualquier otro medio descrito en Ham y Wallace, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y Sato, Anal. Biochem. 102:255 (1980), patentes americanas U.S. 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, o 4.560.655; patentes internacionales WO 90/03430, WO 87/00195; patente americana U.S. 30.985, o patente americana U.S. 5.122.469, cuyas descripciones se han incorporado en las referencias, pueden utilizarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede suplementarse, según sea necesario, con hormonas y/o otros factores de crecimiento (como la insulina, la transferrina, o el factor de crecimiento epitelial), sales (como el cloruro sódico, calcio, magnesio, y fosfato), tampones (como el HEPES), nucleósidos (como la adenosina, timidina), antibióticos (como el fármaco GentamicinaTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes generalmente a concentraciones finales del orden micromolar), y glucosa u otra fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también puede incluirse a concentraciones adecuadas según el criterio del experto en la materia. Las condiciones de cultivo, como la temperatura, pH y similar, son las previamente utilizadas con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para un experto en la materia.

Por lo general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para la maximización de la productividad de cultivos de células de mamífero pueden hallarse en el *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed., IRL Press, 1991.

Las células huésped referidas en esta descripción abarcan las células en cultivo, así como las células de un huésped animal.

F. Detección de la amplificación/expresión génicas

La amplificación y/o expresión pueden cuantificarse directamente en una muestra, por ejemplo, mediante transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción del mRNA (Thomas,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205 [1980]), transferencia de mancha (análisis de DNA), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada adecuadamente, basada en las secuencias proporcionadas aquí. Pueden utilizarse diversos marcajes, siendo los más comunes los radioisótopos, en particular el P³². Sin embargo, pueden utilizarse otras técnicas, como la utilización de nucleótidos modificados con biotina para la introducción en un polinucleótido. La biotina sirve a continuación como el sitio de unión para la avidina o anticuerpos, que pueden marcarse con una amplia variedad de marcajes, como los radionúclidos, los fluorocromos, las enzimas o similares. Alternativamente, se pueden utilizar los anticuerpos para reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de DNA, dúplex de RNA y dúplex de híbridos DNA-RNA o DNA-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y se puede llevar a cabo el ensayo si el dúplex se une a una superficie, de modo que tras la formación del dúplex en la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

La expresión génica, puede cuantificarse, alternativamente mediante procedimientos inmunológicos, como la tinción inmunohistoquímica de las secciones del tejido y el ensayo del cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Con las técnicas de tinción inmunohistoquímica, se prepara una muestra de células, generalmente mediante deshidratación y fijación, seguido por la reacción con anticuerpos marcados específicos para el producto del gen acoplado, si los marcajes detectables visualmente, como por ejemplo los marcajes enzimáticos, marcajes fluorescentes, marcajes luminiscentes y similares. Una técnica de tinción especialmente sensible y adecuada para utilizar en la presente invención se describe por Hsu y col., Am. J. Clin. Path. 75:734-738 (1980).

Los anticuerpos utilizados para la tinción y/o ensayo de los fluidos de la muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. De forma conveniente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido del ligando de Htk nativo o contra un péptido sintético basado en las secuencias de DNA que se describen en la sección 4 de más adelante.

G. Purificación del polipéptido del ligando de Htk

El ligando de Htk se recupera preferentemente del medio de cultivo como un polipéptido secretado, aunque también puede recuperarse de los lisados de células huésped cuando se produce directamente sin una secuencia señal. Si el ligando de Htk está unido a la membrana, se puede liberar utilizando una solución detergente adecuada (p.ej., Triton-X100).

Cuando el ligando de Htk se produce en una célula recombinante distinta a la de origen humano, el ligando de Htk estará completamente libre de proteínas o polipéptidos de origen humano. Sin embargo, es necesario purificar el ligando de Htk de proteínas o polipéptidos de células recombinantes para obtener preparaciones que sean esencialmente homogéneas con el ligando de Htk. En una primera etapa, el medio de cultivo o lisado se centrifuga para eliminar los restos celulares particulados. El ligando Htk se purifica a continuación de proteínas y polipéptidos solubles contaminantes, siguiendo los procedimientos que se exponen a continuación a modo de ejemplo de procedimiento de purificación: mediante fraccionamiento en columnas de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o resina de intercambio catiónico como DEAE; cromatografía de SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel con, por ejemplo, Sephadex G-75; y columnas de Sepharose-Proteína A para eliminar contaminantes como la IgG.

En la realización preferida, la fusión del receptor Htk-Fc descrita en Bennett y col., *supra* se inmoviliza en una columna de Sepharose A y el ligando Htk puede aislarse mediante purificación por afinidad utilizando dicha columna.

Las variantes de ligando de Htk en las que se han delecionado, insertado o sustituido residuos, se recuperan de la misma manera que el ligando de Htk nativo, teniendo en cuenta cualquier cambio importante en las propiedades ocasionadas por la variación. Por ejemplo, la preparación de una fusión de ligando de Htk con otra proteína o polipéptido, p.ej., un antígeno bacteriano o viral, facilita la purificación; puede utilizarse una columna de inmovilización que contiene el anticuerpo contra el antígeno para adsorber el polipéptido de fusión. Se pueden utilizar columnas de inmovilización, como una columna con un anticuerpo policlonal anti-ligando Htk de conejo para adsorber la variante de ligando de Htk mediante la unión con al menos uno de los epitopos inmunes restantes. También se puede utilizar un inhibidor de proteasa como el fenil metil sulfonil fluoruro (PMSF) para inhibir la degradación proteolítica durante la purificación, y pueden incluirse antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes accidentales. Un experto en la materia apreciará que los procedimientos de purificación adecuados para el ligando de Htk nativo pueden requerir una modificación para conseguir los cambios en el carácter del ligando de Htk o sus variantes después de la expresión en un cultivo de células recombinantes.

H. Modificaciones covalentes de los polipéptidos del ligando de Htk

Las modificaciones covalentes de los polipéptidos del ligando de Htk se incluyen dentro del ámbito de la presente invención. Tanto la secuencia aminoacídica del ligando de Htk nativo como de sus variantes pueden estar modificadas covalentemente. Un tipo de modificación covalente incluida dentro del ámbito de la presente invención es un fragmento de ligando de Htk (p.ej., el ligando de Htk soluble). Los fragmentos de ligando de Htk nativo de hasta 40 residuos aminoacídicos pueden prepararse de forma adecuada mediante síntesis química, o corte enzimático o químico a partir del polipéptido del ligando de Htk o variante de tamaño completo. Otros tipos de modificaciones covalentes del

ES 2 264 127 T3

ligando de Htk o de sus fragmentos se introducen en la molécula, haciendo reaccionar residuos aminoácidos diana del ligando de Htk o sus fragmentos con un agente modificador capaz de reaccionar con las cadenas laterales o con los residuos N- o C-terminales seleccionados.

5 Los residuos cisteinil se hacen reaccionar generalmente con α -haloacetatos (y las correspondientes aminas), como el ácido cloroacético o la cloroacetamida, para proporcionar derivados carboximetil o carboxiamidometil. Los residuos cisteinil también se modifican por la reacción con bromotrifluoroacetona, ácido α -bromo- β -(5-imidazolil)propiónico, cloroacetil fosfato, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro, metil 2-piridil disulfuro, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenceno-2-oxa-1,3-diazol.

10 Los residuos histidil se modifican por la reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral histidil. También es útil el para-bromofenacil bromuro; la reacción se realiza preferentemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

15 Los residuos lisinil y amino terminal se hacen reaccionar con los anhídridos del ácido succínico u otro ácido carboxílico. La modificación con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos lisinil. Otros reactivos adecuados para la modificación de residuos α -amino incluyen los imidoésteres como el metil picolinimidato; el fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobenceno sulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanediona; y la reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

20 Los residuos arginil se modifican por la reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos el fenil-glioxal 2,3-butanediona, 1,2-ciclohexanediona, y nihidrina. Los agentes modificadores de los residuos de arginina requieren que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al elevado pK del grupo funcional de la guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo épsilon-amino de la arginina.

25 La modificación específica de los residuos tirosil puede realizarse con especial interés en introducir marcas espectrales en los residuos tirosil por la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o con tetranitrometano. Más comúnmente, el N-acetilimidazol y el tetranitrometano se utilizan para formar especies O-acetil tirosil y derivados 3-nitro, respectivamente. Los residuos tirosil se yodinan con I^{125} o I^{131} para preparar proteínas marcadas para utilizar en el radioinmunoensayo, el procedimiento descrito más arriba de la cloramina T es adecuado para utilizar en este caso.

30 Los grupos laterales carboxilo (aspartil o glutamil) se modifican selectivamente mediante la reacción con carbodiimida (R-N=C=N-R'), en donde R y R' son grupos alquil distintos, al igual que la 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil)-carbodiimida o la 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos aspartil y glutamil se convierten en residuos asparraguinil y glutamil por la reacción con iones amoníaco.

35 La modificación con agentes bifuncionales es útil para la unión del ligando Htk con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para utilizar en el procedimiento de purificación de anticuerpos anti-Htk, y *vice-versa*. Los agentes de unión utilizados comúnmente incluyen, p.ej., el 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, el glutaraldehído, los ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, los ésteres con el ácido 4-azicosalicílico, los imidoésteres homobifuncionales, incluyendo los ésteres de disuccinimidil como el 3,3'-ditiobis (succinimidilpipropionato), y las maleimidias bifuncionales con el N-maleimido-1,8-octano. Los agentes modificantes como el metil-3-[(p-azidofenil)ditiol]propionimidato que produce intermediarios fotoactivables que son capaces de formar uniones en presencia de la luz. Alternativamente, se utilizan para la inmovilización de proteínas las matrices insolubles en agua y reactivas como los 40 carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes americanas U.S. 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440.

45 Los residuos de glutamil y asparraguinil se desaminan frecuentemente a residuos glutamil y aspartil correspondientes, respectivamente. Estos residuos se desaminan en condiciones neutras o básicas. La forma desaminada de estos residuos se halla dentro del ámbito de la presente invención.

50 Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina, lisina de los grupos hidroxilo de los residuos seril o treonil, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina. (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 [1983]), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación del grupo carboxilo C-terminal.

55 Otro tipo de modificación covalente del polipéptido del ligando de Htk incluida en el ámbito de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativa del polipéptido. Por alteración se hace referencia a la delección de una o más porciones de carbohidrato halladas en el ligando Htk nativo, y/o a la adición de uno o más sitios de glicosilación que no estén presentes en el ligando Htk nativo.

60 La glicosilación de polipéptidos es típicamente N- u O-glicosilación. La N-glicosilación hace referencia a la unión de la fracción de carbohidrato en la cadena lateral de un residuo de asparraguina. Las secuencias tripeptídicas asparraguina-X-serina y asparraguina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de la fracción de carbohidrato con la cadena lateral de la asparraguina. Por ello, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La O-glicosilación hace referencia a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa

con un ácido hidroxilamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se puede utilizar la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido del ligando de Htk se logra de forma adecuada alterando la secuencia aminoacídica, de modo que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas descritas más arriba (para los sitios de N-glicosilación). La alteración también puede realizarse por la adición, o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina con la secuencia del ligando de Htk nativa (para los sitios de O-glicosilación). Para una mayor facilidad, la secuencia aminoacídica del ligando Htk se altera preferentemente por cambios en el nivel de DNA, en particular mutando el DNA que codifica el polipéptido del ligando de Htk en bases preseleccionadas y de este modo los codones generados se traducirán en los aminoácidos deseados. La(s) mutación(es) del DNA(s) puede realizarse utilizando los procedimientos descritos más arriba bajo el título "Variantes de secuencia aminoacídica del ligando de Htk nativo".

Otro procedimiento para aumentar el número de fracciones de carbohidrato en el polipéptido del ligando de Htk consiste en el acoplamiento químico o enzimático de los glicósidos en el polipéptido. Estos procedimientos presentan la ventaja de que no requieren la producción del polipéptido en una célula huésped que con capacidad de N- u O-glicosilación. Dependiendo del modo de acoplamiento utilizado, el o los azúcares pueden unirse a (a) una arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos como los de la fenilalanina, tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en la patente internacional WO 87/05330, publicada el 11 de Setiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

La eliminación de porciones de carbohidrato presentes en el polipéptido del ligando de Htk puede lograrse química o enzimáticamente.

La desglicosilación química requiere la exposición del polipéptido con el compuesto ácido trifluoro-metanesulfónico u otro compuesto equivalente. Este tratamiento resulta en una rotura de la mayor parte de los azúcares excepto del azúcar de unión (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), dejando el polipéptido intacto. La desglicosilación química ha sido descrita por Hakimuddin y col., Arch. Biochem. Biophys. 259: 52 (1987) y por Edge y col., Anal. Biochem. 118:131 (1981). La rotura enzimática de las fracciones de carbohidratos puede realizarse con una variedad de endo y exo glicosidasas tal como se ha descrito por Thotakura y col., Meth Enzymol. 138:30 (1987).

La glicosilación, en los lugares de glicosilación potencial, puede evitarse con compuestos como la tunicamicina tal como ha sido descrito por Duskin y col., J. Biol. Chem. 257:3105 (1982). La tunicamicina, bloquea la formación de los enlaces N-glicósido de la proteína.

Otro tipo de modificación covalente del ligando de Htk comprende la unión de dicho ligando polipeptídico Htk a uno, de entre una variedad, de polímeros noproteínicos, p.e. polietilén glicol, polipropilén glicol o polioxialquileno, tal como se describe en las patentes americanas U.S. Nos. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

Puesto que a menudo es difícil predecir con anterioridad las características de una variante del ligando de Htk, se estima necesario realizar algún cribado de entre las variantes recogidas, para seleccionar la variante óptima. Un cambio en el carácter inmunológico de la molécula del ligando de Htk, tal como la afinidad de un determinado anticuerpo, se puede medir mediante un inmunoensayo de tipo competitivo. La variante se estudia entonces, según la existencia de cambios, por supresión o por aumento de su actividad enzimática en comparación con la actividad observada del ligando nativo Htk en un mismo ensayo. Por ejemplo, se puede utilizar en el cribado, la capacidad de la variante del ligando de Htk para estimular la actividad proteína-quinasa del receptor Htk utilizando las técnicas descrita por Lokker y col., EMBO 11:2503-2510 (1992). Véase también el ejemplo 4 aquí descrito. Se estudian también, mediante métodos bien conocidos en la materia, las otras modificaciones potenciales de la proteína o de las propiedades del polipéptido como pueden ser el potencial redox o la estabilidad térmica, la hidrofobicidad, la susceptibilidad a la degradación proteolítica o la tendencia a agregar con los transportadores o a formar multímeros.

I. Quimeras de ligando de Htk-Inmunoglobulina (Inmunoadhesinas)

Son bien conocidas las inmunoglobulinas (Ig) y ciertas variantes de éstas y muchas de ellas pueden ser preparadas en su forma recombinante a partir de cultivos celulares. Por ejemplo, véase la patente americana U.S. No. 4.745.055; la patente europea EP 256.654; Faulkner y col., Nature 298:286 (1982); las patentes europeas EP 120.694 y EP 125.023; Morrison y col., J. Immun. 123:793 (1979); Köhler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980); Raso y col., Cancer Res. 41:2073 (1981); Morrison y col., Ann. Rev. Immunol. 2:239 (1984); Morrison y col., Science 229:1202 (1985); Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984); las patentes europeas EP 255.694 y EP 266.663; y la patente internacional WO 88/03559. También son conocidas las cadenas recombinadas de inmunoglobulinas. Véase por ejemplo, la patente americana U.S. No. 4.444.878; WO 88/03565; y la patente europea EP 68.763 y las referencias citadas aquí. Así mismo, son conocidas en la materia, las quimeras construidas a partir de la secuencia de un receptor ligada a una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina (inmunoadhesinas). Las inmunoadhesinas que se encuentran descritas en la literatura incluyen fusiones del receptor de células T (Gascoigne y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:2936-2940 [1987]; CD4 (Capon y col., Nature 337:525-531 [1989]; Traunekker y col., Nature 339:68-70 [1989]; Zettmeissi y col., DNA Cell Biol. USA 9:347-353 [1990]; y Byrn y col., Nature 344:667-670 [1990];

ES 2 264 127 T3

L-selectina (receptor de "homing" o de destinación) (Watson y col., J. Cell Biol. 110:2221-2229 [1990]; y Watson y col., Nature 349:164-167 [1991]; CTLA-4 (Lisley y col., J Exp. Med. 174:561-569 [1991]; CD 28 y B7 (Linsley y col., J Exp. Med. 173:721-730 [1991]; CTLA-4 (Lisley y col., J. Exp. Med. 174:561-569 [1991]; CD22 (Stamenkovic y col., Cell 66:1133-1144 [1991]); el receptor del TNF (Azhkenazi y col., Proc Natl. Acad. Sci. USA 88:10535-10539 [1991]; Lesslauer y col., Eur. J. Immuno. 27:2883-2886 [1991]; y Peppel y col., J Exp. Med. USA 88:10535-10539 [1991]; y IgE receptor α (Ridgway and Gorman, J. Cell. Biol. Vol. 115, abstr. 1448 [1991]).

El diseño más simple y directo de inmunoadhesina combina la(s) región(es) de unión de la proteína "adhesina" con la bisagra y las regiones Fc de la cadena pesada de una inmunoglobulina. En la presente invención, cuando se preparan quimeras de una inmunoglobulina y del ligando de Htk, los ácidos nucleicos codificantes para el dominio extracelular del ligando de Htk, o de un fragmento de éste, se fusionan por su extremo C-terminal con los ácidos nucleicos que codifican el extremo N-terminal de la secuencia del dominio constante de inmunoglobulina, aunque las fusiones por el extremo N-terminal, también son posibles.

En general, en tales fusiones, el polipéptido quimérico codificado, retiene al menos la bisagra funcionalmente activa y los dominios CH2 y CH3 de la región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan por el extremo C-terminal de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente al N-terminal del CH1 de la cadena pesada o de la correspondiente región de la cadena ligera.

El lugar preciso en el que la fusión se realiza no resulta crítico; en particular, los lugares mejor conocidos y seleccionados, lo son en razón de la optimización de la actividad biológica, la secreción o las características de la unión de las quimeras de ligando de Htk-inmunoglobulina.

En algunas realizaciones, las quimeras de ligando de Htk-inmunoglobulina están ensambladas como monómeros, hetero u homo-multímeros y particularmente como dímeros o tetrámeros, esencialmente tal como se ilustra en la patente internacional WO 91/08298.

En una realización preferida, la secuencia del dominio extracelular del ligando de Htk está fusionada al extremo N-terminal del dominio Fc de la inmunoglobulina G1 (IgG-1). Es posible fusionar la región constante de una cadena pesada entera a la secuencia del dominio extracelular del ligando de Htk. Sin embargo, se utiliza preferentemente en la fusión una secuencia que comienza por la región bisagra justo cadena arriba del lugar de digestión por papaína, que define de forma química la IgG Fc (p.ej., el residuo 216, considerando como primer residuo de la región constante de la cadena pesada el 114), o en lugares análogos de otras inmunoglobulinas. En una aplicación particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos del ligando de Htk se fusiona (a) a la región bisagra y los dominios CH2 y CH3 o (b) el dominio CH1, la región bisagra, los dominios CH2 y CH3 de una cadena pesada de IgG1, IgG2 o IgG3. El lugar preciso donde se realiza la fusión no es crítico, y el lugar óptimo mediante experimentación rutinaria.

En algunas realizaciones, las quimeras de ligando de Htk-inmunoglobulina están ensambladas como multímeros, y particularmente como homodímeros o tetrámeros. En general, estas inmunoglobulinas ensambladas se conocen como unidades estructurales. Una unidad estructural básica es la forma en la que se presentan la IgG, la IgD y la IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en una inmunoglobulina de alto peso molecular; las IgM generalmente se presentan como pentámeros de cuatro unidades básicas unidas por puentes disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la IgG, también pueden presentarse como formas multiméricas en el suero. En el caso de un multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser idénticas al resto o diferentes entre sí.

Varios ejemplos de quimeras de ligandos Htk-inmunoglobulinas ensambladas abarcadas en el ámbito de la presente invención se muestran esquemáticamente a continuación:

- (a) AC_L-AC_L ;
- (b) $AC_H-[AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_H, \text{ o } V_L C_L-AC_H]$;
- (c) $AC_L-AC_H-[AC_L-AC_H, AC_L-V_H C_H, V_L C_L-AC_H, \text{ o } V_L C_L-V_H]$;
- (d) $AC_L-V_H C_H-[AC_H, \text{ o } AC_L-V_H C_H, \text{ o } V_L C_L-AC_H]$;
- (e) $V_L C_L-AC_H-[AC_L-V_H C_H, \text{ o } V_L C_L-AC_H]$;
- (f) $[A-Y]_n-[V_L C_L-V_H C_H]_2$,

en donde,

cada A representa aquí una secuencia aminoacídica idéntica o diferente del ligando Htk:

V_L es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina.

V_H es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina.

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina.

C_H es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina.

5 n es un entero mayor que 1;

Y designa el residuo de un agente de unión covalente.

10 En resumen, se muestran únicamente las principales características; no se indican las uniones (J) u otros dominios de las inmunoglobulinas, tampoco las uniones disulfuro. Sin embargo, tales dominios son necesarios para la actividad de unión y deben estar presentes en las localizaciones ordinarias que ocupan en las moléculas de inmunoglobulinas.

15 De forma alternativa, las secuencias del dominio extracelular del ligando de Htk pueden insertarse entre las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina, de forma que se obtiene una inmunoglobulina que contiene una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias del ligando de Htk se fusionan con el extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de ésta, tanto entre la bisagra y el dominio CH2, como entre los dominios CH2 y CH3. Construcciones similares han sido descritas por Hoogenboom y *col.*, Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991).

20 Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no se requiere en la inmunoadhesina de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina puede hallarse presente asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de ligando de Htk-cadena pesada de inmunoglobulina o directamente fusionada a un dominio extracelular del ligando de Htk. En primer caso, el DNA que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se coexpresa generalmente con el DNA que codifica la proteína de fusión ligando de Htk-cadena pesada de inmunoglobulina. Después de la secreción, las cadenas híbridas pesadas y ligeras están asociadas covalentemente para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos pares de cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas unidas por puentes disulfuros. Los procedimientos adecuados para la preparación de estas estructuras están por ejemplo, descritos en la patente americana U.S. No. 4.816.567, publicada el 28 de Marzo de 1989.

30 En una realización preferida, las secuencias de inmunoglobulinas utilizadas en las construcciones de las inmunoadhesinas de la presente invención proceden del dominio constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina IgG. Para las inmunoadhesinas humanas, se prefiere el uso de las secuencias humanas de las inmunoglobulinas IgG1 y IgG3. La ventaja más importante de utilizar IgG1 es que las inmunoadhesinas de IgG1 pueden purificarse eficientemente con proteína A inmovilizada. Por el contrario, la purificación de IgG3 requiere proteína G, un medio significativamente menos versátil. Sin embargo, otras propiedades estructurales y funcionales de las inmunoglobulinas se deben considerar cuando se escoge la pareja para la fusión en una determinada construcción de inmunoadhesina. Por ejemplo, la bisagra de IgG3 es mayor y más flexible, por lo que se pueden acomodar mayores dominios "adhesina" que pueden no plegarse o funcionar adecuadamente cuando se fusionan con IgG1. Otra consideración puede ser la valencia; las inmunoadhesinas de IgG son homodímeros bivalentes, mientras que los subtipos de Ig como IgA e IgM pueden dar lugar a estructuras dimericas o pentaméricas, respectivamente, de la unidad básica homodimérica Ig. Para las inmunoadhesinas de ligando de Htk-IgG diseñadas para una aplicación *in vivo*, las propiedades farmacocinéticas y las funciones efectoras especificadas de la región Fc son también importantes. Aunque la IgG1, la IgG2 y la IgG4 tienen todas una vida media de 21 días, sus potencias relativas en la activación del sistema del complemento son diferentes. La IgG4 no activa el complemento y la IgG2 es significativamente más débil en la activación del complemento que la IgG1. Además, a diferencia de IgG1, la IgG2 no se une a los receptores de Fc en las células mononucleares o neutrófilos. Mientras que la IgG3 es óptima para la activación del complemento, su vida media *in vivo* es aproximadamente un tercio de la de otros isotipos de IgG. Otra consideración importante en las inmunoadhesinas diseñadas para ser utilizadas en la terapia humana es el número de variantes alotípicas de un particular isotipo. En general, son preferibles los isotipos de IgG con menos alotipos definidos serológicamente. Por ejemplo, la IgG sólo tiene cuatro lugares alotípicos definidos serológicamente, dos de los cuales (G1m y 2) se localizan en la región Fc; y uno de esos lugares, G1ml, no es inmunogénico. En cambio, hay 12 alotipos definidos serológicamente en la IgG3, todos los cuales se encuentran en la región Fc; sólo tres de esos lugares (G3m5, 11 y 12) tienen un alotipo que no es inmunogénico. Por tanto la inmunogenicidad potencial de una inmunoadhesina $\gamma 3$ es mayor que la de una inmunoadhesina $\gamma 1$.

55 En el diseño de las inmunoadhesinas de ligando de Htk-Ig de la presente invención, es posible deleccionar los dominios que no se requieren para la unión a rPTK y/o para la actividad biológicas del ligando de Htk. Con respecto a la inmunoglobulina parental, un lugar de unión útil se halla justo cadena arriba de las cisteínas de la bisagra que forman los enlaces disulfuro entre las dos cadenas pesadas. En un diseño frecuentemente utilizado, el codón para el residuo C-terminal de la porción de "adhesina" (ligando de Htk) se coloca directamente cadena arriba de los codones para la secuencia DKHTHCPCP (SEC ID NO: 7) de la región bisagra de la IgG1.

65 En general, los procedimientos idóneos para la construcción y la expresión de inmunoadhesinas son los mismos descritos más arriba con especial mención al ligando de Htk (nativo o variante). Las inmunoadhesinas de ligando de Htk-IgG se construyen forma idónea por fusión de la secuencia del cDNA codificante de la fracción del ligando de Htk en fase con la secuencia del cDNA de Ig. También puede utilizarse la fusión de fragmentos genómicos de Ig (véase, p.ej., Gascoigne y *col.*, *supra*; Aruffo y *col.*, Cell 61: 1303-1313 [1991]; y Stramenkovic y *col.*, Cell 66:1133-1144). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias Ig reguladoras de la expresión. Los cDNAs que codifican las regiones constantes de cadena pesada de IgG pueden aislarse, según sus secuencias publicadas, de las librerías de

cDNAs derivadas de bazo, o de linfocitos de sangre periférica, por técnicas de hibridación o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los cDNAs que codifican la fracción "adhesina" y la fracción de Ig de la inmunoadhesina son insertados en tándem en un vector plasmídico que dirige eficientemente la expresión en las células huésped escogidas. Para la expresión en células de mamífero, son adecuados los vectores basados en pRK5 (Schall y col., Cell 61:361-370 [1990] y CDM8 (Seed, Nature 329:840 [1989]). La unión exacta puede crearse por eliminación de secuencias extra en los codones diseñados para la unión por mutagénesis delecional dirigida por oligonucleótidos (Zoller y Smith, Nucleic. Acid. Res. 10:6487 [1982]) y Capon y col., Nature 337:525-531 [1989]). Se pueden utilizar oligonucleótidos sintéticos en los que cada mitad es complementaria con la secuencia de unión deseada; de forma ideal son de 36 a 48 mers. De forma alternativa, pueden utilizarse técnicas de PCR para unir las dos parte de la molécula en fase con un vector apropiado.

La elección de la línea celular huésped para la expresión de inmunoadhesinas de ligando de Htk-Ig depende principalmente del vector de expresión. Otra consideración es la cantidad de proteína que se requiere. A menudo es posible obtener cantidades del orden de miligramos con transfecciones transitorias. Por ejemplo, la línea celular humana embrionaria de riñón 293 transformada con el adenovirus EIA puede transfectarse de forma transitoria con vectores derivados de pRK5 por una modificación del procedimiento del fosfato cálcico para permitir la expresión eficiente de la inmunoadhesina. Los vectores basados en CDM8 pueden utilizarse para transfectar células COS mediante el método del DEAE-dextrano (Aruffo y col., Cell 61:1303-1313 [1990]; y Zettmeissl y col., DNA Cell Biol. (US) 9:347-353 [1990]). Si se desean grandes cantidades de proteína, la inmunoadhesina puede ser expresada después de la transfección estable de una línea celular huésped. Por ejemplo, un vector derivado de pRK5 puede introducirse en células de ovario de hámster chino (CHO) en presencia de un plásmido adicional que codifica la dihidrofolato reductasa (DHFR) y que confiere resistencia a G418. A continuación, los clones resistentes a G418 pueden seleccionarse en el cultivo. Estos clones se crecen en presencia de niveles crecientes del inhibidor de DHFR, metrotexato, y se seleccionan aquellos que presentan un número de copias importante que codifican DHFR y las secuencias de inmunoadhesinas co-amplificadas. Si la inmunoadhesina contiene una secuencia líder hidrofóbica en su extremo N-terminal, se procesa y secreta por las células transfectadas. La expresión de inmunoadhesinas con estructuras más complejas, requiere únicamente células huésped adecuadas. Por ejemplo, componentes como una cadena ligera o cadena J pueden proporcionarse por un mieloma o hibridoma como célula huésped (Gascoigne y col., *supra*; y Martin y col., J Virol. 67:3561-3568 [1993]).

Las inmunoadhesinas puede ser purificadas convenientemente por cromatografía de afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies e isotipo del dominio Fc de la inmunoglobulina que se utiliza en la quimera. La proteína A puede ser utilizada para purificar inmunoadhesinas que están basadas en las cadenas pesadas de $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., J Immunol. Method. 62:1-13 [1986]). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la $\gamma 3$ humana (Guss y col., EMBO J. 5:1567-1575 [1986]). La matriz a la que el ligando de afinidad está frecuentemente unido es la agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices estables mecánicamente como el vidrio de poro determinado o poliestireno-divinilbenceno permiten flujos más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden conseguirse con agarosa. Las condiciones para la unión de una inmunoadhesina a una columna de afinidad de proteína A o G vienen dictadas enteramente por las características del dominio Fc; es decir su especie o isotipo. Generalmente, cuando se escoge el ligando adecuado, se produce una unión eficiente directamente del fluido de un cultivo no condicionado. Una característica que distingue a las inmunoadhesinas es una disminución de la capacidad de unión a la proteína A de las las moléculas humanas de $\gamma 1$, si se comparan con un anticuerpo del mismo tipo Fc. La inmunoadhesina unida puede eluirse eficientemente tanto a un pH ácido (a/o por encima de 3,0), o en un tampón a pH neutro que contenga sales medianamente caotrópicas. El paso por la cromatografía de afinidad puede resultar en una preparación de inmunoadhesina de una pureza superior al 95%.

Otros procedimientos conocidos en la materia pueden utilizarse en lugar de, o además de, la cromatografía de afinidad con proteínas A o G para purificar inmunoadhesinas. Las inmunoadhesinas se comportan de forma similar a los anticuerpos en geles de cromatografía tiofílicos (Hutchens y Porath, Anal. Biochem. 159:217-226 [1986]) y cromatografía de metal quelante inmovilizado (Al-Mashikhi y Makai, J. Dairy Sci. 71:1756-1756 [1988]). Al contrario que los anticuerpos, su comportamiento en columnas de intercambio iónico viene dictado sólo por sus puntos isoeléctricos, aunque también por la carga dipolar que pueda existir en las moléculas debido a su naturaleza quimérica.

J. Ligando de Htk etiquetado epitópicamentee

Esta realización comprende polipéptidos quiméricos que contienen el ligando de Htk fusionado con otro polipéptido (tal como en las inmunoadhesinas mencionadas más arriba). En una realización preferida, el polipéptido quimérico comprende una fusión del ligando de Htk (o un fragmento de éste, p.ej., el ECD del ligando de Htk) con un polipéptido etiqueta que proporciona un epitopo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta epitópica se coloca en general en el extremo amino o carboxilo del ligando de Htk. Estas formas etiquetadas epitópicamente del ligando de Htk son las preferibles, pues la presencia de éste puede detectarse utilizando un anticuerpo marcado contra el polipéptido etiqueta. También la presencia de una etiqueta epitópica permite al ligando de Htk ser purificado fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta. Las técnicas de purificación por afinidad y los ensayos diagnósticos que implican anticuerpos se describen más adelante.

Los polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en la materia. Entre los ejemplos, se incluyen el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field y col., Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165 [1988]); la etiqueta de c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan y col., Molecular and Cellular

Biology 5(12):3610-3616 [1985]); y la etiqueta de la glicoproteína D (gD) del virus Herpes Simplex y su anticuerpo (Paborsky y *col.*, Protein Engineering 3(6):547-553 [1990]). Se han descrito otros polipéptidos etiqueta. Los ejemplos incluyen el péptido Flag (Hopp y *col.*, BioTechnology 6:1204-1210 [1988]); el epitopo KT3 (Martin y *col.*, Science 255:192-194 [1992]); un epitopo de la α -tubulina (Skinner y *col.*, J. Biol. Chem. 266:15163-15166 [1991]); y el péptido etiqueta de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyemuth y *col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6393-6397 [1990]). Una vez se ha escogido un polipéptido etiqueta, se genera un anticuerpo contra éste mediante las técnicas aquí descritas.

Los procedimientos idóneos para la construcción y la producción del ligando de Htk etiquetado epitópicamente son los mismos que se describen aquí con especial mención al ligando de Htk (nativo o variante). Las fusiones del ligando de Htk-polipéptido etiqueta se construyen por fusión de la secuencia del cDNA que codifica la fracción del ligando de Htk en fase con la secuencia del DNA del polipéptido etiqueta y expresando el DNA de la fusión resultante en las células huésped adecuadas. Generalmente, cuando se preparan quimeras de ligando de Htk-polipéptido etiqueta de la presente invención, el ácido nucleico codificante del ligando de Htk (o un fragmento de éste) se fusiona en su extremo 3' a un ácido nucleico que codifica el extremo N-terminal del polipéptido etiqueta, aunque también son posibles las fusiones 5'.

El ligando de Htk etiquetado epitópicamente puede purificarse por cromatografía de afinidad mediante el anticuerpo anti-etiqueta. La matriz a la que se ancla el anticuerpo frecuentemente es la agarosa, pero también se hallan disponibles otras matrices (p.ej., vidrio de poro determinado o poliestireno-divinilbenceno). El ligando de Htk etiquetado epitópicamente puede eluirse de la columna de afinidad mediante, por ejemplo, cambios de pH o de fuerza iónica o añadiendo agentes caotrópicos.

2. Usos terapéuticos, composiciones y administración del ligando de Htk

La utilización terapéutica del ligando de Htk se deriva del tratamiento de mamíferos mediante la estimulación o inhibición del crecimiento y/o la diferenciación y/o activación de células que tienen un receptor para el ligando de Htk, como el receptor Htk. La expresión regional destacada del DNA del ligando de Htk en el córtex cerebral, hipocampo, zona estriada y cerebelo (véase Ejemplo 3) sugiere la posibilidad que el polipéptido ligando de Htk pueda ser útil en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas en las que las estructuras, o neuronas que proyectan dichas estructuras están afectadas. Estas enfermedades incluyen, pero no están limitadas a, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la cólera de Huntington, y trastornos del cerebelo (Hefti, J. Neurobiol. en prensa [1994]; Marsden, Lancet 335:948-952 [1990]; Agid, Lancet 337:1321-1327 [1991]; Wexler y *col.*, Ann. Rev. Neurosci. 14:503-529 [1991]).

El ligando de Htk maduro exógeno o una forma soluble de éste (p.ej., una inmunoadhesina soluble) puede administrarse a un paciente bajo ciertas circunstancias. El ligando de Htk es claramente útil si es administrado a humanos que tienen unos niveles deprimidos de su ligando de Htk endógeno, preferentemente en la situación donde esos niveles deprimidos puedan llevar a un trastorno patológico.

Las formulaciones terapéuticas del ligando de Htk se preparan para su almacenamiento mezclando el ligando de Htk con el deseado grado de pureza junto con vehículos, excipientes, o estabilizantes opcionales, fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edición, Osol. A., Ed (1980)), en la forma de una pasta liofilizada o en solución acuosa. Los vehículos, excipientes y estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como el fosfato, el citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferiores a 10 residuos); proteínas como la albúmina bovina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como la polivinilpirrolidona; aminoácidos como la glicina, la glutamina, la asparraguina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes como el EDTA; alcoholes de azúcares como el manitol o el sorbitol; iones formadores de sales como el sodio; y/o tensoactivos no-iónicos tales como el Tween, el Pluronic o el polietilén glicol (PEG).

El ligando de Htk también puede ser encapsulado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-[metilmetacilato] respectivamente), en sistemas coloidales de liberación de fármacos (por ejemplo, liposomas, microsferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se detallan en Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

Para la administración *in vivo* del ligando de Htk, éste debe ser estéril. Esto se consigue mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o tras liofilización y reconstitución. Habitualmente, el ligando de Htk se almacenará en forma liofilizada o en solución.

Las composiciones terapéuticas del ligando de Htk se colocarán generalmente en un envase que tenga un acceso estéril, por ejemplo una bolsa o vial de solución intravenosa que tenga un tapón perforable por una aguja hipodérmica.

La vía de administración del ligando de Htk está en concordancia con los procedimientos conocidos, p.ej., inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida como se indica más abajo. El ligando de Htk se administra de forma

continua por infusión o por inyección de un bolo. El anticuerpo del ligando de Htk se administra de la misma forma, o mediante la administración en el torrente sanguíneo o en la linfa.

Entre los ejemplos idóneos de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables o polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen la proteína, matrices que están en forma de artículos con forma determinada, p.ej., películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles [ej., poli(2-hidroxietil-metacrilato) tal y como se describe por Langer y col., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982) o poli(vinilalcohol)], poliláctidos (Patente americana U.S. 3.773.919, patente europea EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman y col., Biopolymers 22:547-556 [1983], acetato no degradable de etilén-vinilo (Langer y col., *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico tal como el Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide), y poli-D-(-)-3-ácido hidroxibutírico (patente europea EP 133.988).

Mientras polímeros como el acetato de etilén-vinilo y de ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante un tiempo prolongado, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37°C, resultando en una pérdida de la actividad biológica y en posibles cambios en la inmunogenicidad. Deben diseñarse estrategias racionales para la estabilización de las proteínas en función del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de un intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones acídicas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones específicos de matrices de polímero.

Entre las composiciones para la liberación sostenida del ligando de Htk también se incluye el ligando de Htk inmovilizado en liposomas. Los liposomas que contienen el ligando de Htk se preparan mediante procedimientos conocidos *per se*: patente DE 3.218,121; Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985); Hwang y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980); patente europea EP 52.322; 36.676; 88.046; 143.949; 142.641; aplicación de patente japonesa JP 83-118008; patente americana U.S. 4.485.045 y 4.544.545; y patente europea E.P. 102.324. Habitualmente los liposomas son de tipo unilamelar pequeño en el que el contenido lipídico es superior a aproximadamente un 30% molar de colesterol, siendo ajustada la proporción seleccionada para la terapia óptima del ligando de Htk.

La cantidad efectiva de ligando de Htk que se usa terapéuticamente dependerá, por ejemplo de los objetivos terapéuticos, la vía de administración y la condición del paciente. En concordancia, será necesario que el terapeuta titule la dosis y que modifique la vía de administración según sea necesario para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosis diaria típica podría oscilar de 1 µg/kg a 10 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Típicamente, el clínico administrará el ligando de Htk hasta que la dosis alcanzada consiga el efecto deseado. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante ensayos convencionales.

3. Usos diagnósticos, no terapéuticos del ligando de Htk

El ácido nucleico que codifica el ligando de Htk puede utilizarse como diagnóstico para el tipado específico de tejido (p.ej., epitelio de glándula mamaria). Por ejemplo, pueden utilizarse procedimientos tales como hibridación *in situ*, transferencia de Northern y Southern y análisis por PCR para determinar si el DNA y/o RNA que codifica para el ligando de Htk está presente en el tipo(s) celular(es) que está siendo evaluado. El ácido nucleico o el polipéptido del ligando de Htk puede ser usado también como marcador diagnóstico en carcinomas de glándula mamaria. Por ejemplo, el ligando de Htk puede marcarse, utilizando las técnicas aquí descritas, y puede cuantificarse la expresión del ácido nucleico del receptor Htk usando el ligando de Htk marcado.

El ácido nucleico del ligando de Htk humano se ha localizado en el cromosoma 13q33. Por tanto, el ácido nucleico para el ligando de Htk puede ser usado como marcador de este cromosoma humano.

El ácido nucleico del ligando de Htk también es útil para la preparación del polipéptido del ligando de Htk mediante técnicas recombinantes mostradas aquí.

El polipéptido del ligando de Htk aislado puede usarse en análisis diagnósticos cuantitativos como un estándar o control frente al cual pueden prepararse muestras que contienen cantidades desconocidas de ligando de Htk.

Las preparaciones del ligando de Htk son también útiles en la generación de anticuerpos, como estándares en ensayos para el ligando de Htk (p.ej., marcando el ligando de Htk para su uso como un estándar en un radioinmunoensayo, o en un inmunoensayo enzimático, para detectar la presencia del receptor Htk en una muestra biológica (p.ej., usando un ligando de Htk marcado), en técnicas de purificación por afinidad, y en ensayos competitivos de unión a receptor cuando se marca con radioyodina, enzimas, fluoróforos, marcaje con radicales y similar.

El ligando de Htk también es útil como herramienta diagnóstica. Por ejemplo, el ligando de Htk puede producirse en células eucariotas, usando técnicas elaboradas aquí de forma que la proteína no glicosilada que se produce puede usarse, por ejemplo, como marcador de peso molecular. El peso molecular (PM) deducido del ligando de Htk no glicosilado bajo condiciones reductoras es de aproximadamente 34 kD. El ligando soluble de Htk tiene un PM deducido

de 22 kD bajo condiciones reductoras. Para la utilización del ligando de Htk como marcador de peso molecular, se usará habitualmente, por ejemplo, cromatografía de gel filtración o SDS-PAGE para la separación de la(s) proteína(s) para las cuales se desea determinar su(s) peso(s) molecular(es) sustancialmente a través de la manera habitual. El ligando de Htk y otros marcadores de peso molecular se usarán como estándares para proporcionar un rango de pesos moleculares. Por ejemplo, pueden utilizarse como marcadores de peso molecular la fosforilasa b (PM=97.400), la albúmina sérica bovina (PM=68.000), la ovoalbúmina (PM=46.000), el ligando de Htk (PM=34.000), el inhibidor de tripsina (PM=20.100), y la lisozima (PM=14.400). El resto de marcadores de peso molecular mencionados aquí pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, a través de Amersham Corporation, Arlington Heights, IL. A menudo los marcadores de peso molecular se marcarán para facilitar su detección tras la separación. Las técnicas para marcar anticuerpos y proteínas son ampliamente conocidas y se tratan aquí. Por ejemplo, los marcadores de peso molecular pueden ser biotinilados y tras la separación por SDS-PAGE la membrana puede incubarse con estreptavidina peroxidasa de rábano. Las bandas pueden visualizarse a través de la detección de luz.

También puede ser útil crecer ciertas células que tengan el receptor Htk *ex vivo* usando el ligando de Htk como un factor de crecimiento. Estas células que se hacen crecer *ex vivo* pueden ser expuestas simultáneamente a otros factores de crecimiento o citocinas conocidos. Entre los ejemplos de citocinas se incluyen las interleuquinas (p.ej., IL-3), el factor estimulante de colonias de granulocito-macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), la eritropoyetina (Epo), la linfotóxina, el factor steel (SLF), el factor de necrosis tumoral (TNF) y el interferón gamma. Esto causa la proliferación y/o diferenciación de las células que poseen el receptor Htk. Por ejemplo, líneas celulares tumorales humanas para las cuales se desea aislar ciertos factores asociados al mismo tumor (habitualmente proteínas) pueden crecerse *ex vivo* usando el ligando de Htk. También se pueden generar anticuerpos contra los factores asociados al tumor que pueden ser útiles con propósitos diagnósticos. Entre los ejemplos de tales líneas celulares tumorales que pueden tratarse con el ligando de Htk se incluyen células de cáncer mamario (p.ej., MCF-7), líneas celulares hepáticas, Colo 205, NCI 69, HM-1 y HeLa.

En otro aspecto de la invención, el ligando puede ser utilizado para la purificación por afinidad del receptor Htk. Brevemente, esta técnica implica la unión covalente del ligando de Htk a una matriz porosa e inerte (p.ej., agarosa activada con bromuro de cianógeno). A continuación, puede pasarse a través del material cromatográfico una solución que contenga el receptor Htk y puede ser liberado posteriormente cambiando las condiciones de elución (p.ej., cambiando el pH o la fuerza iónica).

El ligando de Htk purificado, y el ácido nucleico que lo codifica, pueden venderse también como reactivos para estudios mecanísticos del ligando y su receptor conocido, para analizar el papel del ligando de Htk y su receptor en el desarrollo y crecimiento normal, así como en el desarrollo y crecimiento anormal, p.ej., en procesos malignos.

El ligando de Htk puede usarse para el análisis competitivo de agonistas o antagonistas potenciales para la unión al receptor Htk. Variantes del ligando de Htk son útiles como estándares o controles en los ensayos para el ligando de Htk, dado que son reconocidas por el sistema analítico empleado, p.ej., un anticuerpo contra el ligando de Htk.

4. Preparación del anticuerpo contra el ligando de Htk

A continuación, una descripción sobre los ejemplos de producción de anticuerpos tal como se definen aquí. Entre estos ejemplos de anticuerpos se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos o heteroconjugados.

A. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales contra el ligando de Htk se generan habitualmente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del ligando de Htk y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el ligando de Htk o un fragmento que contenga la secuencia aminoacídica diana a una proteína que sea inmunogénica en la especie que va a ser inmunizada, p.ej., la hemocianina de la lapa, la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina o el inhibidor de la tripsina de soja usando un agente bifuncional o modificador, por ejemplo, el éster de maleimidobenzil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), la N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), el glutaraldehído, el anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra los conjugados o derivados inmunogénicos combinando 1 mg ó 1 μg de conjugado (para conejos o ratones respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Al cabo de 1 mes se administra a los animales de 1/5 a 1/10 de la cantidad original del conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Entre 7 y 14 días después se procede al sangrado de los animales y el suero se analiza para titular el anticuerpo contra el ligando de Htk. Los animales se inyectan hasta alcanzar un título en la meseta de la curva exponencial de titulación. Preferentemente, el animal se inyecta con el conjugado del mismo ligando de Htk, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de distintos reactivos de reticulación. Los conjugados también pueden prepararse en un cultivo celular recombinante como proteínas de fusión. También se usan agentes agregantes como alumbre para aumentar la respuesta inmune.

B. Anticuerpos Monoclonales

Los anticuerpos monoclonales se obtienen a partir de una población substancialmente homogénea de anticuerpos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que puedan haberse presentado en pequeñas cantidades. Por tanto, el término “monoclonal” indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal contra el ligando de Htk de la invención puede generarse usando el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495 (1975), o puede prepararse por procedimientos de DNA recombinante (Cabilly y col., patente americana U.S. 4.816.567).

En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal huésped adecuado, como el hámster, es inmunizado tal y como se describe aquí para dar lugar a linfocitos que producen, o son capaces de producir, anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. Los linfocitos entonces se fusionan con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 [Academic Press 1986]).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si a las células parentales de mieloma les falta el enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de las células deficientes en HPGRT.

Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan un nivel elevado de expresión estable del anticuerpo por las células productoras del anticuerpo seleccionado, y son sensibles a un medio como el medio HAT. Entre ellas, las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murino, tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, y las células SP-2 disponibles en el American Type culture Collection, Rockville, Maryland USA. También se ha descrito la utilización de líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 [1984]; y Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987). Véase también Boerner y col., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991) y la patente internacional W.O.91/17769, publicada el 28 de Noviembre de 1991, para técnicas de producción de anticuerpos monoclonales humanos.

El medio de cultivo en el que se crecen las células de hibridoma se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el ligando de Htk. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.* 107:220 (1980).

Después de haber identificado que las células de hibridoma producen anticuerpos de la especificidad afinidad, y/o actividad deseada, los clones deben ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitada y crecidas mediante procedimientos estándar. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-104 (Academic Press, 1986). Entre los medios adecuados para este propósito se incluyen, por ejemplo, el Dulbecco's Modified Eagles's Medium o el medio RPMI-1640. Además las células de hibridoma pueden crecerse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, del fluido ascítico, o del suero mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepahorse, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad. Alternativamente, es posible actualmente obtener animales transgénicos (p.ej., ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homóloga del gen para la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal resulta en la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la serie de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en tales ratones mutantes de línea germinal llevará consigo la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con el antígeno. Véase, p.ej., Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551-2555 (1993); y Jakobovits y col., *Nature* 362:255-258 (1993).

En una realización adicional se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a partir de una librería de anticuerpos expresados en fagos generada usando las técnicas descritas en McCafferty y col., *Nature* 348:552-554 (1990), usando el ligando de Htk (o un fragmento del mismo) para seleccionar un anticuerpo o fragmento de anticuerpos adecuados. Clackson y col., *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente usando librerías de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (del orden nM) mediante intercambio de cadenas (Mark y col., *Bio./Technol.* 10:779-783 [1992]), así como infección combinatorial y recombinación *in vivo*

como una estrategia para construir librerías de fagos de gran tamaño (Waterhouse y col., Nuc. Acids Res., 21: 2265-2266 [1993]). Por tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de anticuerpos monoclonales en hibridomas para el aislamiento de anticuerpos “monoclonales” (fundamentalmente anticuerpos humanos) las cuales están comprendidas en la presente invención.

5 El DNA que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y secuencia fácilmente mediante procedimientos convencionales (p.ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos. Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferente de dicho DNA. Una vez aislado, el DNA puede introducirse en vectores de expresión, los cuales se transfectan a continuación en células huésped como las células COS de simio, las células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de lo contrario no producirían proteína inmunoglobulínica, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El DNA puede también modificarse, por ejemplo, substituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadenas pesada y ligera humanas en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6851 (1984), o mediante unión covalente a la secuencia codificante de la inmunoglobulina de toda o de una parte de la secuencia codificante de un polipéptido no inmunoglobulínico. De este modo, se preparan anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” que presentan la especificidad de unión de un anticuerpo monoclonal contra el ligando de Htk.

20 Típicamente, tales polipéptidos no inmunoglobulínicos se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación antigénica de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente que comprende un sitio de combinación con el antígeno que tiene especificidad por un ligando de Htk y otro sitio de combinación con el antígeno con especificidad por un antígeno diferente.

25 Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en química sintética de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes de entrecruzamiento. Por ejemplo, pueden prepararse inmunotoxinas usando una reacción de intercambio con disulfuro o formando un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos idóneos para este propósito se incluye el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato.

30 Para aplicaciones diagnósticas, los anticuerpos de la invención se marcarán con una fracción detectable. La fracción detectable puede ser cualquiera que pueda ser capaz de producir, de forma directa o indirecta, una señal detectable. Por ejemplo, la fracción detectable puede ser un radioisótopo, como el ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S, o ¹²⁵I; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina o la luciferina; o una enzima, como la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la peroxidasa de rábano.

35 Puede utilizarse cualquier procedimiento conocido en el área para conjugar separadamente el anticuerpo con la fracción detectable; incluyendo aquellos procedimientos descritos por Hunter y col., Nature 144:945 (1962); David y col., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain y col., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem, 30:407 (1982).

40 Los anticuerpos de la presente invención pueden emplearse en cualquier procedimiento de ensayo conocido como ensayos de unión competitivos, ensayos de ensayos de fase doble o sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp 147-158 CRC Press, Inc., 1987).

45 Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un estándar marcado (que puede ser un ligando de Htk, o una fracción del mismo inmunológicamente reactiva) para competir con el analito en la muestra a analizar (el ligando de Htk) por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de ligando de Htk en la muestra a analizar es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que llega a unirse a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de estándar que llega a unirse, los anticuerpos generalmente se insolubilizan antes o después de la competición, de forma que el estándar y el analito que están unidos a los anticuerpos puedan ser separados convenientemente del estándar y del analito que quedan sin unir.

55 Los ensayos de fase doble (sándwich) implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a diferentes regiones inmunogénicas, o epitopo, de la proteína a detectar. En un ensayo de fase doble, el analito de la muestra a analizar está unido a un primer anticuerpo el cual está inmovilizado en un soporte sólido, y entonces un segundo anticuerpo se une al analito, formando un complejo de tres partes insoluble. Véase, ej., patente americana U.S. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede ser marcado con una fracción detectable (ensayo de fase doble directo) o puede medirse usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que esté marcado con una fracción detectable (ensayo de fase doble indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo de fase doble es un ensayo ELISA, en el que la fracción detectable es una enzima.

60 C. Anticuerpos humanizados

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en el área. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos aminoacídicos introducidos en él a partir de una fuente no humana. Estos residuos aminoacídicos no humanos se denominan frecuentemente como residuos “importados”, los cuales se toman típicamente de un dominio variable “importado”. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones y col., Nature 321:522-525 [1986]; Riechmann y col., Nature 332:323-327 [1988]; Verhoeyen y col., Science 239:1534-1536 [1988]), substituyendo CDRs de roedor o secuencias

CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Tales anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (Cabilly, *supra*) donde se sustituye sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos CDR, y posiblemente algunos residuos FR, son substituidos por residuos de regiones análogas en anticuerpos de roedores.

Es importante que los anticuerpos que se humanizan retengan una elevada afinidad por el antígeno, así como otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, según el procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan por un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales usando modelos de las secuencias parentales y humanizadas en tres dimensiones. Los modelos de inmunoglobulinas en tres dimensiones son similares a los descritos en el área. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran las probables estructuras conformacionales en tres dimensiones de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas representaciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de la inmunoglobulina candidata., es decir, el análisis de los residuos que afectan a la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar y combinar residuos FR con la secuencia consenso y la importada para que así se logren las características deseadas del anticuerpo, tales como una alta afinidad por el antígeno(s) diana. En general, los residuos CDR están directamente y más sustancialmente implicadas en afectar la unión del antígeno. Para más detalles véase la patente internacional W.O. 92/22653 publicada el 23 de Diciembre de 1992.

D. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados que muestran especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el caso presente, una de las especificidades de unión es el ligando de Htk y la otra es por cualquier otro antígeno, preferentemente por un receptor o una subunidad de un receptor. Por ejemplo, uno de los ámbitos de la presente invención es el de anticuerpos biespecíficos con especificidad de unión con el receptor Htk y el ligando de Htk.

Los procedimientos para la generación de anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos está basada en la coexpresión de 2 pares de cadenas pesada-ligera de inmunoglobulina, en donde las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Millstein y Cuello, Nature 305:537-539 [1983]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, en donde sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que habitualmente se realiza mediante procedimientos de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y el rendimiento de producto es bajo. Se describen procedimientos similares en la patente internacional W.O. 93/08829 publicada el 13 de Mayo de 1993 y en Traunecker y col., EMBO 10:3655-3659 (1991).

En función de la aproximación preferida, se fusionan dominios variables del anticuerpo con la especificidad de unión deseada (sitios anticuerpo-antígeno combinados) con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulina. La fusión preferentemente se realiza con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende, al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) conteniendo la región necesaria para la unión de la cadena ligera esté presente en al menos una de las fusiones. Los DNAs que codifican para las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en diferentes vectores de expresión y se cotransfectan en un organismo huésped idóneo. Esto proporciona una gran flexibilidad de cara al ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en una realización cuando los rendimientos óptimos los proporcionan ratios desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión cuando la expresión de al menos dos de las cadenas polipeptídicas en proporciones idénticas dé lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tengan una significación particular. En una realización preferida de esta aproximación, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera híbrida (que proporciona la segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha observado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones no deseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina sólo en la mitad de la molécula biespecífica permite una manera sencilla de separación. Esta aproximación se describe en la patente internacional W.O. 94/04690 publicada el 3 de Marzo de 1994. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology 121:210 (1986).

E. Anticuerpos Heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados se incluyen también en el ámbito de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Se ha propuesto, por ejemplo, que dichos anticuerpos dirijan las células del sistema inmune hacia células extrañas (patente americana U.S. 4.676.980), y para el tratamiento de la infección por HIV (patentes internacionales WO 91/00360, WO 92/200373, y patente europea EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse mediante cualquier procedimiento adecuado de reticulamiento. Los agentes adecuados para el reticulamiento son bien conocidos en el área, y se describen en la patente americana U.S. 4.676.980, junto a una serie de técnicas de reticulamiento.

5. Uso de los anticuerpos contra el ligando de Htk

Los anticuerpos Htk pueden ser útiles en ciertas indicaciones terapéuticas para bloquear la actividad del ligando de Htk (por ejemplo en cáncer mamario).

Las formulaciones terapéuticas del anticuerpo contra el ligando de Htk y las vías de administración deben ser similares a las descritas anteriormente para el ligando de Htk. Una dosis diaria típica del anticuerpo debería oscilar en el intervalo de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 5 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente para la administración del ligando de Htk.

Los anticuerpos contra el ligando de Htk pueden ser útiles también en ensayos diagnósticos para el ligando de Htk, p.ej., detectando su expresión en células, tejidos o sueros específicos. Los anticuerpos se marcan de la misma manera que el ligando de Htk, tal y como se describió anteriormente y/o se inmovilizan en una matriz insoluble. Los anticuerpos para el ligando de Htk pueden ser útiles también para la purificación por afinidad del ligando de Htk a partir de un cultivo de células recombinantes o de fuentes naturales. Los anticuerpos para el ligando de Htk que no presenten reacciones cruzadas detectables con otras proteínas pueden usarse para purificar el ligando de Htk libre de estas otras proteínas conocidas. Los ensayos diagnósticos adecuados para el ligando de Htk y sus anticuerpos se describieron anteriormente.

III. Experimental

Más adelante se indican ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen con objetivos ilustrativos únicamente, y no pretenden en ningún modo limitar el ámbito de la presente invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes indicadas aquí, *supra* o *infra*, se incorporan por la presente por referencia en su totalidad.

Ejemplo 1

Producción de una proteína de fusión receptor Htk-Fc soluble para la identificación de un ligando de Htk

Con objeto de identificar y en último término de clonar el ligando de Htk, se construye una proteína de fusión que consiste en el dominio extracelular (ECD) del receptor Htk fusionado a IgG_1 Fc humana. Véase Bennet y col., *supra* para las técnicas de producción de proteínas de fusión.

La fusión del receptor Htk-Fc se usa para analizar una serie de líneas celulares de riñón en cuanto a su capacidad de unir el dominio extracelular del receptor Htk, usando análisis por FACS, como se describió previamente. Véase Urdal y col., J. Biol. Chem. 263:2870-2877 (1988); y Gearing y col., EMBO.J. 8:3667-3676 (1989). Cualquier línea celular unida específicamente a la proteína de fusión indica una fuente de ligando de Htk unida a membrana o asociada a membrana. El análisis de algunas de las 15 líneas celulares de riñón lleva consigo el descubrimiento de la unión específica de una línea mesangial murina de riñón llamada SV40MES 13. Se demuestra que la línea celular SV40MES 13 es positiva para la unión Htk-Fc y no para otras proteínas de fusión con Fc.

Los estudios de unión competitivos se realizan como sigue. Se analiza la unión en el estado de equilibrio de ^{125}I -HTk-Fc en células SV40MES 13 (5×10^6 células/pocillo) en presencia de cantidades variables de Htk-Fc no marcado. Las células se incuban con 1 nM o 0,2 nM de ^{125}I -HTk-Fc y varias concentraciones de Htk-Fc no marcado (10 pm -1 μM) durante 2 h a 4°C. Las células se separan del HTk-Fc marcado con ^{125}I mediante centrifugación a través de gradiente de sacarosa tal y como se describió previamente en Lee y col., J. Biol. Chem. 267:16283-16287 (1992). Los datos de la unión se analizan para determinar la afinidad y el número de sitios por célula como se describe en Munson y Rodbard Anal. Biochem. 107:220-239 (1980). La proteína de fusión Htk-Fc se yodina mediante el procedimiento de la lactoperoxidasa, tal y como se describe en Urdal y col., J. Biol. Chem. 263:2870-2877 (1988). La K_d para la unión de la proteína de fusión a SV40MES 13 es 3 nM con aproximadamente 6.500 sitios por célula (Figura 5A). El medio condicionado de la línea celular SV40MES 13 es incapaz de activar la autofosforilación de la tirosina del receptor Htk, apoyando el concepto de un ligando unido a membrana.

Ejemplo 2

Clonaje del ligando de Htk murino

La proteína receptor Htk-Fc se usa para clonar el ligando de Htk a partir de una librería de cDNA de SV40MES 13 transfectada transitoriamente en células COS-7, como sigue. Se construye una librería de expresión de cDNA a partir de la línea celular SV40MES 13 en el plásmido pRK5B (Holmes y col., Science 253:1278-1280 [1991]). Cincuenta grupos de aproximadamente 2000 cDNAs cada uno se transfectan inicialmente en células COS-7 y se analizan las células por su capacidad de unir el receptor Htk-Fc, usando una placa de autorradiografía, tal como se describe en Gearing y col., EMBO J. 8:3667-3676 (1989). De este análisis inicial resultan cinco grupos positivos y dos de esos grupos se subdividen gradualmente en sucesivas series de análisis hasta la obtención de clones individuales.

ES 2 264 127 T3

Los experimentos de unión competitiva se realizan usando uno de los clones positivos (#7), llamado pRK5B-ligando de Htk murino. En particular, las curvas de unión competitiva se generan tal como se describió anteriormente con respecto a SV40MES 13, usando monocapas de células COS-7 (5×10^5 células por pocillo) que se transfectan transitoriamente con el clon #7, usando el procedimiento de transfección con Dextrano DEAE (McMahan y col., EMBO J. 10:2821-2830 [1991]).

Las células COS-7 transfectadas (COS-7t) usadas a $2,5 \times 10^4$ células por punto de unión se analizan para determinar la unión en el estado de equilibrio de ^{125}I -HTk-Fc en presencia de cantidades variables de Htk-Fc no marcado, tal como se ha descrito anteriormente. La unión de Htk-Fc a células COS-7 transfectadas mostró una K_d de 500 pm (Figura 5B) indicando que el clon #7 es el ligando de Htk murino.

La secuencia de DNA y la secuencia aminoacídica deducida del ligando de Htk murino se muestran en las Figuras 1A-B. El peso molecular predicho de la proteína tras la ruptura del péptido señal es de 34 KD con un pI estimado de 8,9.

La secuencia derivada del clon #7 se confirma secuenciando otro clon independiente de 4700 pb que da la secuencia codificante idéntica. La secuenciación de DNA se realiza usando el equipo de secuenciación ABI Taq Dye Deoxy Terminator en un secuenciador automático de Applied Biosystems, modelo 373A. Se secuencian ambas cadenas de clones individuales en su totalidad.

La comparación de la secuencia del ligando de Htk y B61 (Bartley y col., *supra* y Holzman y col., *supra*) indica un 23% de similitud entre las moléculas. Sin embargo B61 no contiene un dominio transmembrana. No obstante, el grado de homología sugiere que el ligando de Htk y B61 pueden comprender miembros de una familia estructuralmente similar que se une a varios miembros de la familia del receptor de tirosina quinasas EPH/ELK.

Ejemplo 3

Distribución tisular del ligando de Htk

Se realizan análisis de transferencia de Northern con el objetivo de detectar la presencia del ligando de Htk en tejidos de ratón adulto, tejidos humanos adultos y tejidos fetales humanos. En particular, las membranas de transferencia de Northern se obtienen de Clontech (Palo Alto, CA) las cuales contienen $2 \mu\text{g}/\text{carril}$ de RNA poli A seleccionado de tejidos adulto de ratón, humano adulto y fetal humano. Las membranas de ratón se hibridan en 50% de formamida a 42°C a un cDNA del ligando de Htk murino marcado con P^{32} y se lavan en condiciones astrigentes (lavado final: 0,2 x SSC, 0,2% SDS a 60°C). Las membranas de tejido humano se hibridan en formamida al 35% a 42°C y se lavan en condiciones astrigentes, tal como se describió anteriormente.

El análisis de transferencia de Northern del RNA mensajero del ligando de Htk humano y de ratón en tejidos adultos y fetales muestra sólo un transcrito de aproximadamente 5,2 kb que presenta una amplia expresión en tejidos. En particular, el ligando de Htk está presente en grandes cantidades en el pulmón, el cerebro, el corazón y el riñón de ratón adulto, y en menor medida en el bazo, el hígado, el músculo esquelético y los testículos. El ligando se encuentra presente en el corazón, el cerebro, la placenta, el pulmón, el hígado, el músculo esquelético, el riñón, el páncreas, el bazo, el timo, la próstata, los testículos, el ovario, el intestino delgado y el colon en tejido adulto humano pero no es detectable mediante transferencia de Northern en leucocitos de sangre periférica. Finalmente, el transcrito se detecta en grandes cantidades en tejidos fetales humanos como el cerebro, pulmón, y riñones, y con menores niveles detectables en el hígado fetal humano.

También se realizan hibridaciones *in situ* para detectar la expresión del DNA del ligando de Htk. Embriones de ratón (día 13 del embrión) o cerebros del primer día después del nacimiento o ratones adultos se preparan para la hibridación *in situ* como sigue. Cerebros diseccionados en fresco o embriones fijados en formaldehído al 4% se congelan y seccionan en un criostato. Las secciones se montan en portaobjetos, se secan al aire y se almacenan a -70°C . La hibridación se realiza con ribosomas marcadas con P^{32} mediante una modificación de procedimientos publicados (Philips y col., Science 250:290-294 [1990]). Las sondas de cRNA sentido (control) y antisentido correspondientes a los nucleótidos 1597 a 2198 de la secuencia de DNA del ligando de Htk murino de las Figuras 1A-B se utilizan para la hibridación.

El día de la hibridación las secciones se llevan a temperatura ambiente, se fijan durante 10-30 minutos en formaldehído al 4% con o sin la adición de glutaraldehído al 1% en fosfato 0,1M (pH 7,2), se aclaran y se incuban en tampón de hibridación durante 1-3 horas a 42°C . El tampón de hibridación consiste en formamida al 50%, NaCl al 0,1M, 20 mM Tris HCl, pH 8,0, Solución Denhardt a 1X, sulfato de dextrano al 10%, 10 mM DTT. Las sondas se calientan a 95°C durante 3 minutos en presencia de un RNA transportador, tras lo cual se enfrían inmediatamente a 4°C . La sonda se añade entonces al tampón de hibridación en cada portaobjetos a una concentración final de $6,5 \times 10^6$ cpm/ml, y se dejan hibridar a 55°C durante la noche. Tras la hibridación, las secciones se tratan como sigue: 2 lavados en 2X SSC, 30 minutos de incubación en RNasa A, 2 lavados en 2X SSC, 1 hora de incubación a 55°C en 0,1X SSC, 2 lavados en 0,5X SSC, deshidratación en una serie de gradiente de soluciones de etanol (60%, 75%, y 85% de etanol que contiene acetato amónico 0,3 M, seguido por un 90% y un 100% de etanol), y se secan al aire a temperatura ambiente. Las secciones se exponen a una película (Beta-Max, Amersham) durante un período de 1 a 3 días tras los cuales éstas se sumergen en una emulsión (Amersham LM-1) y se exponen a 4°C durante 3 a 8 semanas. La película y la emulsión autorradiográficas se revelan mediante tratamiento con revelador y fijador fotográficos estándar.

ES 2 264 127 T3

La películas de autorradiografía se analizan mediante inspección visual sobre un transiluminador y bajo un microscopio estereoscópico. Las emulsiones autorradiográficas se analizan bajo un microscopio de campo claro y oscuro. La observación de los autorradiogramas revela la señal de hibridación en varias regiones de las secciones hibridadas con la sonda antisentido que no se observan en las secciones control hibridadas con la sonda sentido. Estas regiones incluyen, aunque no se restringe a ellas, varias regiones del cerebro anterior, incluyendo al region CA1 del hipocampo, el córtex cerebral (incluyendo los córtex piriforme y entorrinal y el caudate putamen. Se observa también una hibridación prominente en el córtex cerebelar. La hibridación es menos intensa o ausente en otras estructuras cerebrales incluyendo el septo, tractos de sustancia blanca tales como el cuerpo calloso, y numerosas regiones diencefálicas, mesencefálicas y mielencefálicas. En el embrión se observa una fuerte hibridación en (pero no confinada a) el pulmón en desarrollo, el tracto digestivo, hígado, riñón, glándulas salivares, vértebras, músculo, epitelio olfativo, epitelio del oído en desarrollo, dentro del ganglio de la raíz dorsal y trigeminal, meninges tanto del cerebro como de la médula espinal y en numerosas regiones del cerebro y de la médula espinal. En el cerebro en desarrollo, la expresión es notablemente intensa en el cerebro anterior en desarrollo, pero se observó una hibridación significativa en todas las subdivisiones mayores (telencéfalo, diencefalo, mesencefalo, metencefalo y mielencefalo).

Ejemplo 4

Inducción de la fosforilación de tirosina del receptor Htk por el ligando de Htk

Para determinar si el ligando de Htk estimula la fosforilación de Htk, y para confirmar además que el clon #7 descrito anteriormente codifica realmente un ligando del receptor Htk, se realizan los siguientes experimentos.

Se transfectan establemente células NIH 3T3 con el receptor Htk completo. Un fragmento de 4038 pb de cDNA generado por restricción con ClaI y XbaI que contiene 32 pb de la secuencia engarce de 37 pb del poliengarce de pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA) y la secuencia completa de 3969 pb del cDNA del receptor Htk se subclona en el vector de expresión pRIS (Genentech, Inc.) bajo el control del promotor LTR del virus del sarcoma de Rous. Las células NIH3T3 mantenidas en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con alta concentración de glucosa suplementado con un 10% de FCS se cotransfectan con el pRIS-receptor Htk y el pNeo (un vector derivado de SV40 que contiene un marcador de resistencia a neomicina) mediante el procedimiento del fosfato cálcico como se describió por Gorman y col., en DNA Prot. Engineer. Tech. 2:3-10 [1990]. Las colonias resistentes a neomicina se seleccionan 48 horas después de la transfección con Geneticina (Gibco/BRL) a 400 µg/ml. Catorce días después, se aíslan las colonias individuales resistentes, se expanden y analizan por citometría de flujo para la expresión del receptor Htk usando un antisuero policlonal de conejo. La especificidad de la respuesta se demuestran usando células 3T3 transfectadas con los plásmidos vacíos (control).

A continuación se co-incuban un millón de células 3T3 transfectadas (3T3-T) o no transfectadas (3T3) con 1 x 10⁶ células COS-7 transfectadas transitoriamente con el ligando de Htk (transfectadas con el clon #7 anteriormente indicado usando el procedimiento dextrano-DEAE tal y como se describe más arriba), células COS-7 transformadas control o 3 x 10⁶ de células SV40MES 13 a 37°C durante 30 minutos. Las células NIH 3T3 transfectadas y control se incuban también con un anticuerpo contra el receptor Htk humano (IC2-C2) producido por el hibridoma Anti-HpTK 5 (número de acceso del ATCC HB 11.583), conocido por inducir autofosforilación del receptor Htk.

Las células se lisan en tampón de lisis (NP-40 al 1%, EDTA 1 mM, NaCl 200 mM, Tris HCl 50 mM, pH 8,0, DMSF 2 mM, Na₃VO₄ 2,5 mM) y se inmunoprecipitan con un suero policlonal de conejo anti-HTK humano, producido como sigue. Los anticuerpos policlonales se generaron en conejos New Zealand White contra la proteína de fusión receptor Htk-Fc soluble descrita en Bennet y col., *supra*. Se emulsionan 4 µg de la proteína en 100 µl de PBS con 100 µl de adyuvante de Freund (adyuvante completo para la primera inyección e incompleto para todas las demás). Para la inmunización primaria y la primera inyección, la proteína se inyecta directamente en los nodos linfáticos poplíteos Sigel y col., Methods Enzymol. 93:3-12 [1983]. Para las inyecciones posteriores, la proteína se inyecta por vía subcutánea e intramuscular. Cada 3 semanas se administran 1,3 µg de proteína/Kg de peso corporal y se realiza el sangrado al cabo de una y 2 semanas tras cada administración. La especificidad del anticuerpo se demuestra mediante análisis de citometría de flujo de las células NIH3T3 transfectadas con el receptor Htk completo o con el vector vacío usando una dilución 1:200 del suero preinmune o suero contra el receptor Htk-IgG Fc.

Las células inmunoprecipitadas se analizan mediante geles SDS-PAGE de gradiente entre el 4-12%. A continuación, los geles se transfieren a filtros de nitrocelulosa y la membrana se hibrida y revela con el anticuerpo antifosfotirosina 4G10 (UBI, Lake Placid, New York). Tanto en las células COS-7 transfectadas con el clon #7, como en las SV40MES 13 el anticuerpo IC2-C2 induce la autofosforilación del receptor Htk tras la coincubación, confirmando que el ligando de Htk estimula la fosforilación de Htk y que el clon #7 codifica para el ligando de Htk.

Ejemplo 5

Clonaje del ligando de Htk humano

Con el objetivo de clonar el ligando de Htk humano, se prepara una librería de cDNA de cerebro fetal humano mediante técnicas descritos en general en Sambrook y col., *supra*. Una librería de pulmón fetal humano se adquiere en Clonetch (Palo Alto, CA). Estas librerías se analizan con un fragmento del extremo 5' del cDNA de ratón como sonda (es decir, residuos del 515 al 2.312 de las Figuras 1A-B) usando técnicas descritas en Sambrook y col., *supra*.

ES 2 264 127 T3

Se observa que la secuencia humana completa del ligando del Htk está presente en un solo clon aislado de la librería fetal de cerebro humano. El plásmido que contiene la secuencia nucleica que codifica el ligando de Htk humano se ha depositado en el American Type Culture Collection (ATCC) el 24 de Junio de 1994 bajo el n° de acceso 75.820. La secuencia nucleotídica y aminoacídica del ligando de Htk humano se muestra en la Figura 2. La secuencia codifica para una proteína que presenta un peso molecular predicho de 34 kD tras el corte del péptido señal. Los ligandos humanos y de ratón muestran una identidad de un 96% en la secuencia aminoacídica, demostrando un nivel elevado de conservación entre especies. Esto concuerda con la homología entre el receptor Htk humano y su homólogo murino, myk-1 que son idénticos en un 91% a nivel de secuencia aminoacídica.

10 Depósitos

Los siguientes cultivos se han depositado en la American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC):

15	Hibridoma	N° ATCC	Fecha de depósito
	Anti-HpTK5	HB 11.583	15-Marzo-1994
	Plásmido del ligando de Htk humano	ATCC 75.820	24-Junio-1994

20 Estos depósitos se realizaron según las indicaciones del tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines de Procedimiento en Materia de Patentes y sus Regulaciones (Tratado de Budapest). Este asegura el mantenimiento de cultivos viables durante 30 años a partir de la fecha de depósito. Los depósitos estarán disponibles por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest, y sujetos al acuerdo entre Genentech y ATCC, lo que asegura una disponibilidad de los cultivos para el público permanente y no restringida tras la expedición de la patente americana pertinente o tras poner al descubierto públicamente cualquier solicitud de patente americana o extranjera, cualquiera que sea la primera, y asegura la disponibilidad de los cultivos a aquel que determine el Comisionado de Patentes y Marcas Registradas Americana U.S. para ser autorizado a ello de acuerdo con la ley de patentes 35 USC § 122 y las normas del Comisionado que lo regulan (incluyendo 37 CFR§1.14 con particular referencia a 886 OG 638).

35 El cesionario de la presente invención consiente que los cultivos sean reemplazados sin demora bajo notificación con un espécimen viable del mismo cultivo si dichos cultivos murieran o se perdieran o destruyeran cuando se cultiven en condiciones adecuadas. La disponibilidad de las cepas depositadas no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención contraviniendo los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con las normas de la patente.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Molécula de proteína aislada que se une al receptor Htk y que induce la fosforilación de dicho receptor Htk, comprendiendo la molécula una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo consistente en:
- (a) una secuencia aminoacídica que presenta una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia para el ligando de Htk murino maduro mostrada en SEC ID NO:2;
 - 10 (b) una secuencia aminoacídica que presenta una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia para el ligando de Htk maduro humano mostrada en SEC ID NO:4; y,
 - (c) la secuencia SEC ID NO:2 o la SEC ID NO:4; que presenta una única substitución aminoacídica conservadora preferida, tal como se define en la Tabla 1.
- 15 2. Molécula de proteína aislada según la reivindicación 1, en donde la molécula comprende la secuencia aminoacídica para el ligando de Htk murino maduro de la secuencia SEC ID NO:2 ó la secuencia aminoacídica para el ligando de Htk humano maduro de SEC ID NO:4.
- 20 3. Ligando de Htk soluble aislado que se une al receptor Htk y que comprende una secuencia aminoacídica seleccionada del grupo consistente en:
- (a) una secuencia aminoacídica que presenta una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia para el ligando de Htk murino maduro y soluble; en donde dicha secuencia aminoacídica para el ligando de Htk murino, maduro y soluble son los aminoácidos del 28-227 de la secuencia SEC ID NO:2;
 - 25 (b) una secuencia aminoacídica que presenta una secuencia con al menos un 80% de identidad con la secuencia para el ligando de Htk humano, maduro y soluble; en donde dicha secuencia aminoacídica para el ligando de Htk humano, maduro y soluble son los aminoácidos del 25-224 de la secuencia SEC ID NO:4; y,
 - 30 (c) las secuencias correspondientes a los aminoácidos 28-227 de la SEC ID NO: 2; o a los aminoácidos 25-224 de la SEC ID NO:4 que presentan una única substitución aminoacídica conservadora preferida, tal como se define en la Tabla 1.
- 35 4. Ligando de Htk soluble según la reivindicación 3 que presenta la secuencia aminoacídica para el ligando de Htk murino maduro y soluble de los aminoácidos 28-227 de la secuencia SEC ID NO:2 o el ligando de Htk humano maduro y soluble de los aminoácidos 25-224 de la secuencia SEC ID NO:4.
- 40 5. Polipéptido quimérico que comprende una secuencia aminoacídica que codifica el ligando de Htk soluble según la reivindicación 3 o la reivindicación 4 fusionado con la secuencia de una inmunoglobulina.
6. Polipéptido quimérico según la reivindicación 5 que comprende una fusión de una secuencia del dominio extracelular del ligando de Htk con una secuencia de un dominio constante de inmunoglobulina.
- 45 7. Polipéptido quimérico según la reivindicación 6, en donde dicha secuencia de un dominio constante corresponden con la de una cadena pesada de inmunoglobulina.
8. Polipéptido quimérico que comprende la molécula proteica aislada según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, fusionada con una secuencia de un polipéptido etiqueta epitópica.
- 50 9. Composición que comprende la molécula proteica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 55 10. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica una molécula de proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
11. Molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 10 que codifica la secuencia aminoacídica para el ligando de Htk murino maduro de la secuencia SEC ID NO:2 o la secuencia aminoacídica para el ligando de Htk humano maduro de la secuencia SEC ID NO:4.
- 60 12. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 10 que presenta una secuencia nucleotídica seleccionada del grupo consistente en:
- (a) residuos 242 al 1168, inclusive, de la secuencia nucleotídica mostrada como SEC ID NO:1, o residuos del 104 al 1030, inclusive, de la secuencia nucleotídica mostrada como SEC ID NO:3
 - 65 (b) una secuencia correspondiente a una de las secuencias de (a) en el ámbito de degeneración del código genético; y

ES 2 264 127 T3

(c) una secuencia que se hibrida con una secuencia complementaria a la secuencia de (a) o (b) en condiciones astringentes y que codifica una molécula proteica que induce la fosforilación del receptor Htk.

5 13. Molécula de ácido nucleico aislada según la reivindicación 10 que codifica la secuencia aminoacídica para el ligando de Htk murino maduro y soluble de los aminoácidos 28-227 de la secuencia SEC ID NO:2 o la secuencia aminoacídica para el ligando de Htk humano maduro y soluble de los aminoácidos 25-224 de la secuencia SEC ID NO:4.

10 14. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.

15 15. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 14.

16. Procedimiento para la preparación de una molécula proteica que induce la fosforilación del receptor Htk que comprende el cultivo de una célula huésped transfectada para expresar la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 15 y la recuperación de dicha molécula proteica del cultivo de la célula huésped.

20 17. Procedimiento para activar “*in vitro*” un dominio tirosina quinasa de un receptor quinasa transmembrana de hepatoma (receptor Htk) que comprende poner en contacto un dominio extracelular del receptor Htk con el ligando de Htk según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

25 18. Anticuerpo monoclonal que se une al ligando de Htk según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

30

35

40

45

50

55

60

65

1 CCACAGCGCTCCAGCGCTGAGGGACGGCCAGCGGAGCCACCTGGCCCTGGCGAGCCAGCCAGCCGGGAGCCGGCCGGGCTGTCCGCCCGGAGGAGATTTGGGGGT
 101 CCGTGGCCCGGGCGGTCCCAACGGGTCCCGGAGTGGCGAGAACTGGGAGCGCGCTTGGCCATGGCCATGGCCCGGTCCAGGAGGGGACTCTGTGTGGAAAT
 K A M A R S R R D S V W K Y
 20 C W G L L M V L C R T A I S R S I V L E P I Y W N S S M S K F L P
 201 ACTGTGGGACTTTTGTGATGGTTTTGTCCAGACTGCCATCTCCAGATCGATAGTTTTPAGAGCCCTACTGGAAATCTCTCGAACTCCNAATTTCTACC
 G G L V L Y P Q I G D K L D I I C P K V D S K T V G Q Y E Y Y K
 60 70 80
 301 CGGACAGGCGCTGTACTATACCCAGATAGGAGACAAATTTGGATATATTTGCCCAAGTGGACTTAAACTGTGGCCAGTATGAAATATATATAA
 V Y H V D K D Q A D R C T I K K E N T P L L N C A R P D Q D V E F T
 90 100 110
 401 GTTATATGGTTGATAAAGACCAGCAGACAGATGCCACAATTAAGAGGAGGAAATACCCGCTGCTCACTGATGAGCCAGCCAGACCAAGATGTGAAATYCA
 I K F Q E F S P N L W G L E P Q K W K D Y Y I I S T S N G S L E G
 120 130 140
 501 CCTCATGATTCAGAAATTCAGCCCTAACCTCTGGGTCTAGAAATTCAGAGAACAAAGATTACTACTCATATATATCTACATCAAAATGGGTCTTTGGAGGG
 L D N Q E G G V C Q T R A H K I L H K V G G D A S S A G S A R N H
 150 160 170 180
 601 CCTGGATRACCGAGGGGGGTGTCAGACAGCCAGCCATGAGATCTCATGAAAGTGGACAGATCCAGTTCTGCTGGATCAGCCAGGAAATCAC
 G P T R R P E L E A G T N G R S S T T S P F V K P N P G S S T D G N
 190 200 210
 701 GGTCCACAGACCTCCAGAGCTGTGTACAAATGGGAGATTCACACAGTCCCTTTGTGAGCCAAATCCAGTTCTAGCCCGGATGCCA
 S A G H S G N N L L G E V A L F A G I A S G C I I F I V I I I T
 220 230 240
 801 ACAGCCGGGGCATTTCCGGACAAATCTCTGGTTCCGAGTGGCCCTTATCCAGGATCCCATCCAGATGCCATCATCTTCATCGTCATCATCATCAC

FIG.1A

250
 L V V L L L K Y R R R R R R R K H S P O H T T L S L S T L A T P K R 280
 901 TTTGGTGGTCTCTCTCMAAGTACCAGGAGACCCGCAACACTCTCCACAGCACAGACAGCTGTCTCTGACACACTGGCCACGCCCCNAGGGA

 290
 G G N N G S E F S D V I I P L R T A D B V F C P H Y E K V S G D Y 310
 1001 GGTGGCAACAAATGGCTCGAGGCCCACTGACGTTATACATACCACTAAGGACTGACAGCACAGCTCTTCTGCCCCACACTACGAGAGGTTCAAGCGGGAAGCT

 320
 G H P V Y I V Q E M P P Q S P A N I Y Y K V O 330
 1101 ATGGCACCCGTTATCATCTGTGCAGGAGATGCCCCACAGATGCTGCCAACATTTACTACAGGTTCTGAGGCTTGAGACCTGCCCCCTCCCAAGGGAAC

 1201 TCCACCTTGTCTTGGGCACCCAGGGACTGCTGTGAGCTGTGCTGTGGGGGACAGGATGCCCTCTGGAGAGCCCTGGATCTGGACAGTTTGTGTGTCTGT

 1301 GCTTTTCCGACCCCTGGGACCCACAGACCCCTCCCGGAAAGCTGGAGACTGCTAGGAGATCCCACTTGGACTGTGCGCGGCCCAAGCGGAGCTCCAGGCC

 1401 ATGCACCCAGCCACTCAGGCCCTCTGCAGAGCCCGGGAGGACACCGTTAGCCCTATGGATGGCCGACAGCCATCTTAGGAGAGAGGTTGCGCAGCCAGGCCGGC

 1501 CCTGCTCCACGTTTCTGTGCGGTGCACACTGBACTTATCACTTGGACCTCGGGTTCGTAAGGTTTTCAGATCTCTAATGTTTGTCTACTCTCACT

 1601 CACTCACTCACTCTCTTCTTCCAGGGCTCTGCAGCAAACTCCCTAGACCCCTCACTCCACGTACTGATATTACGGGACACTCAACCACAGTGT

 1701 CCCAGCTCCACCCCTTACCCAGATCAAAATTAGATGGGTTATTAGGTAAGAGAGAACCCCTGCTTGCCTGAGGCGGGTCAAGCCGGAGCGCAGATGTG

 1801 TGGAGGATGAGGAGGTGTGCTGCTGCCACGGCAGGTCAAGGCTGCTTCTGCCCTGGAGCATAGTAGGAGATGCAGGAGGGAATAATGATATGCTTTTGGT

FIG.1B


```
3101  CATTFTGCTTCTGAAATGGGAGGAAATAAAATAAATTGTAAATGACAGCAATTTGAAAGGTTCTCAGACCCTCCAGTGTACTCTGCCAAAAAATGAGTTGTCCACAGA
3201  GATTATTCCTACTTCTCAAAACCTGAAAATGATGTTGGTTCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT
3301  ATATATCTCCAGTATAATATAATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATATAT
3401  AACCTCTCCTCGGCATTCACACAAGAGTTTCTTGTAAAGCCATCAAAAAGTTAAATTCTAAGGGGAGAGGGATGAGCCGGGGAGACATGGGAAAACCGTCTGAT
3501  TTTAATGAAATCAAAATGCTGTGTATCGGTTGGCTACGTTTTGGTTCTATGCTAAACTGTGAAAGAAATCGGATGAAATTTGATGAAAGAGTTGAGTTACCTGC
3601  AACCCATTGAGAAAGTCTCTGTGCGTCTGTTTTGCTGCTGGTGCAGAAAATGACAATCTACCACCTGTTATTTTGGAGTTTGGTTTCAGCTTTGGAAA
3701  GTTACTGTAATAAGCCTTGTGTAATATCAATCCCTAGTCACTGTACTTCGGAGCTTCAGCCATCGTGTGTTAAAGTGAAGACGCCGTGTAATAATAGGTTCCAGAT
3801  CTTACCGTCTATGGATTCGGGTGTACAGTAGCCCTTATTCACCCTTTTAAATAAAAATACACATGAAACGAGACAGTAATGGCTTTTCTTACCAGATTG
3901  TGTACATGAGCAATGTTGGTTTTTTATAAAGTCTAAGCAAGATGTTTGTATAAAAATCTGAAATTTTGCATGTAATTTAGCTACAGCTTTTAAACGGCAGT
4001  GTCATCCCCTTTGCACGTAAATGAGGAAAAAAAAGGATAAAAAGGTTGCCAAATTTGCTGCTATATTTGTCGCCGTAATTAATGTACCATGAAATTTATTTT
4101  AATTTGTTGTCCAAATTTGTAAAGTAACACAGTATTAAGCTTGAGTTATAAATAATTTTTTCTTTGTTTTTAAATGCTGTCATAGGTTTTTTTTTTTAA
4201  TCTGCTTTAGTTCCACATGACAGTTAAGCCCAAGAAATGAGATCCGAGCAGCCACAATCCAGCTGTTCAAAAATGAAATTTGTTCTTAAAAAAATAAA
4301  ATATTTTTTCTATGGAAAAAAAATAAAAGGCGGCGCGC
```

FIG. ID

1 CTCGAGCGGAGCTGGAGTGGCTTCGCCAATGGCTGTGAGAGGACTCCGTTGGAGTACTCTGGGGTGTTCAGTGGTTTTATGCCAGAACTGCC 20
 M A V R R D S V W K Y C W G V L M V L C R T A
 30
 I S K S I V L E P I Y W N S S N S K F L P G Q G L V L Y P Q I G D K 50
 101 ATTTCCAAATCGATAGTTTTAGAGCCCTATCTATTGGAATTCCTCGAACTCCAAATTCCTACCTGGACAGACTGGTACTATATCCACAGATAGGAGACA
 L D I I C P K V D S K T V G Q Y E Y Y K V Y M V D K D Q A D R C T 80
 201 AATTTGGATATTATTTGCCCCCAAGTGGACTTAAACTGTTGGCCAGTATGATATATTAAGTTTATATGGTTGATTAAGACCAGCAGATGCAC
 L K K E N T P L L N C A K P D Q D I K F T I K F Q E F S P N L W G 110
 301 TATTAAGAGGAAATACCCCTCCTCAACTGTGCCAAACAGACCAGATATCAAAATTCACCAATCAAGTTTCAAGATTCAGCCCTAACCTCTGGGGT
 L E F Q K N K D Y Y I I S T S N G S L E G L D N Q E G G V C Q T R A 140
 401 CTAGAAATTCAGAGAACAAAGATTATTACATATATCTACATCAAAATGGTCTTTGGAGGGCCCTGGATACCAGAGGGAGGGGTGTGCCAGACAGAG
 M K I L M K V G Q D A S S A G S T R N K D P T R R P E L E A G T N 180
 501 CCATGAAGATCTCATGAAAGTTGGACAAGATCGAAGTTCTGCTGGATCACCCAGGATTAAGATCCAAACAGACCTCCAGAACTAGAGCTGGTACAAA
 G R S S T T S P F V K P N P G S S T D G N S A G H S G N N I L G S 210
 601 TCGAAGAGTTCGACAAACAGTCCCTTTGTAAACCAATCCAGGTTCTAGCACAGAGCGCAACAGCCCGGACATTCGGGGAACAAACATCCTCGGTCC
 E V A L F A G I A S G C I I F I I I I T L V V L L L K Y R R R H R 250
 701 GAAGTGGCTTATTTGCAGGGATTCCTTCAGGATGCATCTCATCTCATCCGCTGGTGGTCTCTCTGCTGAAGTACCCGAGGAGACACA
 K H S P Q H T T T L S L S T L A T P K R S G N N G S E P S D I I 280
 801 GGAAGCACTGCCCGCAGCACACCGACCCAGCTGTGCTCAGACACTGGCCACACCCAAAGCGCAGCGGCACAAACAGCGGCTCAGAGCCCGAGTACATTAT

FIG.2A

310
 I P L R T A D S V F C P H Y E K V S G D Y G H P V Y I V Q E M P P
 901 CATCCCGCTAAGGACTCCGGACACGGTCTTCTGCCCTCACTACGAGAGGTTCAGCGGGACTACGGGCACCCGGTGTATCATCTGTCCAGGAGATGCCCCCG
 330
 Q S P A N I Y Y K V O
 1001 CAGAGCCCGCGAACAATTTACTACAAGGTCTGAGAGGGACCCCTGGTGGTACTGTGTCTTTCCACGAGGACACCTAATGTCCCCGATGGCCTCCCTTGGAGGGT
 1101 TTGAGGCCCGCTGCTGGAGAAATTGACTGAAAGCACAGCACCGGGGGAGAGGGACACTCCCTCCGAAAGAGCCCGCTGGACAGCTTACCTTAGTTC
 1201 TTGTAGCATTGGGCTTGGTGAACACACACAGCCTCCCTGGAAAGCTGTGCAAGAGAGCCCAATTCGGACTGCTGTGTGCGGCTCCACCGTCTCCT
 1301 CCTCGAAGCCATGTGCTGCGGTCACTCAGGCCCTCTGCAAGCCAAAGGAAAGACAGTGTGTTTGTGACCGAAGAGGGCTGTGAGCATCTCTGGCAGGTGCCCC
 1401 AGGATGCCACGCCCTGGAAAGGGCCGGCTTCCTCCCTGGGGTGCATTTCCCGGCTGCAATCCCGGACTTGTCAACGAACTCGGGCTTAGGTTAAGGTGTGC
 1501 AAAGATCTCTAGAGTTTAGTCTTACTGTCTCACTGCTTCTGTTACCAGGGCTCTGCAAGCACCCTCACTGAGACCCTCCACTCCACTGTGCATCACTCA
 1601 TGGAACTCAATGTCTGGAGTCCCTCTCCAGCCGCTGGCAACACAGCTTCAAGTCCATGGGTAAATCCGTTTCAATAGAAATTTGTGTTTGTCTAACAAAGGTTG
 1701 CCCTTTAGCCAGATGCTAGGCTGTCTGCGAAGAAAGGCTAGGAGTTCTAAGAAAGGAGTGGGCTGGGGAAAGGGCTGGCTGCANATTTGCAGCTCACTGCTG
 1801 CTGCCCTCGAAACAGAAAGTTGGAAAGGAAAJAAAGCAATTAAGGTAGCACAGCACTTTGGTFTTCTGTAGATCGAAAGGCCAGTAGGAGACAC
 1901 GACAGCACACAGTGGATTCCAGTGCATGGGAGGGCGGTCCAGCGACTCGAG

FIG.2B

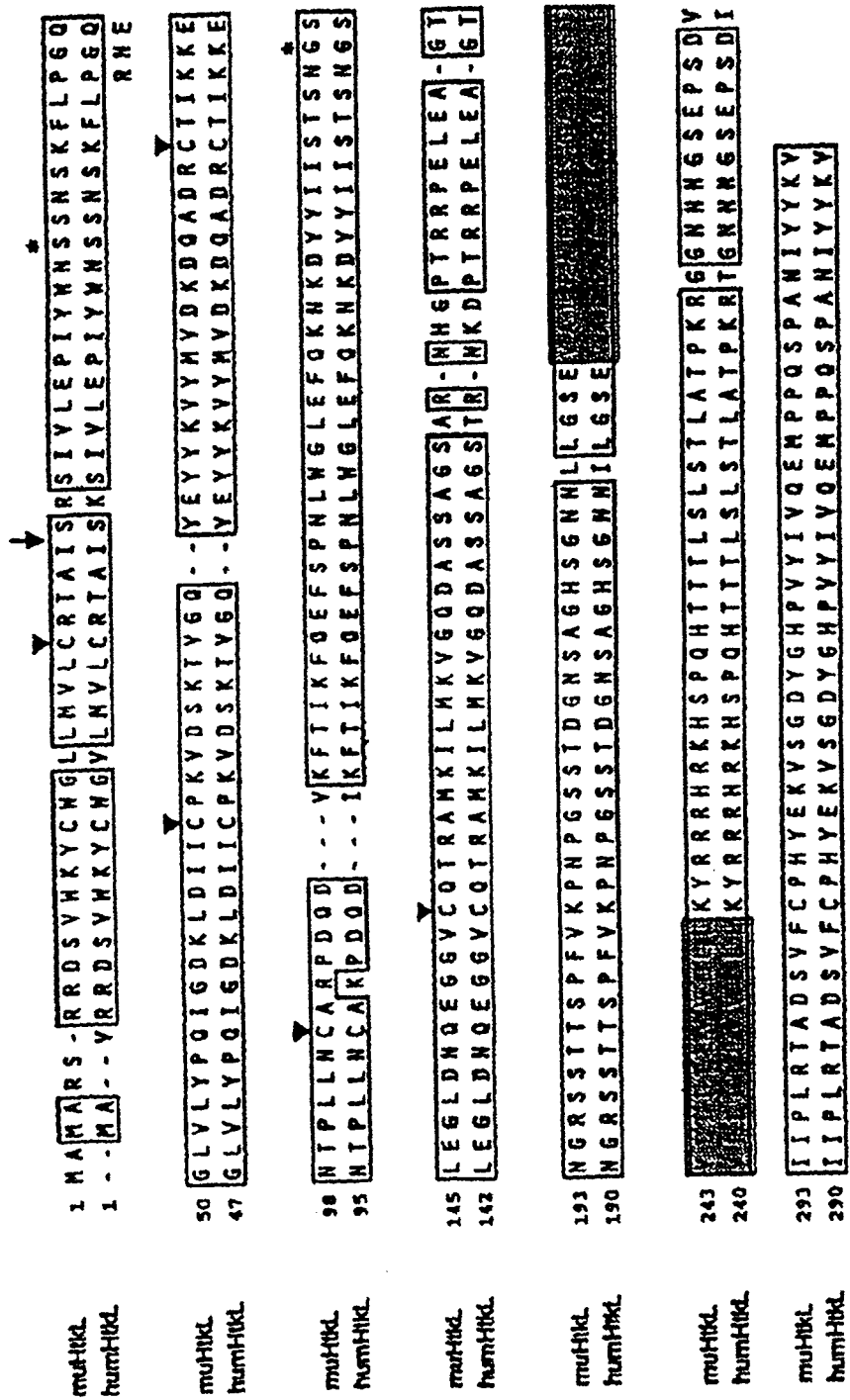


FIG. 3

1 TCGGGTCCACCCCGCCAGGAGAGTACAGCTGGGGGGGAGGGCCGCAAACTCAGTTGGGATCCTACCGAGTGGGGCCCATGGAGCTCCG M E L R
10 V L L C W A S L A A A L E E T L L N T K L E T A D L K W V T F P Q 30
101 CGTGTCTGTCTGGCTTGGCCGAGCTTGGAAAGAGACCCTCTGAACACAAAATTGGAAACTGCTGATGAGTGGTGGATTCCTCCAG 70
40 V D G Q W E E L S G L D E E Q H S V R T Y E V D V Q R A P G Q A H 60
201 GTGGAGGGGAGTGGAGCACTGAGCGGCTGGATGAGCAAGCACAGCCCTGGACCTAGCAAGTGTGTGACGTGCAGGCTGCCCGGGCCAGGGCCC 100
80 W L R T G W V P R R G A V H V Y A T L R F T M L E L S L P R A C 100
301 ACTGGCTTCGACAGTGGTCCACGGGGGGGGCTCCAGGTGACGCCACGGTGGCTCACCATGGCTGAGTGCCTGCTCCCTGGCTGGGGCTGG 120
110 R S K E T F T V F Y Y E S D A D T A T A L T P A W M E N P Y I K 130
401 CGGCTCCTCAAGGAGACTTACGGTCTTCTACTATGAGCGGATGGCACAGGCCACGGCCCTCACGCCAGCTGATGGAGAACCCCTACATCAAG 140
150 V D T V A A E H L T R K R P P C A E A T G K V N V K T L R L G P L S K 170
501 GTGACAGGTGGCGGAGCATCTCACCGGMAAGCCCTGGGGCGGAGGCCACCGGGAAAGTGAATGCAAGAGGCTGCGCTGGGAGCGGCTGAGCA 180
180 A G F Y L A F Q D Q G A M A L L S L H L F Y K K A Q L T V N L 200
601 AGCTGGCTTACCTGGCTTCCAGGACCAGGCTGCTGCATGGCCCTGCTATCCCTGCACCTTCTACAAAAGTGGCCGAGCTGACTGTGAACCT 210
210 T R F P E T V P R E L V V P V A C S V V D A V P A P G P S F S L 230
701 GACTGGATCCGGAGACTGCTGGGAGCTGTTGTGGCTAGTGGTGGATGGTCCCGCCCTCCCGCCCTCCCGCCAGCCCTC 240
240 Y R E D G Q W A E Q P V T G S A P G F E A A E G N T K R A 260
801 TACTCCCTGAGGATGCCAGTGGCCGACAGCCCTCACGGCTGCAGCTGTGCTCCGGTTCAGGCAGCTGAGGGGAACACCAAGTGGCGGCT 280
280 A Q C T F K P L S G E G S Q P P A N S H S N T I G S A V Q 300
901 GTGCCAGGACCTTCAAGCCCTTCAAGAGAGGGTCTCCAGCCATGCCAGCCATAGCCACTTACACATTTGGATCAGCCCTTGGCCAGTG 310
310 R V G Y F R A R T D P R G A P T T P P S A P R S V V S R L N G S 330
1001 CCGGTGGGTACTTCCGGCACGACAGACCCCGGGTGCACCTTGCACCCCTCCTTGGCTCCCGGAGGCTGGTTCCCGCCCTGAACGGCTCC 340
340 S L H L E W S A P L E S G G R E D L T Y A L R R E R P G C S A 360
1101 TCCTGCACCTGGAATGGAGTGGCCCTGGAGTGTGGTGGCGAGACCTCAGCTACCCCTCCGCTCCGGAGTGGCACCCGGAGGCTCTCTG 370

FIG.4A

1201 P ③ G G D L T F D P G P R D L V E P W V V V R G L R P D F T Y T F 380 400
 CGCCCTGGGGGAGACTGACTTTTGGACCCCGCCCGGACCTGGTGGACCCCTGGTGGTTCGAGGGCTAGCTCCTGACTTACCTATACCTT 410 430
 1301 E V T A L N G V S S L A T G P V P F E P V N V T I T D R E V P P A V 420 440
 TGAGTCACTGCATTGAACGGGTATCCCTGCTTAGCCACGGGCCCTCCCATTTGAGCCTGTCAATGTACCACTGACCGAGAGTACTCTCTGGAGTG 440 470
 1401 S D I R V T R S S P S S L A W A V P R A P S G A V L D Y E V K Y 450 460
 TCTGACATCCGGGTGAGCGGCTCACCAGCAGTTGAGCCTGGCTGGCTTCCCGGGGACCCAGTGGGGTCTGCTGGACTAGGAGGTCAAAAT 460 500
 1501 H E K G A E G F S S V R F L K T S E N R A E L R G L K R G A S Y L 470 480
 ACCATGAGAGGGCCGAGGTTCCACAGCCTCGGTTCTGAAGAGCTCAGAAAACCGGGGACAGCTCGGGGGCTGAAGCGGGGAGCCAGCTACCT 480 520
 1601 V Q V R A R S E A G Y G P F G Q E H H S Q T Q L D E S E G W R E Q 510 520
 GGTCCAGGTACGGGGCTCTGAGGGCCCTACGGCCCTCGGGCAGGAGTACAGCCAGCCCACTGGATGAGAGCGGGCTGGCGGGAGGAG 520 570
 1701 L A L I A G T A V V G V L V L V I V V A V L C L R K Q S N G R E 540 550
 CTGGCCCTGATTCGGGACGGCAGTCTGGGGTGTGGTCTGGTCTGGTTCATTGTGGTCCGAGTTCCTGCCCTCAGGAAGCAGAGCMAATGGGAGAG 550 600
 1801 A E Y S D K H G Q Y L I G H G T K V Y I D P F T Y E D P N E A V R 580 590
 AAGCAGAAATTCGGACAAACACGGGACATCTCATCGGACATGGTACTAAGGTCTACATCGACCCCTTCACTTATCAAGACCCCTAATGAGGCTGTGAG 600 630
 1901 E F A K E I D V S Y V K I E E V I C A G E F G E V C R G R L K A P 610 620
 GGAATTTGCAAAGAGATCGATGTCCTACGTCAAGATTGAAGAGTGTGGTGCAGTGTGGGAGTGTGGGGGGGGCTCAAGGCCCA 620 660
 2001 G K K E S C V A I K T L K G G Y T E R Q R R E F L S E A S I M G Q F 640 650
 GGGAAAGAGGACAGTCTGTGGCAATCAAGACCCCTGAAGGGTGGTACACGGAGCGGGCCGCTGAGTTTCTGAGGAGGCCCTCATGAGGGCAGT 650 700
 2101 E H P N I I R L E G V V I N S M P V M I L T E F H E N G A L D S F 680 690
 TCGAGCACCCCAATATCATCCGGCTGGAGGGCGTGGTCCACCAACAGCATGGCCGCTCATGATTCACAGAGTTCATGAGAACCGGGCCCTGGACTCCTT 690 730
 2201 L R L N D G Q F T V I Q L V G M L R G I A S G M R Y L A E M S Y V 710 720
 CCTCGGGCTAAACGACGGACGTTCCACAGTCCAGCTCTGGGGCATGCTGGGGGGCATCGCCCTGGGGTACCTTGGCCGAGATGAGTACGTC 720 770
 2301 H R D L A A R N I L V N S N L V C K V S D F G L S R F L E E N S S D 740 750
 CACGGAGACCTGGCTGCTGGAAATCTAGTCAACAGCACCCTCTGCAAGTGTCTGACTTGGCCCTTCCCGGATTCCTGGAGGAGAACTCTTCCG 750 770

FIG. 4B

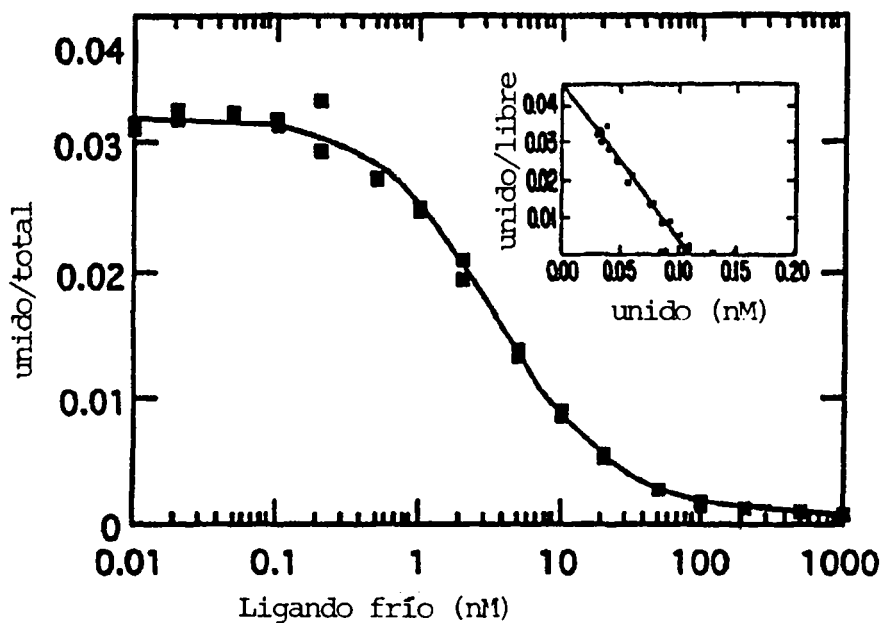


FIG. 5A

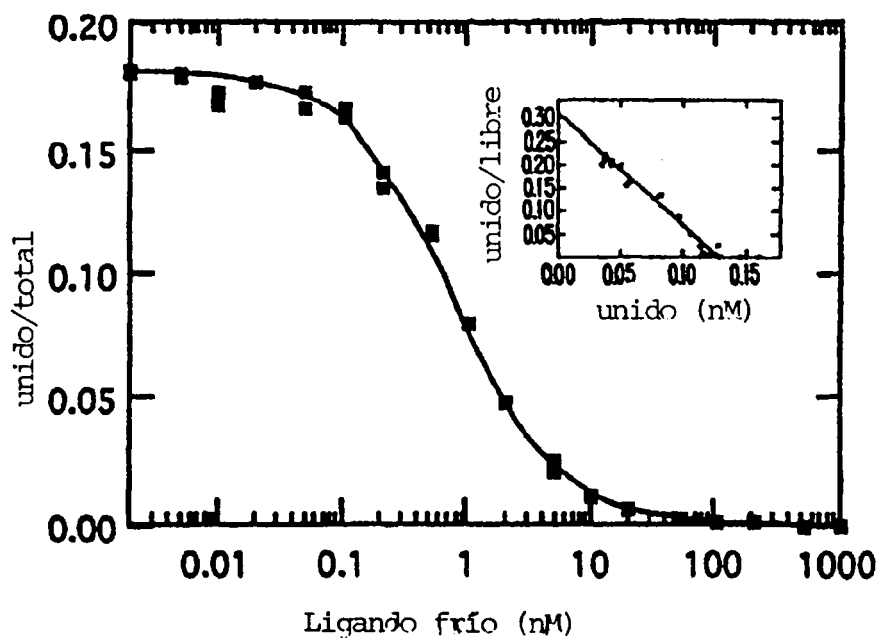


FIG. 5B

ES 2 264 127 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: Genentech, Inc
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: LIGANDO DE HTK
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7
- 10 (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Genentech, Inc.
 - (B) CALLE: 460 Point Sant Bruno Blvd.
 - 15 (C) CIUDAD: South San Francisco.
 - (D) ESTADO: California
 - (E) PAÍS: USA
 - (F) CÓDIGO POSTAL: 94080
- 20 (v) FORMATO INFORMÁTICO LEGIBLE:
- (A) TIPO MEDIO: 5,25 pulgadas, disquetera de 360 Kb
 - 25 (B) ORDENADOR: Compatible IBM PC
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) PROGRAMA: patin (Genentech).
- (vi) FECHA DE SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE SOLICITUD:
 - (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (vii) FECHA PREVIA DE SOLICITUD:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE SOLICITUD:
- 40 (viii) ABOGADO/AGENTE DE PATENTES:
- (A) NOMBRE: Lee, Wendy M.
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 00.000
 - 45 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/SUMARIO: 902PCT
- (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
- 50 (A) TELÉFONO: 415/225-1994
 - (B) FAX: 415/952-9881
 - (C) TELEX: 910/371-7168.

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA SEC ID NO: 1

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 4342 bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 60 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NO: 1
- 65

ES 2 264 127 T3

CCCACGCGTC CGCGCGCGCT GAGGGACGCG CAGGGTGAGC GCACCTGGCC 50
 TCGGCGACCG CGGGAGCGGC GCGGCGTGTG CGCCCCGGAG GATTGGGGGT 100
 5 CGCTGCCCCG GGCCGGTCCC AACCGTCCC GGAGTGCACA GAACTGGGAG 150
 CGGCTTGGGC ATGGCCATGG CCCGGTCCAG GAGGGACTCT GTGTGGAAGT 200
 10 ACTGTTGGGG ACTTTTGATG GTTTTGTGCA GAACTGCGAT CTCCAGATCG 250
 ATAGTTTTAG AGCCTATCTA CTGGAATTCC TCGAACTCCA AATTTCTACC 300
 15 CGGACAAGGC CTGGTACTAT ACCCACAGAT AGGAGACAAA TTGGATATTA 350
 TTTGCCCCAA AGTGGACTCT AAAACTGTTG GCCAGTATGA ATATTATPAA 400
 20 GTTTATATGG TTGATRAAGA CCAAGCAGAC AGATGCACAA TTAAGAAGGA 450
 GAATACCCCG CTGCTCAACT GTGCCAGACC AGACCAAGAT GTGAAATTCA 500
 25 CCATCAAGTT TCAAGAATTC AGCCCTAACC TCTGGGGTCT AGAATTTTCCAG 550
 AAGAACAAG ATTACTACAT TATATCTACA TCAAATGGGT CTTTGGAGGG 600
 30 CCTGGATAAC CAGGAGGGAG GGGTGTGCCA GACAAGAGCC ATGAAGATCC 650
 TCATGAAAGT TGGACAAGAT GCAAGTTCTG CTGGATCAGC CAGGAATCAC 700
 35 GGTCCAACAA GACGTCCAGA GCTAGAAGCT GGTACAAATG GGAGAAGTTC 750
 AACAAACAAGT CCCTTTGTGA AGCCAAATCC AGGTTCTAGC ACCGATGGCA 800
 40 ACAGCGCGGG GCATTCCGGG AACAAATCTCC TGGGTTCCGA AGTGGCCTTA 850
 TTCGCAGGGA TCGCATCAGG ATGCATCATC TTCATCGTCA TCATCATCAC 900
 45 TTTGGTGGTG CTGCTGCTCA AGTACCGCAG GAGACACCGC AAACACTCTC 950
 CACAGCACAC GACCACGCTG TCTCTCAGCA CACTGGCCAC GCCCAAGCGA 1000
 50 GGTGGCAACA ACAATGGCTC GGAGCCCAGT GACGTTATCA TACCACTAAG 1050
 GACTGCAGAC AGCGTCTTCT GCCCGCACTA CGAGAAGGTC AGCGGGGACT 1100
 55 ATGGGCACCC GGTGTACATC GTGCAGGAGA TGCCCCCACA GAGTCCTGCC 1150
 AACATTTACT ACAAGGTCTG AGGCCTGAGA CCTGCGCCTC CCAAGGGAAC 1200
 60 TCGCACCTTG TTCTTGGGCA CGCAGGGACT GCCTGAGCCT GGCTGTGGGG 1250

65

ES 2 264 127 T3

GCAGGATGCC TCCTGGAAGA GCCTGGATCT GGACAGTTTT GTAGTCTGTA 1300
5 GCTTTTCCGA CCCTGGGGAC CACAGACCCT CCCCGBAAGC TGGAAGACTG 1350
CTAGGAGATC CCCACTTGGA CTGCCGCGGC CCCACGCGGA CCTCCAAGCC 1400
10 ATGCACCCAG CCACTCAGGC CTCTGCAGAG CCCGGGGAGG ACACGGTAGG 1450
CTATGGATGG CGCAGCAGCA TCTTAGGAGA AGGTTGCGCA CCAGGCCGGC 1500
15 CCCTGCCTCC ACGTTTCCTG CCGTGCACAC TGGACTTATC ACTTGGACCT 1550
CGGGTTCAGT AAGGTTTTCA AAGATCTCTA GTGTTTAGTC CTCACTCACT 1600
20 CACTCACTCA CTCACTCCTT CTCTGCCAG GGCTCTGCAG CAAACTCCCT 1650
AGACCCCTCA CTCACGTAC TGCATCATT CGGGACACTC ACCACAGAGT 1700
25 CCCAGCTCCA CCCTTTACAC CAAGATCAA TTAGATGGGT ATTAGGTACA 1750
GAAGAACCCT GCTTGCCCTGG AGGCCGGGTC AGCCGGGAAG CGCAGATGTG 1800
TGGAGGAGTG AGGAGGTGCT GGCTGCCACG GCAGGTCAAG GCTGCTTGCT 1850
35 GCCCCTGGAG CATAGTAGGG ATGCAGGAAG GAAATAGATA ATGCTTTGGT 1900
TTTTCTGAGA GGACAGAGAC AGGTGGGAGG TGA CTGACTG GTGAGTGGTG 1950
GGGAGCCTTT CACTACCACA CAGCTATGCA GCAGGGAATC AAAAGTCCCT 2000
45 CTCCTGCGGG GAACAAAGGG GCCATTGTTG TGAAAGGACC AGCTAGAGCA 2050
CAGAGGGAGA GGGCAGGCC CCGGTGAAGT GCTGGGGCAG AACTGCAGAG 2100
50 GTACTGGAAA TAAAAGCGC AGCGCAGAGC TGTGGGAGAG TCCGTCTGCT 2150
TTGGGAGATG TTTAAGCAG ACTCAGCTGC TATATTACCA CGTTTTTATT 2200
55 AAAACACAG GGAAAGCATT TAGGAGAAGA GCAGAGAGCC AAATCTGACC 2250
TAGAAGTTGA AAAGCCAAAG GTCAAACAGG CTGTAAGTCC ATCACCCTG 2300
60 AGGTTATTGG AGAATTCTCA TTAGGAAAGG CAGGTCAGAT TCCCAGGCC 2350
65

ES 2 264 127 T3

CCATAAGTGC CCCTTCCCC TCCCTGATTG AGCCTTACAC GTTGGTTTTT 2400

5 GGTTTATGGC CGTGCTGTCC GGGCTCCAAG GCAGTACCCG GGCTCCATGT 2450

CAAAGCAAAG CACACATGGC CCACCTCTTA GAGTCCTTGA GATGGAAGTA 2500

10 AGTTATGCCG CGGAAGGAAA GGCGAAGATA GGACATATTT ATAATAGGTG 2550

TATAGAACAC AAGGGATATA AAATGAAAGA TTTTACTAA TATATATTTT 2600

15 AAGATTACAC ACAATACACA CCAGAAGACG TGGAGTCCGG TGGTGGTGGT 2650

GGTCGTGGTG GTGGTGATTA AAGTGACCCC AGCGCTTAGT GCTTTAAAAA 2700

20 GTGAAAGATT GGGTAGCTAC TCCCCGAAAC GTACCAATAG CAAGAAAAGT 2750

ATCCATAATG AGAGCAAATG GCAAAAATAA CACGGTCCTG CGGGAATCTC 2800

GCAGAACCGT AGACTAGGAA TGCCAGCCCC CCAAATTGAT GTGACCCTGC 2850

30 CCCGGGTTAG ACAATGATAA AATGCGCTGG CCTTTATTTT CTGTGTTGGG 2900

TTTTCCCTTG CCTTATGGGC TGAAGTGTC TCTAGAATTT AGCAGGTCAC 2950

35 ACTGAGGGGA TTCCAGTTTA ACTGTGGGTC CCTCCTCCTC TCCTACCCCA 3000

TCCCTGCCCT TCCAGAGAAT AACAGGAAGC CTTCCTTTTT TTTTTTTTTT 3050

40 AAGTGCTATG CAAAGAGAC ATCTTTAACA GAGTCCTGTT ACTATGGTAA 3100

CATTTTGCTT TCTGAATTGG GAGGAAATAA AAATTGTAAT GACAGCATTT 3150

45 GAAGGTTCTC AGACCTCCAG TGAGTACCTG CAAAAATGAG TTGTCACAGA 3200

50 GATTATCCC TACTTCTCAA ACCTGAAAAT GATGTTGGTT CGATGTGTGT 3250

GTGTGTGTAT GAGTGGGTGT GTGGTACATG TGTGTACATA TATGTATAAT 3300

55 ATATATCTCC AGTATATATT ATATATATCT ATATCATATT TCTGTGGAGG 3350

60 GTTGCCATGG CAATCAACTG CAGTACATAT GTAGTCTTTT CCATCACCTT 3400

65

ES 2 264 127 T3

AACCTCTCCT GCGCATTAC ACAAGAGTTT CTTGTAAGCC ATCAAAAGTT 3450
5 AATTCTAGGG GGAGAGGGAT GAGGCGGGGA GACATGGGAA ACCGTCTGAT 3500
TTTAATGAAA TCAAATGTCT GTGTCATCGG TTGGCTACGT TTTGGTTCTA 3550
10 TGCTAAACTG TGAAGAATCG GATGAATTGA TGAAGAGTTG AGTTACCTGC 3600
AACCATTGA GAAGTGTCTT GTGCGTCTGT TTTGTGTCTG GTGCAGAAAA 3650
15 TGACAATCTA CCAACTGTCC CCTTATTTGG AGTTGGTTCA GCTTTGGAAA 3700
20 GTTACTGTAA ATGCCTTGCT TGTATTATCA TCCCTAGTCA CCTGACTTCG 3750
GAGCTTGCAC CATCGTGTTT TAAGTGAAGA CGCTGTAAAT AGGTTGAGAT 3800
25 CTTACCGTCT ATGGATTCGG GTGTTACAGT AGCCTTATTC ACCTTTTTAA 3850
TAAAAATACA CATGAAAACG AGACAGTAAT GGCTTTTCTT ACCCAGATTG 3900
30 TGTACATAGA GCAATGTTGG TTTTTTATAA AGTCTAAGCA AGATGTTTTG 3950
35 TATAAATCT GAATTTTGCA ATGTATTTAG CTACAGCTTT TAACGGCAGT 4000
GTCATCCCCT TTGCACTGTA ATGAGGAAAA AAAAAAGGTA TAAAAGGTTG 4050
40 CCAAATTGCT GCATATTTGT GCCGTAATTA TGTACCATGA ATATTTATTT 4100
45 AATTCGTTG TCCAATTTGT AAGTAACACA GTATTATGCT TGAGTTATAA 4150
ATATTTTTTC TTTGTTTTAT TTTAATAGCC TGTATAGGT TTTTTTTTAA 4200
50 TCTGCTTTAG TTCCACATGA CAGTTAAGCC CCAGAAATGA GATCCGAGCA 4250
GCCACATTCC ACGTCTGTTT CAAAATGAAT TTGTTCTTAA AAAAAATAAA 4300
55 ATATTTTTTT CCTATGGAAA AAAAAAAAAA AAGGGCGGCC GC 4342

60 (2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA SEC ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 336 aminoácidos
 - (B) TIPO: aminoacídica
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 65

ES 2 264 127 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NO: 2

5	Met	Ala	Met	Ala	Arg	Ser	Arg	Arg	Asp	Ser	Val	Trp	Lys	Tyr	Cys	1	5	10	15
	Trp	Gly	Leu	Leu	Met	Val	Leu	Cys	Arg	Thr	Ala	Ile	Ser	Arg	Ser	20	25	30	
10	Ile	Val	Leu	Glu	Pro	Ile	Tyr	Trp	Asn	Ser	Ser	Asn	Ser	Lys	Phe	35	40	45	
	Leu	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Val	Leu	Tyr	Pro	Gln	Ile	Gly	Asp	Lys	50	55	60	
15	Leu	Asp	Ile	Ile	Cys	Pro	Lys	Val	Asp	Ser	Lys	Thr	Val	Gly	Gln	65	70	75	
	Tyr	Glu	Tyr	Tyr	Lys	Val	Tyr	Met	Val	Asp	Lys	Asp	Gln	Ala	Asp	80	85	90	
20	Arg	Cys	Thr	Ile	Lys	Lys	Glu	Asn	Thr	Pro	Leu	Leu	Asn	Cys	Ala	95	100	105	
	Arg	Pro	Asp	Gln	Asp	Val	Lys	Phe	Thr	Ile	Lys	Phe	Gln	Glu	Phe	110	115	120	
25	Ser	Pro	Asn	Leu	Trp	Gly	Leu	Glu	Phe	Gln	Lys	Asn	Lys	Asp	Tyr	125	130	135	
30	Tyr	Ile	Ile	Ser	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Glu	Gly	Leu	Asp	Asn	140	145	150	
	Gln	Glu	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Thr	Arg	Ala	Met	Lys	Ile	Leu	Met	155	160	165	
35	Lys	Val	Gly	Gln	Asp	Ala	Ser	Ser	Ala	Gly	Ser	Ala	Arg	Asn	His	170	175	180	
40	Gly	Pro	Thr	Arg	Arg	Pro	Glu	Leu	Glu	Ala	Gly	Thr	Asn	Gly	Arg	185	190	195	
	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Pro	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Pro	Gly	Ser	Ser	200	205	210	
45	Thr	Asp	Gly	Asn	Ser	Ala	Gly	His	Ser	Gly	Asn	Asn	Leu	Leu	Gly	215	220	225	
	Ser	Glu	Val	Ala	Leu	Phe	Ala	Gly	Ile	Ala	Ser	Gly	Cys	Ile	Ile	230	235	240	
50	Phe	Ile	Val	Ile	Ile	Ile	Thr	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	245	250	255	
55	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Lys	His	Ser	Pro	Gln	His	Thr	Thr	Thr	Leu	260	265	270	
	Ser	Leu	Ser	Thr	Leu	Ala	Thr	Pro	Lys	Arg	Gly	Gly	Asn	Asn	Asn	275	280	285	
60	Gly	Ser	Glu	Pro	Ser	Asp	Val	Ile	Ile	Pro	Leu	Arg	Thr	Ala	Asp	290	295	300	
65	Ser	Val	Phe	Cys	Pro	His	Tyr	Glu	Lys	Val	Ser	Gly	Asp	Tyr	Gly	305	310	315	

ES 2 264 127 T3

His Pro Val Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro Gln Ser Pro Ala
 320 325 330

Asn Ile Tyr Tyr Lys Val
 335 336

5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA SEC ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

10

(A) LONGITUD: 1953 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NO: 3

20

CTCGAGGCGC GGAGCTGGGA GTGGCTTCGC CATGGCTGTG AGAAGGGACT 50

CCGTGTGGAA GTACTGCTGG GGTGTTTTGA TGGTTTTATG CAGAAGTGGC 100

25

ATTTCCAAAT CGATAGTTTT AGAGCCTATC TATTGGAATT CCTCGAACTC 150

CAAATTTCTA CCTGGACAAG GACTGGTACT ATACCCACAG ATAGGAGACA 200

30

AATTGGATAT TATTTGCCCC AAAGTGGACT CTAAACTGT TGGCCAGTAT 250

35

GAATATTATA AAGTTTATAT GGTGATAAA GACCAAGCAG ACAGATGCAC 300

TATTAAGAAG GAAATACCC CTCTCCTCAA CTGTGCCAAA CCAGACCAAG 350

40

ATATCAAATT CACCATCAAG TTTCAAGAAT TCAGCCCTAA CCTCTGGGGT 400

CTAGAATTC AGAAGAACAA AGATTATTAC ATTATATCTA CATCAAATGG 450

45

GTCTTTGGAG GGCCTGGATA ACCAGGAGGG AGGGGTGTGC CAGACAAGAG 500

50

CCATGAAGAT CCTCATGAAA GTTGGACAAG ATGCAAGTTC TGCTGGATCA 550

ACCAGGAATA AAGATCCAAC AAGACGTCCA GAACTAGAAG CTGGTACAAA 600

55

TGGAAGAAGT TCGACAACAA GTCCCTTTGT AAAACCAAT CCAGGTTCTA 650

60

GCACAGACGG CAACAGCGCC GGACATTCGG GGAACAACAT CCTCGGTTCC 700

GAAGTGGCCT TATTTGCAGG GATTGCTTCA GGATGCATCA TCTTCATCGT 750

65

CATCATCATC ACGCTGGTGG TCCTCTTGCT GAAGTACCGG AGGAGACACA 800

ES 2 264 127 T3

5 GGAAGCACTC GCCGCAGCAC ACGACCACGC TGTCGCTCAG CACACTGGCC 850
 ACACCCAAGC GCAGCGGCAA CAACAACGGC TCAGAGCCCA GTGACATTAT 900
 CATCCCGCTA AGGACTGCGG ACAGCGTCTT CTGCCCTCAC TACGAGAAGG 950
 10 TCAGCGGGGA CTACGGGCAC CCGGTGTACA TCGTCCAGGA GATGCCCCCG 1000
 CAGAGCCCGG CGAACATTTA CTACAAGTC TGAGAGGGAC CCTGGTGGTA 1050
 15 CCTGTGCTTT CCCAGAGGAC ACCTAATGTC CCGATGCCTC CCTTGAGGGT 1100
 TTGAGAGCCC GCGTGCTGGA GAATTGACTG AAGCACAGCA CCGGGGGAGA 1150
 20 GGGACACTCC TCCTCGGAAG AGCCCCTCGC GCTGGACAGC TTACCTAGTC 1200
 TTGTAGCATT CGGCCTTGGT GAACACACAC GCTCCCTGGA AGCTGGAAGA 1250
 25 CTGTGCAGAA GACGCCCATT CGGACTGCTG TGCCGCGTCC CACGTCTCCT 1300
 CCTCGAAGCC ATGTGCTGCG GTCACTCAGG CCTCTGCAGA AGCCAAGGGA 1350
 30 AGACAGTGGT TTGTGGACGA GAGGGCTGTG AGCATCCTGG CAGGTGCCCC 1400
 35 AGGATGCCAC GCCTGGAAGG GCCGGCTTCT GCCTGGGGTG CATTTCCTCC 1450
 GCAGTGCATA CCGGACTTGT CACACGGACC TCGGGCTAGT TAAGGTGTGC 1500
 40 AAAGATCTCT AGAGTTTAGT CCTTACTGTC TCACTCGTTC TGTTACCCAG 1550
 GGCTCTGCAG CACCTCACCT GAGACCTCCA CTCCACATCT GCATCACTCA 1600
 45 TGGAACACTC ATGTCTGGAG TCCCCTCCTC CAGCCGCTGG CAACAACAGC 1650
 TTCAGTCCAT GGGTAATCCG TTCATAGAAA TTGTGTTTGC TAACAAGGTG 1700
 50 CCCTTTAGCC AGATGCTAGG CTGTCTGCGA AGAAGGCTAG GAGTTCATAG 1750
 AAGGGAGTGG GGCTGGGGAA AGGGCTGGCT GCAATTGCAG CTCACTGCTG 1800
 55 CTGCCCTCTGA AACAGAAAGT TGGAAAGGAA AAAAGAAAAA AGCAATTAGG 1850
 TAGCACAGCA CTTTGGTTTT GCTGAGATCG AAGAGGCCAG TAGGAGACAC 1900
 65

ES 2 264 127 T3

GACAGCACAC ACAGTGGATT CCAGTGCATG GGGAGGCGGT CGACGAGCTC 1950

5 GAG 1953

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA SEC ID NO: 4

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 333 aminoácidos

(B) TIPO: aminoacídica

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NO: 4

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

ES 2 264 127 T3

Ile Ile Ile Thr Leu Val Val Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Arg Arg
 245 250 255

5 His Arg Lys His Ser Pro Gln His Thr Thr Thr Leu Ser Leu Ser
 260 265 270

Thr Leu Ala Thr Pro Lys Arg Ser Gly Asn Asn Asn Gly Ser Glu
 275 280 285

10 Pro Ser Asp Ile Ile Ile Pro Leu Arg Thr Ala Asp Ser Val Phe
 290 295 300

15 Cys Pro His Tyr Glu Lys Val Ser Gly Asp Tyr Gly His Pro Val
 305 310 315

Tyr Ile Val Gln Glu Met Pro Pro Gln Ser Pro Ala Asn Ile Tyr
 320 325 330

20 Tyr Lys Val
 333

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA SEC ID NO: 5

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 3969 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NO: 5

35 TCGGCGTCCA CCCGCCAGG GAGAGTCAGA CCTGGGGGGG CGAGGGCCCC 50

40 CCAAACCTCAG TTCGGATCCT ACCCGAGTGA GCGGGCGCCA TGGAGCTCCG 100

GGTGCTGCTC TGCTGGGCTT CGTTGGCCGC AGCTTTGGAA GAGACCCTGC 150

45 TGAACACAAA ATTGGAAACT GCTGATCTGA AGTGGGTGAC ATTCCCTCAG 200

GTGGACGGGC AGTGGGAGGA ACTGAGCGGC CTGGATGAGG AACAGCACAG 250

50 CGTGCGCACC TACGAAGTGT GTGACGTGCA GCGTGCCCCG GGCCAGGCCC 300

ACTGGCTTCG CACAGGTTGG GTCCCACGGC GGGGCGCCGT CCACGTGTAC 350

55 GCCACGCTGC GCTTCACCAT GCTCGAGTGC CTGTCCCTGC CTCGGGCTGG 400

60 GCGCTCCTGC AAGGAGACCT TCACCGTCTT CTA CTACTATGAG AGCGATGCGG 450

ACACGGCCAC GGCCCTCAGG CCAGCCTGGA TGGAGAACCC CTACATCAAG 500

65 GTGGACACGG TGGCCGCGGA GCATCTCACC CGGAAGCGCC CTGGGGCCGA 550

ES 2 264 127 T3

GGCCACCGGG AAGGTGAATG TCAAGACGCT GCGTCTGGGA CCGCTCAGCA 600
5 AGGCTGGCTT CTACCTGGCC TTCCAGGACC AGGGTGCTG CATGGCCCTG 650
CTATCCCTGC ACCTCTTCTA CAAAAAGTGC GCCCAGCTGA CTGTGAACCT 700
10 GACTCGATTG CCGGAGACTG TGCCTCGGGA GCTGGTTGTG CCCGTGGCCG 750
GTAGCTGCGT GGTGGATGCC GTCCCCGCC CTGGCCCCAG CCCCAGCCTC 800
15 TACTGCCGTG AGGATGGCCA GTGGGCCGAA CAGCCGGTCA CGGGCTGCAG 850
CTGTGCTCCG GGGTTCGAGG CAGCTGAGGG GAACACCAAG TGCCGAGCCT 900
20 GTGCCCAGGG CACCTTCAAG CCCCTGTCAG GAGAAGGGTC CTGCCAGCCA 950
TGCCCAGCCA ATAGCCACTC TAACACCATT GGATCAGCCG TCTGCCAGTG 1000
25 CCGCGTCGGG TACTTCCGGG CAGCACAGA CCCCCGGGGT GCACCCTGCA 1050
CCACCCCTCC TTCGGCTCCG CGGAGCGTGG TTTCCCGCCT GAACGGCTCC 1100
30 TCCCTGCACC TGGAATGGAG TGCCCCCTG GAGTCTGGTG GCCGAGAGGA 1150
35 CCTCACCTAC GCCCTCCGCT GCCGGGAGTG CCGACCCGGA GGCTCCTGTG 1200
CGCCCTGCGG GGGAGACCTG ACTTTTGACC CCGGCCCCCG GGACCTGGTG 1250
40 GAGCCCTGGG TGGTGGTTCG AGGGCTACGT CCTGACTTCA CCTATACCTT 1300
45 TGAGGTCACT GCATTGAACG GGTATCCTC CTTAGCCACG GGGCCCGTCC 1350
CATTGAGCC TGTCATGTC ACCACTGACC GAGAGGTACC TCCTGCAGTG 1400
50 TCTGACATCC GGGTGACGCG GTCCTCACC AGCAGCTTGA GCCTGGCCTG 1450
GGCTGTCCC CGGGCACCCA GTGGGGCTGT GCTGGACTAC GAGGTCAAAT 1500
55 ACCATGAGAA GGGCGCCGAG GGTCCCAGCA GCGTGCGGTT CCTGAAGACG 1550
60 TCAGAAAACC GGGCAGAGCT GCGGGGGCTG AAGCGGGGAG CCAGCTACCT 1600
GGTGCAGGTA CGGGCGCGCT CTGAGGCCGG CTACGGGCC TTCGGCCAGG 1650

65

ES 2 264 127 T3

AACATCACAG CCAGACCCAA CTGGATGAGA GCGAGGGCTG GCGGGAGCAG 1700
 5 CTGGCCCTGA TTGCGGGCAC GGCAGTCGTG GGTGTGGTCC TGGTCCTGGT 1750
 GGTCAATTGTG GTCGCAGTTC TCTGCCTCAG GAAGCAGAGC AATGGGAGAG 1800
 10 AAGCAGAATA TTCGGACAAA CACGGACAGT ATCTCATCGG ACATGGTACT 1850
 AAGGTCTACA TCGACCCCTT CACTTATGAA GACCCTAATG AGGCTGTGAG 1900
 15 GGAATTTGCA AAAGAGATCG ATGTCTCCTA CGTCAAGATT GAAGAGGTGA 1950
 TTGGTGCAGG TGAGTTTGGC GAGGTGTGCC GGGGGCGGCT CAAGGCCCCA 2000
 20 GGAAGAAGG AGAGCTGTGT GGCAATCAAG ACCCTGAAGG GTGGCTACAC 2050
 GGAGCGGCAG CGGCGTGAGT TTCTGAGCGA GGCTCCATC ATGGGCCAGT 2100
 25 TCGAGCACCC CAATATCATC CGCCTGGAGG GCGTGGTCAC CAACAGCATG 2150
 CCCGT CATGA TTCTCACAGA GTTCATGGAG AACGGCGCCC TGGACTCCTT 2200
 30 CCTGCGGCTA AACGACGGAC AGTTCACAGT CATCCAGCTC GTGGGCATGC 2250
 35 TCGGGGGCAT CGCCTCGGGC ATGCGGTACC TTGCCGAGAT GAGCTACGTC 2300
 CACCGAGACC TGGCTGCTCG CAACATCCTA GTCAACAGCA ACCTCGTCTG 2350
 40 CAAAGTGTCT GACTTTGGCC TTTCCCGATT CCTGGAGGAG AACTCTTCCG 2400
 45 ATCCCACCTA CACGAGCTCC CTGGGAGGAA AGATTCCCAT CCGATGGACT 2450
 GCCCCGGAGG CCATTGCCTT CCGGAAGTTC ACTTCCGCCA GTGATGCCTG 2500
 50 GAGTTACGGG ATTGTGATGT GGGAGGTGAT GTCATTTGGG GAGAGGCCGT 2550
 ACTGGGACAT GAGCAATCAG GACGTGATCA ATGCCATTGA ACAGGACTAC 2600
 55 CGGCTGCCCC CGCCCCAGA CTGTCCCACC TCCCTCCACC AGCTCATGCT 2650
 60 GGACTGTTGG CAGAAAGACC GGAATGCCCG GCCCCGCTTC CCCCAGGTGG 2700

65

ES 2 264 127 T3

TCAGCGCCCT GGACAAGATG ATCCGGAACC CCGCCAGCCT CAAAATCGTG 2750
 5
 GCCCGGAGAG ATGGCGGGGC CTCACACCCT CTCCTGGACC AGCGGCAGCC 2800
 TCACTACTCA GCTTTTGGCT CTGTGGGCGA GTGGCTTCGG GCCATCAAAA 2850
 10
 TGGGAAGATA CGAAGAAAGT TTCGCAGCCG CTGGCTTTGG CTCCTTCGAG 2900
 CTGGTCAGCC AGATCTCTGC TGAGGACCTG CTCGGAATCG GAGTCACTCT 2950
 15
 GCGGGGACAC CAGAAGAAAA TCTTGGCCAG TGTCCAGCAC ATGAAGTCCC 3000
 AGGCCAAGCC GGGAACCCCG GGTGGGACAG GAGGACCGGC CCCGCAGTAC 3050
 20
 TGACCTGCAG GAACTCCCCA CCCCAGGGAC ACCGCCTCCC CATTTCCTGG 3100
 GGCAGAGTGG GGACTCACAG AGGCCCCCG CCCTGTGCC CGCTGGATTG 3150
 CACTTTGAGC CCGTGGGGTG AGGAGTTGGC AATTTGGAGA GACAGGATTT 3200
 30
 GGGGGTTCTG CCATAATAGG AGGGGAAAAT CACCCCCAG CCACCTCGGG 3250
 GAACTCCAGA CCAAGGGTGA GGGCGCCTTT CCCTCAGGAC TGGGTGTGAC 3300
 35
 CAGAGGAAAA GGAAGTGCCC AACATCTCCC AGCCTCCCCA GGTGCCCCCC 3350
 TCACCTTGAT GGGTGCGTTC CCGCAGACCA AAGAGAGTGT GACTCCCTTG 3400
 CCAGCTCCAG AGTGGGGGGG CTGTCCCAGG GGGCAAGAAG GGGTGTGAGG 3450
 45
 GCCCAGTGAC AAAATCATTG GGGTTTGTAG TCCCAACTTG CTGCTGTCAC 3500
 CACCAACTC AATCATTTTT TTCCCTTGTA AATGCCCTC CCCCAGCTGC 3550
 50
 TGCCTTCATA TTGAAGGTTT TTGAGTTTTG TTTTGGTCT TAATTTTTCT 3600
 CCCCFTCCC TTTTGTTC TTCGTTTTGT TTTCTACCG TCCTTGTCAT 3650
 55
 AACTTTGTGT TGGAGGGAAC CTGTTTCACT ATGGCCTCCT TTGCCCAAGT 3700
 60
 TGAACAGGG GCCCATCATC ATGTCTGTTT CCAGAACAGT GCCTTGGTCA 3750
 TCCCACATCC CCGGACCCCG CCTGGGACCC CCAAGCTGTG TCCTATGAAG 3800
 65

ES 2 264 127 T3

GGGTGTGGGG TGAGGTAGTG AAAAGGGCGG TAGTTGGTGG TGGAAACCCAG 3850

5 AAACGGACGC CGGTGCTTGG AGGGGTCTT AAATTATATT TAAAAAAGTA 3900

ACTTTTTGTA TAAATAAAAG AAAATGGGAC GTGTCCCAGC TCCAGGGGTA 3950

10 AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 3969

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA SEC ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 987 aminoácidos

(B) TIPO: aminoacídica

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NO: 6

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

ES 2 264 127 T3

Val Pro Arg Glu Leu Val Val Pro Val Ala Gly Ser Cys Val Val
 215 220 225
 5 Asp Ala Val Pro Ala Pro Gly Pro Ser Pro Ser Leu Tyr Cys Arg
 230 235 240
 Glu Asp Gly Gln Trp Ala Glu Gln Pro Val Thr Gly Cys Ser Cys
 245 250 255
 10 Ala Pro Gly Phe Glu Ala Ala Glu Gly Asn Thr Lys Cys Arg Ala
 260 265 270
 Cys Ala Gln Gly Thr Phe Lys Pro Leu Ser Gly Glu Gly Ser Cys
 275 280 285
 15 Gln Pro Cys Pro Ala Asn Ser His Ser Asn Thr Ile Gly Ser Ala
 290 295 300
 Val Cys Gln Cys Arg Val Gly Tyr Phe Arg Ala Arg Thr Asp Pro
 305 310 315
 Arg Gly Ala Pro Cys Thr Thr Pro Pro Ser Ala Pro Arg Ser Val
 320 325 330
 25 Val Ser Arg Leu Asn Gly Ser Ser Leu His Leu Glu Trp Ser Ala
 335 340 345
 Pro Leu Glu Ser Gly Gly Arg Glu Asp Leu Thr Tyr Ala Leu Arg
 350 355 360
 30 Cys Arg Glu Cys Arg Pro Gly Gly Ser Cys Ala Pro Cys Gly Gly
 365 370 375
 Asp Leu Thr Phe Asp Pro Gly Pro Arg Asp Leu Val Glu Pro Trp
 380 385 390
 Val Val Val Arg Gly Leu Arg Pro Asp Phe Thr Tyr Thr Phe Glu
 395 400 405
 40 Val Thr Ala Leu Asn Gly Val Ser Ser Leu Ala Thr Gly Pro Val
 410 415 420
 Pro Phe Glu Pro Val Asn Val Thr Thr Asp Arg Glu Val Pro Pro
 425 430 435
 45 Ala Val Ser Asp Ile Arg Val Thr Arg Ser Ser Pro Ser Ser Leu
 440 445 450
 Ser Leu Ala Trp Ala Val Pro Arg Ala Pro Ser Gly Ala Val Leu
 455 460 465
 Asp Tyr Glu Val Lys Tyr His Glu Lys Gly Ala Glu Gly Pro Ser
 470 475 480
 55 Ser Val Arg Phe Leu Lys Thr Ser Glu Asn Arg Ala Glu Leu Arg
 485 490 495
 Gly Leu Lys Arg Gly Ala Ser Tyr Leu Val Gln Val Arg Ala Arg
 500 505 510
 60 Ser Glu Ala Gly Tyr Gly Pro Phe Gly Gln Glu His His Ser Gln
 515 520 525
 65

ES 2 264 127 T3

	Thr	Gln	Leu	Asp	Glu	Ser	Glu	Gly	Trp	Arg	Glu	Gln	Leu	Ala	Leu
					530					535					540
5	Ile	Ala	Gly	Thr	Ala	Val	Val	Gly	Val	Val	Leu	Val	Leu	Val	Val
					545					550					555
	Ile	Val	Val	Ala	Val	Leu	Cys	Leu	Arg	Lys	Gln	Ser	Asn	Gly	Arg
					560					565					570
10	Glu	Ala	Glu	Tyr	Ser	Asp	Lys	His	Gly	Gln	Tyr	Leu	Ile	Gly	His
					575					580					585
	Gly	Thr	Lys	Val	Tyr	Ile	Asp	Pro	Phe	Thr	Tyr	Glu	Asp	Pro	Asn
15					590					595					600
	Glu	Ala	Val	Arg	Glu	Phe	Ala	Lys	Glu	Ile	Asp	Val	Ser	Tyr	Val
					605					610					615
20	Lys	Ile	Glu	Glu	Val	Ile	Gly	Ala	Gly	Glu	Phe	Gly	Glu	Val	Cys
					620					625					630
	Arg	Gly	Arg	Leu	Lys	Ala	Pro	Gly	Lys	Lys	Glu	Ser	Cys	Val	Ala
					635					640					645
25	Ile	Lys	Thr	Leu	Lys	Gly	Gly	Tyr	Thr	Glu	Arg	Gln	Arg	Arg	Glu
					650					655					660
	Phe	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Ile	Met	Gly	Gln	Phe	Glu	His	Pro	Asn
30					665					670					675
	Ile	Ile	Arg	Leu	Glu	Gly	Val	Val	Thr	Asn	Ser	Met	Pro	Val	Met
					680					685					690
35	Ile	Leu	Thr	Glu	Phe	Met	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Asp	Ser	Phe	Leu
					695					700					705
	Arg	Leu	Asn	Asp	Gly	Gln	Phe	Thr	Val	Ile	Gln	Leu	Val	Gly	Met
					710					715					720
40	Leu	Arg	Gly	Ile	Ala	Ser	Gly	Met	Arg	Tyr	Leu	Ala	Glu	Met	Ser
					725					730					735
	Tyr	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser
45					740					745					750
	Asn	Leu	Val	Cys	Lys	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Phe	Leu
					755					760					765
50	Glu	Glu	Asn	Ser	Ser	Asp	Pro	Thr	Tyr	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Gly
					770					775					780
	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr	Ala	Pro	Glu	Ala	Ile	Ala	Phe	Arg
					785					790					795
55	Lys	Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Ala	Trp	Ser	Tyr	Gly	Ile	Val	Met
					800					805					810
	Trp	Glu	Val	Met	Ser	Phe	Gly	Glu	Arg	Pro	Tyr	Trp	Asp	Met	Ser
60					815					820					825
	Asn	Gln	Asp	Val	Ile	Asn	Ala	Ile	Glu	Gln	Asp	Tyr	Arg	Leu	Pro
					830					835					840

65

ES 2 264 127 T3

	Pro	Pro	Pro	Asp	Cys	Pro	Thr	Ser	Leu	His	Gln	Leu	Met	Leu	Asp
					845					850					855
5	Cys	Trp	Gln	Lys	Asp	Arg	Asn	Ala	Arg	Pro	Arg	Phe	Pro	Gln	Val
					860					865					870
	Val	Ser	Ala	Leu	Asp	Lys	Met	Ile	Arg	Asn	Pro	Ala	Ser	Leu	Lys
					875					880					885
10	Ile	Val	Ala	Arg	Glu	Asn	Gly	Gly	Ala	Ser	His	Pro	Leu	Leu	Asp
					890					895					900
	Gln	Arg	Gln	Pro	His	Tyr	Ser	Ala	Phe	Gly	Ser	Val	Gly	Glu	Trp
15					905					910					915
	Leu	Arg	Ala	Ile	Lys	Met	Gly	Arg	Tyr	Glu	Glu	Ser	Phe	Ala	Ala
					920					925					930
20	Ala	Gly	Phe	Gly	Ser	Phe	Glu	Leu	Val	Ser	Gln	Ile	Ser	Ala	Glu
					935					940					945
	Asp	Leu	Leu	Arg	Ile	Gly	Val	Thr	Leu	Ala	Gly	His	Gln	Lys	Lys
25					950					955					960
	Ile	Leu	Ala	Ser	Val	Gln	His	Met	Lys	Ser	Gln	Ala	Lys	Pro	Gly
					965					970					975
30	Thr	Pro	Gly	Gly	Thr	Gly	Gly	Pro	Ala	Pro	Gln	Tyr			
					980					985		987			

(2) INFORMACIÓN PARA LA SECUENCIA SEC ID NO: 7

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 10 aminoácidos

(B) TIPO: aminoacídica

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA SEC ID NO: 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10