



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 967**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01) **C07K 16/36** (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) **G01N 33/577** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02012897 .1**

96 Fecha de presentación : **08.03.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1241186**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2002**

54

Título: **Proteína gas-6 (growth arrest-specific gene 6) humana y ácidos nucleicos que la codifican.**

30

Prioridad: **22.04.1998 US 82804 P**
11.09.1998 US 100038 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

73

Titular/es: **Genentech, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72

Inventor/es: **Wood, William I.;**
Goddard, Audrey;
Gurney, Austin;
Yuan, Jean;
Baker, Kevin P. y
Chen, Jian

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 317 967 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

Proteína gas-6 (growth arrest-specific gene 6) humana y ácidos nucleicos que la codifican.

5 **Campo de la invención**

La presente invención hace referencia en general a la identificación y aislamiento de un nuevo DNA y a la producción recombinante de polipéptidos nuevos codificados por dicho DNA.

10 **Antecedentes de la invención**

Las proteínas extracelulares juegan un papel importante en la formación, diferenciación y mantenimiento de organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, su proliferación, migración, diferenciación o interacción con otras células está gobernado generalmente por la información recibida de otras células y/o el entorno inmediato. Esta información, a menudo se transmite por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que, a su vez, son recibidos e interpretados por diversos receptores celulares o proteínas unidas a membrana. Estos polipéptidos secretados o moléculas de señalización tras su secreción por la célula de forma específica alcanzan su sitio de acción en el entorno extracelular.

Las proteínas secretadas tienen diversas aplicaciones industriales, incluyendo las farmacéuticas, diagnósticas, los biosensores y los bioreactores. La mayoría de fármacos proteicos disponibles en la actualidad, como los agentes trombolíticos, los interferones, las interleucinas, las eritropoyetinas, los factores estimulantes de la formación de colonias y diversas otras citocinas, son proteínas de secreción. Sus receptores, que son proteínas de membrana, también tienen un potencial como agentes terapéuticos o diagnósticos. Se han realizado numerosos esfuerzos, tanto en la industria como en el ámbito académico para identificar nuevas proteínas de secreción. Muchos de los esfuerzos se han concentrado en el rastreo de librerías de DNA recombinante de mamífero para identificar secuencias codificantes de nuevas proteínas secretadas. En la literatura se describen diversos ejemplos de procedimientos y técnicas de rastreo [véase por ejemplo, Klein y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:7108-7113 (1996); patente americana U.S. 5.536.637)].

Las proteínas unidas a membrana y los receptores pueden desempeñar una importante función en la formación, diferenciación y mantenimiento de los organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, por ejemplo, su proliferación, migración, o interacción con otras células está gobernado en general por la información recibida de otras células y/o el entorno inmediato. Esta información, a menudo se transmite por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que, a su vez, son recibidos e interpretados por diversos receptores celulares o proteínas unidas a membrana. Dichas proteínas unidas a membrana y receptores celulares incluyen, pero no se limitan a, los receptores de citocinas, los receptores quinasas, los receptores fosfatasa, los receptores implicados en las interacciones célula-célula y las moléculas de adhesión como las selectinas e integrinas. Por ejemplo, la transducción de señales que regulan el crecimiento y la diferenciación celular está regulada en parte por la fosforilación de diversas proteínas celulares. Las proteína tirosina quinasas, enzimas que catalizan dicho proceso, también pueden actuar como receptores de factores de crecimiento. Se incluyen como ejemplos el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento nervioso.

Las proteínas unidas a membrana y las moléculas de receptor tienen diversas aplicaciones industriales, por ejemplo, como agentes farmacéuticos y diagnósticos. Los receptores inmunoadhesinas, por ejemplo, pueden utilizarse como agentes terapéuticos para bloquear la interacción con el receptor-ligando. Las proteínas unidas a membrana también pueden utilizarse para el rastreo de inhibidores potenciales de moléculas pequeñas o de péptidos de la interacción relevante receptor/ligando. Se han realizado esfuerzos tanto en la investigación industrial como académica para identificar nuevas proteínas receptoras nativas. Muchos esfuerzos se han centrado en el rastreo de librerías de DNA recombinantes para identificar las secuencias codificantes de nuevas proteínas receptoras.

En la presente invención se describe la identificación y la caracterización de nuevos polipéptidos de secreción y transmembrana, así como los nuevos ácidos nucleicos que los codifican.

55 *PRO213-1, PRO1330 y PRO1449*

El cáncer se caracteriza por el incremento en el número de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas, y la generación de células malignas que finalmente se extienden a través de la sangre o el sistema linfático hasta los nódulos linfáticos regionales y hasta sitios distantes (metástasis). En un estado canceroso, una célula prolifera bajo condiciones en las que células normales no crecerían. El cáncer se manifiesta por sí mismo en una gran variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasión y agresividad.

65 La alteración de la expresión génica está íntimamente relacionada con el crecimiento incontrolado de células y la desdiferenciación, las cuales son una característica común a todos los cánceres. Se ha observado que los genomas de ciertos tumores bien estudiados muestran una menor expresión de genes recesivos, a los que habitualmente se hace referencia como genes supresores de tumores, que funcionarían normalmente para evitar el crecimiento de células

malignas, y/o la sobreexpresión de ciertos genes de dominio, tales como oncogenes, que actúan para inducir el crecimiento maligno. Cada uno de estos cambios genéticos parece ser responsable de la importación de algunos de los rasgos que, agregados, representan el fenotipo neoplásico completo (Hunter. *Cell* 64, 1129 [1991]; Bishop, *Cell* 64, 235-248 [1991]).

5 Un mecanismo bien conocido de la sobreexpresión de genes (por ejemplo, oncogén) en células cancerígenas es la amplificación génica. Este es un procedimiento en el que en el cromosoma de la célula ancestral se producen múltiples copias de un gen particular. El procedimiento implica la replicación no programada de la región del cromosoma que comprende el gen, seguido por la recombinación de los segmentos replicados de nuevo en el cromosoma (Alitalo *et al.*, *Adv. Cancer Res.* 47. 235-281 [1986]). Se cree que la sobreexpresión del gen va en paralelo con la ampliación
10 génica, es decir, es proporcional al número de copias realizadas.

Se ha identificado que los proto-oncogenes que codifican factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento juegan papeles importantes en la patogénesis de varios tumores humanos, incluyendo cáncer de mama. Por ejemplo, se ha observado que el gen de ErbB2 humano (*erbB2*, también conocido como *her2* o *c-erbB-2*), que codifica un receptor de glicoproteína transmembrana de 185 kD (p185HER2, HER2) relacionado con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se sobreexpresa en aproximadamente de un 25% a un 30% del cáncer de
15 mama humano (Slamon *et al.*, *Science* 235: 177-182 [1987]; Slamon *et al.*, *Science* 244: 707-712 [1989]).

Se ha descrito que la amplificación génica de un protooncogén en un suceso implicado habitualmente en las formas más malignas de cáncer, y podría actuar como un factor de pronóstico del resultado clínico (Schwab *et al.*, *Genes Chromosomes Cancer* 1, 181-193 [1990]; Alitalo *et al.*, *supra*). De este modo, la sobreexpresión de *erbB2* se considera habitualmente como un factor de pronóstico de una mala prognosis, especialmente en pacientes con enfermedad primaria que implica nódulos linfáticos auxiliares (Slamon *et al.*, [1987] y [1989], *supra*; Ravdin y Chamness, *Gene* 159: 19-27 [1995]; y Hynes y Stem, *Biochim. Biophys. Acta* 1198: 165-184 [1994]) y se ha relacionado con la sensibilidad y/o resistencia a la terapia con hormonas y pautas quimioterapéuticas, incluyendo CMF (ciclofosfamida, metotrexato y fluorouracilo) y antraciclina (Baselga *et al.*, *Oncology* 11 (3 Suppl 1): 43-48 [1997]). Sin embargo, a pesar de la asociación de la sobreexpresión de *erbB2* con una mal prognosis, las probabilidades de pacientes con respuesta positiva a HER2 que respondían clínicamente al tratamiento con taxanos eran superiores a tres veces aquellos
25 pacientes con respuesta negativa a HER2 (*Ibid*). Un anticuerpo monoclonal recombinante anti-ErbB2 humanizado (anti-HER2) (una versión humanizada del anticuerpo anti-ErbB2 4D5, al que se hace referencia como rhuMAb HER2 o Herceptin δ) ha sido clínicamente activo en pacientes con cánceres de mama metastáticos que sobreexpresan ErbB2 que habían recibido terapia anticancerígena previa a la extensión. (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14: 737-744 [1996]).

La proteína Notch y sus homólogos son receptores reguladores claves en la determinación del destino celular en diversos procesos de desarrollo. La proteína Notch-4, también conocida como oncogén int-3, se identificó originalmente como una diana frecuente en el virus de tumor mamario de ratón (MMVS). Se cree que la Notch-4 es un transgén que afecta a la capacidad de diferenciación de células madre y conduce a la proliferación neoplásica en células epiteliales. Shirayoshi *et al.*, *Genes Cells* 2(3): 213-224 (1997). Durante la embriogénesis, la expresión de Notch-4 se detectó en células endoteliales de vasos sanguíneos que forman tejidos, tales como la aorta dorsal, los vasos intersegmentales, vasos del saco vitelino, vasos cefálicos, corazón, vasos en arcos branquiales, y plexos capilares. La expresión de Notch-4 en estos tejidos también estaba asociada con *flk-1*, el gen regulador principal de la vasculogénesis y la angiogénesis. La Notch-4 también se regula por incremento *in vitro* durante la diferenciación de la célula madre endotelial. El patrón de expresión específico para células endoteliales de Notch-4, así como su similitud estructural con Notch, sugieren que
35 Notch-4 es un homólogo específico para células endoteliales de Notch y que puede jugar un papel en la vasculogénesis y angiogénesis.

Descripción resumida de la invención

50 *PRO213-1*, *PRO1330* y *PRO1449*

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para el diagnóstico y el tratamiento del crecimiento y proliferación de células neoplásicas en mamíferos, incluyendo humanos. La presente invención se basa en la identificación de genes que se amplifican en el genoma de células tumorales. Se espera que dicha amplificación génica esté
55 asociada con la sobreexpresión del producto génico y contribuya a la tumorigénesis. Por consiguiente, se cree que las proteínas codificadas por los genes amplificados son dianas útiles para el diagnóstico y/o el tratamiento (incluyendo prevención) de ciertos cánceres, y pueden actuar como factores de pronóstico del tratamiento de tumores.

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada tal como se define en las reivindicaciones, que comprende ADN que codifica un polipéptido *PRO213-1*, *PRO1330* y/o *PRO1449*. En un aspecto, el ácido nucleico aislado comprende ADN que codifica el polipéptido *PRO213-1*, *PRO1330* y/o *PRO1449* que tiene los residuos de aminoácidos 1 a 273 de la figura 2, 20 a 273 de la figura 4 y 20 a 273 de la figura 6, respectivamente, o es complementario a dicha secuencia de ácido nucleico codificante, y permanece unido de manera estable al mismo bajo condiciones de astringencia por lo menos moderada y, opcionalmente, condiciones de astringencia elevada. La secuencia de ácido nucleico aislada puede comprender el inserto de ADNc del vector designado como DNA30943-1-1163-1 (ATCC 209791) depositado el 21 de abril de 1998; DNA64907-1163-1 (ATCC 203243) depositado el 9 de
65 septiembre de 1998 y/o DNA64908-1163-1 (ATCC 203242) depositado el 9 de septiembre de 1998.

ES 2 317 967 T3

La presente invención también proporciona un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 aislado tal como se define en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 de secuencia nativa aislado, que en una realización, incluye una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1 a 273 de la figura 2, 20 a 273 de la figura 4 ó 20 a 273 de la figura 6, respectivamente. Opcionalmente, el polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por el inserto de ADNc del DNA30943-1-1163-1 (ATCC 209791), DNA64907-1163-1 (ATCC 203243) o DNA64908-1163-1 (ATCC 203242).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia con los residuos de aminoácidos 1 a 273 de la figura 2, 20 a 273 de la figura 4 ó 20 a 273 de la figura 6, inclusive.

En otra realización, la presente invención proporciona un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 aislado, que comprende los residuos de aminoácidos 1 a 273 de la figura 2, 20 a 273 de la figura 4 ó 20 a 273 de la figura 6.

Tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención también se refiere a un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 aislado. En un aspecto, el anticuerpo induce la muerte de una célula que sobreexpresa un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449. En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que preferiblemente tiene residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) no humana y residuos de la región estructural (“framework”) (FR) humana. El anticuerpo se puede marcar y se puede inmovilizar en un soporte sólido. En un aspecto adicional, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo anti-idiotípico.

En otra realización, la presente invención se refiere a una composición que comprende un anticuerpo que se une a un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. En otro aspecto, la composición comprende un principio activo adicional que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo adicional o un agente citotóxico o quimioterapéutico. Preferiblemente, la composición es estéril.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-PRO213-1, anti-PRO1330 y/o anti-PRO1449, y vectores y células huésped recombinantes que comprenden dicho ácido nucleico.

En otra realización, tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un método para determinar la presencia de un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 que comprende exponer una célula sospechosa de contener el polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 a un anticuerpo anti-PRO213-1, anti-PRO1330 y/o anti-PRO1449 y determinar la unión del anticuerpo a la célula.

En otra realización, tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de tumores en un mamífero, que comprende detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 (a) en una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) en una muestra de control de células de tejido normales conocidas del mismo tipo de células, donde un nivel de expresión más elevado en la muestra de prueba indica la presencia de un tumor en el mamífero del que se obtuvieron las células de tejido de prueba.

En otra realización, tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de tumores en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto un anticuerpo anti-PRO213-1, anti-PRO1330 y/o anti-PRO1449 con una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo anti-PRO213-1, anti-PRO1330 y/o anti-PRO1449 y el polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 en la muestra de prueba. La detección puede ser cualitativa o cuantitativa y se puede realizar en comparación con la monitorización de la formación de complejo en una muestra de control de células de tejido normales conocidas del mismo tipo de célula. Una mayor cantidad de complejos formador en la muestra de prueba indica la presencia de un tumor en el mamífero del que se obtuvieron las células de tejido de prueba. El anticuerpo preferiblemente transporta un marcador detectable. La formación del complejo se puede monitorizar, por ejemplo, mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en el sector. La muestra de prueba se obtiene habitualmente de un individuo sospechoso de sufrir un crecimiento o proliferación de células neoplásicas (por ejemplo, células cancerosas).

En otra realización, tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico del cáncer, que comprende un anticuerpo anti-PRO213-1, anti-PRO1330 y/o anti-PRO1449 y un portador (por ejemplo, un tampón) en un envase adecuado. El kit contiene preferiblemente las instrucciones para el uso del anticuerpo para detectar el polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449.

ES 2 317 967 T3

Realizaciones adicionales

5 En otras realizaciones de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente. También se proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, *E. coli* o levadura. También se proporciona un proceso para la producción de cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

10 En otras realizaciones, la presente invención proporciona moléculas químicas que comprenden cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente fusionados a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. Un ejemplo de dicha molécula química comprende cualquiera de los polipéptidos descritos anterior o posteriormente fusionados a una secuencia de epítipo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

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

Breve descripción de los dibujos

20 La figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos de un ADNc de PRO213-1 de secuencia nativa, que es un clon designado en la presente invención como "DNA30943-1-1163-1".

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia codificante mostrada en la figura 1.

25 La figura 3 muestra una secuencia de nucleótidos de un ADNc de PRO1330 de secuencia nativa, que es un clon designado en la presente invención como "DNA64907-1163-1".

La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia codificante mostrada en la figura 3.

30 La figura 5 muestra una secuencia de nucleótidos de un ADNc de PRO1449 de secuencia nativa, que es un clon designado en la presente invención como "DNA64908-1163-1".

La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia codificante mostrada en la figura 5.

35 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

40 Los términos "polipéptido PRO" y "PRO", tal como se usan aquí, y cuando van seguidos inmediatamente por una designación numérica se refieren a varios polipéptidos, en donde la designación completa (es decir, PRO/número) se refiere a secuencias polipeptídicas específicas como se describe aquí. Los términos "PRO/número polipéptido" y "PRO número" tal como se usan aquí comprenden secuencias polipeptídicas nativas y variantes polipeptídicas (que se definen con más en profundidad más adelante). Los polipéptidos PRO descritos aquí pueden aislarse de una variedad de fuentes, tales como tejidos humanos o de otra fuente o preparados mediante métodos de recombinación o sintéticos.

45 Una "polipéptido PRO de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido PRO natural. Dichos polipéptidos PRO de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante métodos recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido PRO de secuencia nativa" comprende específicamente las formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido PRO específico (por ejemplo, una secuencia de un dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas procedentes de ajuste ("splice") alternativo) y variantes alélicas del polipéptido naturales.

50 El "dominio extracelular" del polipéptido PRO o "ECD" se refiere a una forma del polipéptido PRO que esencialmente está libre de los dominios transmembrana y citoplasmático. Ordinariamente, un ECD de un polipéptido PRO tendrá menos de un 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmáticos y preferentemente, tendrá menos de un 0,5% de dichos dominios. Deberá entenderse que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos PRO de la presente invención se identifican según lo acordado con el criterio rutinariamente empleado en la materia para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar pero no más de alrededor de 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como inicialmente se identificó.

60 Opcionalmente, por tanto, un dominio extracelular de un polipéptido PRO puede contener alrededor de 5 o menos aminoácidos en cada uno de los extremos del dominio transmembrana como inicialmente se identificó.

"Variante de un polipéptido PRO" significa un polipéptido PRO activo como se definió anteriormente o más adelante que tiene al menos un 80% de identidad en la secuencia aminoacídica con la secuencia nativa completa del polipéptido PRO, tal como se describe aquí. Dichas variantes de polipéptido PRO incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO en donde uno o más residuos aminoacídicos se añaden o eliminan, en el extremo N- o C- terminal de la secuencia aminoacídica nativa completa. Ordinariamente, una variante de un polipéptido PRO tendrá al menos un 80% de identidad de secuencia aminoacídica, preferentemente al menos un 85% de identidad de secuencia aminoacídica, e incluso

ES 2 317 967 T3

más preferiblemente al menos alrededor de un 90% de identidad de secuencia aminoacídica, incluso más preferentemente al menos un 91% de identidad de secuencia aminoacídica, incluso más preferentemente al menos alrededor de un 93% de identidad de secuencia de aminoácidos, incluso más preferentemente al menos alrededor de un 94% de identidad de secuencia de aminoácidos, incluso más preferentemente al menos alrededor de un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos, todavía más preferentemente al menos alrededor de un 96% de identidad de secuencia de aminoácidos, todavía más preferentemente al menos alrededor de un 97% de identidad de secuencia de aminoácidos, todavía más preferentemente al menos alrededor de un 98% de identidad de la secuencia de aminoácidos, y más preferentemente al menos alrededor de un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la secuencia aminoacídica nativa completa tal y como se describe aquí.

El “Porcentaje (%) de identidad de secuencia aminoacídica” con respecto a las secuencias del polipéptido PRO identificadas aquí, se define como el porcentaje de residuos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia específica del polipéptido PRO, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se pueden realizar alineamientos con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia aminoacídica de maneras diversas que están dentro del ámbito de la materia, por ejemplo, usando programas disponibles públicamente tales como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). El programa de alineamiento preferido es el BLAST. Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento a lo largo de la totalidad de las secuencias que están comparándose. Los valores de % de identidad usados aquí se han generado con el programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul y col., *Methods in Enzymology* 266:460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/README.html>). La mayoría de los parámetros de búsqueda del WU-BLAST-2 se ajustan a los valores por defecto. Los parámetros ajustables se ajustan con los valores siguientes: tramo de solapamiento=1, fracción de solapamiento=0,125 valor umbral(T)=11 y puntuación de matriz = BLOSUM62. Los parámetros HSP S y HSP S2, que son valores dinámicos usados por el BLAST-2, los establece el propio programa dependiendo de la composición de la secuencia de interés y de la composición del banco de datos con el que se está comparando la secuencia. Sin embargo, los valores pueden ajustarse para aumentar la sensibilidad. Un valor en % de identidad de secuencia se determina por la fracción de residuos idénticos dividido por el número total de residuos en la región alineada.

“Porcentaje (%) de identidad de secuencia nucleotídica” con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican PRO e identificadas aquí se define como el porcentaje de nucleótidos que en una secuencia candidata son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos del PRO de interés, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Pueden realizarse alineamientos con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de una secuencia nucleica de diversas maneras, que se hallan dentro del ámbito de la materia, por ejemplo, usando programas disponibles públicamente como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento a lo largo de la totalidad de las secuencias que están comparándose. Los valores de identidad usados aquí se generan mediante el módulo BLASTN del WU-BLAST-2 fijado a los parámetros por defecto, con tramo de solapamiento y fracción de solapamiento fijados a 1 y 0,125 respectivamente.

El término “positivos”, en el contexto de la comparación de secuencias realizado tal y como se describe arriba, incluye residuos en las secuencias comparadas que no son idénticos pero tienen propiedades similares (por ejemplo, como resultado de sustituciones conservadoras). El valor de % de positivos se determina a través de la fracción de residuos que puntúan un valor positivo en la matriz BLOSUM 62 dividido por el número total de residuos en la región alineada, tal como se define anteriormente.

El término epitopo etiquetado se refiere aquí a un polipéptido quimérico que comprende el polipéptido PRO, o un dominio de su secuencia, fusionado con un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos para proporcionar un epitopo contra el que se puede generar un anticuerpo, o que puede ser identificado por algún otro agente, pero es suficientemente corto como para no interferir en la actividad del polipéptido PRO de interés. El polipéptido etiqueta preferentemente es bastante único de forma que el anticuerpo no reacciona substancialmente de forma cruzada con otros epitopos. Los polipéptidos etiqueta apropiados generalmente tienen al menos seis residuos de aminoácidos y usualmente alrededor de entre 8 y 50 residuos aminoacídicos (preferentemente entre 10 y 20 residuos).

“Aislado”, cuando se usa para describir varios polipéptidos usados aquí, significa aquél polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos de naturaleza proteica o no proteica. En las realizaciones preferidas, el polipéptido será purificado (1) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia aminoacídica N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de *spinning cup*, o(2) a homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Comassie o, preferentemente, tinción con plata. El aislamiento del polipéptido incluye el polipéptido aislado en células recombinantes, en los que al menos un componente del entorno natural del polipéptido PRO no estará presente. Habitualmente, sin embargo, el polipéptido aislado se purificará mediante al menos una etapa de purificación.

ES 2 317 967 T3

Un ácido nucleico que codifica para un polipéptido PRO “aislado” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula contaminante de ácido nucleico con la cual está asociado habitualmente en la fuente natural del ácido nucleico del polipéptido PRO. Una molécula de ácido nucleico de un polipéptido PRO aislado es aquella cuya forma es distinta de la que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico para un polipéptido PRO aislado se distinguen, por tanto, de la molécula de ácido nucleico del polipéptido PRO específico ya que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico para un polipéptido PRO incluye moléculas de ácido nucleico para el polipéptido PRO contenidas en las células que ordinariamente expresan el polipéptido PRO en donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

El término “secuencias control” hace referencia a secuencias de DNA necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias control que son adecuadas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión al ribosoma. Las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación e intensificadores.

El ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el DNA para una presecuencia o un líder secretor está unido operativamente al DNA correspondiente a un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o un intensificador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado de manera que facilite la traducción. Generalmente “unido operativamente” significa que las secuencias de DNA que están unidas son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguo y en la misma pauta de lectura. Sin embargo, los intensificadores no tienen porqué ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en dianas de restricción adecuadas. Si tales dianas no existen, se usan adaptadores o engarces de oligonucleótidos sintéticos según prácticas convencionales.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio de la palabra y abarca específicamente anticuerpos monoclonales contra un solo polipéptido PRO (incluyendo agonistas, antagonistas y anticuerpos de neutralización) y composiciones de anticuerpos anti-polipéptido PRO con especificidad poliepitópica. El término “anticuerpo monoclonal” tal y como se usa aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades inferiores.

“Activo” o “actividad” para los objetivos de esta invención se refiere a forma(s) del polipéptido PRO que retienen la actividad biológica y/o inmunológica del polipéptido PRO nativo o natural.

“Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen los que ya presentan el trastorno, como los propensos a padecerlo.

“Mamífero” para los propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos, de granja y del zoo, de competición deportiva o mascotas tales como ovejas, perros, caballos, gatos, vacas, y similar. Preferentemente, el mamífero aquí es un humano.

“Vehículos”, tal y como se usa aquí, incluye los vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se está exponiendo al mismo a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada. Entre los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables se incluyen tampones como el fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, 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, incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes como el EDTA; alcoholes de azúcares como el manitol o el sorbitol; iones que forman sales como el sodio; y/o tensoactivos no iónicos como el TWEENTM el polietilenglicol (PEG) y el PLURONICSTM.

El término “agonista” se usa para referirse a análogos peptídicos y no peptídicos de los polipéptidos PRO nativos (en donde polipéptido PRO nativo se refiere a un pro-polipéptido PRO, un pre-polipéptido PRO, un prepro-polipéptido PRO o un polipéptido PRO maduro) de la presente invención y a los anticuerpos que específicamente se unen a dichos polipéptidos PRO nativos; debido a que retienen al menos una actividad biológica de un polipéptido PRO nativo. Preferentemente, los agonistas de la presente invención retienen las propiedades cualitativas de reconocimiento de unión y las propiedades de activación del receptor del polipéptido PRO nativo.

El término “antagonista” se usa aquí para referirse a una molécula que inhibe una actividad biológica de un polipéptido PRO nativo de la presente invención en donde el polipéptido PRO nativo se refiere a un pro-polipéptido PRO, un pre-polipéptido PRO, un prepro-polipéptido PRO o un polipéptido PRO maduro. Preferentemente, los antagonistas aquí inhiben la unión de un polipéptido PRO nativo de la presente invención a una pareja de unión. Un “antagonista” del polipéptido PRO es una molécula que previene, o interfiere con, una función efectora antagonista PRO (por ejemplo, una molécula que previene o interfiere con la unión y/o activación del polipéptido PRO a un receptor del polipéptido PRO.). Dichas moléculas pueden ser cribadas por su capacidad para inhibir competitivamente la activación

del receptor del polipéptido PRO mediante la monitorización de la unión de un polipéptido PRO nativo en presencia y ausencia de la molécula antagonista a analizar. Un antagonista de la invención incluye también un polinucleótido antisentido contra el gen del polipéptido PRO, polinucleótido antisentido que bloquea la transcripción o traducción del gen del polipéptido PRO, de ese modo inhibe su expresión y su actividad biológica.

5 La “astringencia” de las reacciones de hibridación se determina fácilmente por los expertos en la materia y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sales. En general las sondas más largas requieren temperaturas más altas para que la hibridación sea adecuada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación generalmente depende de la
10 capacidad del DNA desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de sus temperaturas de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia a hibridar, mayor es la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deriva que temperaturas relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas más bajas lo serían menos. Para detalles y explicaciones sobre la astringencia de las reacciones de hibridación véase Ausubel
15 y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones de astringencia” significa (1) emplear fuerzas iónicas bajas y temperaturas altas para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/ dodecil sulfato sódico 0,1% a 50°C, o (2) emplear un agente
20 desnaturalizante durante la hibridación, como por ejemplo formamida al 50% (vol/vol) con albúmina sérica bovina al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/ tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C. Otro ejemplo es usar formamida al 50%, 5X de SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6/8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución Denhart 5X, DNA de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1%, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C en SSC 2X y SDS al 0,1%. Otro
25 ejemplo más de hibridación usa un tampón de sulfato de dextrano al 10%, SSC 2X (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado a alta astringencia que consiste en SSC 0,1X conteniendo EDTA a 55°C.

“Condiciones moderadamente astringentes” se describen en Sambrook y col., *supra*, e incluye el uso de una solución de lavado y de condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es una incubación durante
30 la noche a 37°C en una solución compuesta por: formamida al 20%, SSC 5X (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución Denhart 5X, sulfato de dextrano al 10% y 20 mg/ml de DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros en SSC 1X a aproximadamente 37-50°C. El personal capacitado reconocerá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc., como sea necesario
35 para adaptarse a factores como la longitud de la sonda y similares.

El “análisis de Southern” o la “transferencia de Southern” es un método por el cual la presencia de secuencias de DNA en un DNA digerido con enzimas de restricción o una composición que contenga DNA se confirma por
40 hibridación a un oligonucleótido marcado o a un fragmento de DNA conocidos. El análisis de Southern implica habitualmente la separación electroforética del DNA digerido en geles de agarosa, la desnaturalización del DNA después de la separación electroforética y la transferencia del DNA a un soporte de membrana de nitrocelulosa, nylon o cualquier otro soporte adecuado para el análisis con una sonda marcada radioactivamente, biotinilada o marcada enzimáticamente como se describe en las secciones 9.37-9.52 de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).
45

El “análisis de Northern” o la “transferencia de Northern” es un método usado para identificar secuencias de RNA que hibridan a una sonda conocida como un oligonucleótido, un fragmento de DNA, un fragmento de su cDNA o un
50 fragmento de RNA. La sonda se marca con un radioisótopo como P³², o por biotinilización o enzimáticamente. El RNA que va a analizarse habitualmente se separa electroforéticamente en gel de agarosa o poliácridamida, transferido a una membrana de nitrocelulosa, nylon, o cualquier otra membrana adecuada, e hibridada con la sonda, usando técnicas estándar bien conocidas en el área como las descritas en las secciones 7.39-7.52 de Sambrook y col., *supra*.

Tal y como se usa aquí, el término “inmuno adhesina” designa moléculas tipo anticuerpo que combinan la unión específica a una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de una
55 inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión entre una secuencia aminoacídica con la especificidad de unión deseada que no es otra que los sitios de reconocimiento del antígeno y el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”), y la secuencia de un dominio constante de inmunoglobulina. La región adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia aminoacídica contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en
60 la inmuno adhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

El término administración “crónica” se refiere a la administración del agente(s) de modo continuo contrariamente a un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un periodo de tiempo prolongado.
65 Administración “intermitente” es aquel tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que tiene una naturaleza cíclica.

ES 2 317 967 T3

La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

El término “vector de expresión” se usa para definir un vector, en el cual un ácido nucleico que codifica para el polipéptido PRO está unido operativamente a secuencias control capaces de afectar su expresión en una célula huésped adecuada. Los vectores habitualmente llevan un sitio de replicación (aunque éste no es necesario si se produce integración cromosómica). Los vectores de expresión también incluyen secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar una selección fenotípica en las células transformadas. Por ejemplo *E. coli* típicamente se transforma con PBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (Bolivar, y col., Gene 2:95[1977]). El PBR322 contiene genes que codifican para resistencia a ampicilina y tetraciclina y por tanto proporciona un método sencillo para identificar las células transformadas para objetivos de clonaje o expresión. Los vectores de expresión óptimamente también contendrán secuencias útiles para el control de la transcripción y la traducción, por ejemplo, promotores y secuencias Shine-Dalgarno (para procariontes) o promotores e intensificadores (para células mamíferas). Los promotores pueden ser, pero no necesariamente, inducibles; incluso promotores fuertes constitutivos como el promotor del CMV para huéspedes mamíferos se ha observado que produce el LHR sin toxicidad para la célula huésped. Aunque es posible que los vectores de expresión no necesiten contener ningún control de expresión, secuencias replicativas o genes de selección, su ausencia puede dificultar la identificación de transformantes híbridos y el logro de niveles de expresión elevados de la inmunoglobulina híbrida.

El término “lipopolisacárido” o “LPS” se usa aquí como sinónimo de endotoxina. Los lipopolisacáridos (LPS) son componentes característicos de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, por ejemplo, *Escherichia coli*. Consisten en una parte de polisacárido y una lipídica denominada lípido A. El polisacárido, que varía de una especie bacteriana a otra, está compuesto por una cadena específica O (constituida a base de unidades repetidas de tres a ocho azúcares) y el núcleo de dos partes. El lípido A virtualmente siempre incluye dos azúcares de glucosamina modificados por un fosfato y un número variable de ácidos grasos. Para más información véase, por ejemplo, Rietschel and Brade, Scientific American Agosto 1992,54-61.

El término “choque séptico” se usa aquí en el sentido más amplio, incluyendo algunas definiciones descritas en Bone, Ann. Intern. Med. 114, 332-333 (1991). Específicamente, el choque séptico comienza con una respuesta sistémica a la infección, un síndrome llamado sepsis. Cuando este síndrome resulta en hipotensión y disfunción orgánica, se denomina choque séptico. El choque séptico puede ser iniciado por organismos Gram-positivos y hongos, así como por organismos Gram-negativos que contengan endotoxina. Por consiguiente, la definición indicada no se limita al “choque por endotoxina”.

Las frases “amplificación génica” y “duplicación génica” son intercambiables y se refieren a un proceso por el cual en una célula o línea celular particular se forman múltiples copias de un gen o de fragmentos de un gen. La región duplicada (un tramo de DNA amplificado) se denomina frecuentemente como “amplicón”. Habitualmente la cantidad de RNA mensajero (mRNA) producido, es decir, el nivel de expresión génica, también aumenta en proporción con el número de copias hechas del gen particular expresado.

“Tumor” tal y como se usa aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno o benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cáncer incluyen, aunque no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de mama, de próstata, de colon, el carcinoma de las células espinales, el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer gastrointestinal, el cáncer de páncreas, el glioblastoma, el cáncer de cérvix, el cáncer de ovarios, el cáncer hepático, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer colorectal, el carcinoma de endometrio, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón, el cáncer de vulva, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

El término “agente citotóxico” tal y como se usa aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o que causa destrucción celular. El término incluye isótopos radioactivos (por ejemplo, I^{131} , I^{125} , Y^{90} , y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas como toxinas activas enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, de plantas o animales, o sus fragmentos.

Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracil, arabinósido de citosina (“Ara-C”), ciclofosfamida, tiotepa, busulfan, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (Taxotere[®], Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France), taxotere, metotrexato, cisplatino, melfalan, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosmamáida, mitomicina C, mitoxantrone, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase patente americana US 4.675.187), melfalan y otras mostazas nitrogenadas relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que regulan o inhiben la acción de hormonas sobre tumores como tamoxifeno y onapristona.

Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se usa aquí se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que sobreexpresa cualquiera de los genes identificados

aquí, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan dichos genes en fase S. Entre los ejemplos de inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo (en otra fase distinta de la fase S), como aquellos agentes que inducen la quiescencia celular en fase G1 y M. Entre los agentes que clásicamente bloquean la fase M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), el taxol, e inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Aquellos agentes que producen quiescencia en G1 también producen quiescencia en fase S, por ejemplo agentes alquilantes del DNA como tamoxifeno, prednisona, dacarbazida, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse información adicional en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens and antineoplastic drugs" por Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente pag 13.

La "doxorubicina" es un antibiótico antraciclina.

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúa sobre otras células como mediadores intercelulares. Entre los ejemplos de citoquinas están las linfoquinas, las monoquinas, y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas de crecimiento como la hormona del crecimiento humana, la hormona del crecimiento humana N-metionil, la hormona del crecimiento bovina, la hormona paratiroidea, la tiroxina, la insulina, la proinsulina, la relaxina, la prorelaxina y similares. Tal y como se usa aquí el término citoquina incluye proteínas de origen natural u obtenidas a partir de cultivos celulares recombinantes con una actividad biológica equivalente a las de las citoquinas nativas.

La "reactividad cruzada inmunológica", tal como se utiliza en la presente invención, significa que el polipéptido candidato es capaz de inhibir de manera competitiva la actividad biológica cuantitativa de un polipéptido PRO213-1, PRO1330 o PRO1449 que poseen esta actividad con antisueros policlonales desarrollados contra el polipéptido PRO213-1, PRO1330 o PRO1449 activo conocido. Dichos antisueros se pueden preparar de manera convencional mediante la inyección a cabras o conejos, por ejemplo, de manera simultánea con el análogo activo conocido en adyuvante de Freund completo, seguido a continuación de inyección intraperitoneal o subcutánea de refuerzo en adyuvante de Freund incompleto. La reactividad cruzada inmunológica es preferiblemente "específica", lo que significa que la afinidad de unión de la molécula de la reacción cruzada inmunológica (por ejemplo, anticuerpo) identificada al correspondiente polipéptido PRO213-1, PRO1330 o PRO1449 es significativamente superior (preferiblemente por lo menos aproximadamente 2 veces, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 4 veces, incluso más preferiblemente por lo menos aproximadamente 6 veces, aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 8 veces superior) que la afinidad de unión de esa molécula con cualquier otro polipéptido nativo conocido.

"Anticuerpos nativos" e "inmunoglobulinas nativas" son glicoproteínas heterotetraméricas de alrededor de 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un enlace covalente disulfuro, mientras el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en su extremo un dominio variable (VH) seguido por un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con dominio variable de la cadena pesada. Se considera que los residuos aminoacídicos particulares forman una superficie entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y en la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida regularmente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en 3 segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las regiones de los dominios variables más altamente conservadas se denominan regiones de entramado (FR). Cada uno de los dominios variables de las cadenas ligera y pesada nativas comprende cuatro regiones FR, que adoptan una configuración de hoja beta, conectadas por 3 CDRs, los cuales forman bucles de conexión, y en algunos casos forman parte de la estructura hoja beta. Los 3 CDRs en cada cadena están unidos en proximidad con las regiones FR y, con los CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión del antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col, NIH Publ. N°91-3242, Vol I páginas 647-669 (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente del anticuerpo.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden fracciones de un anticuerpo intacto, preferentemente las regiones de unión al antígeno o las regiones variables del anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; anticuerpos biespecíficos, anticuerpos lineales (Zapata y col., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena simple; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio simple de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", una designación

que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da lugar a un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y que todavía es capaz de unirse al antígeno.

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

15 El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación usada aquí para Fab' en el cual el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de un anticuerpo originalmente se produjeron como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

20 Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente diferenciados, llamados kappa y lambda, basados en las secuencias aminoacídicas de sus dominios constantes.

25 Dependiendo de la secuencia aminoacídica del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay 5 clases fundamentales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de ellas pueden ser divididas en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

30 Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena simple" o "sFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde dichos dominios se presentan en una cadena polipeptídica simple. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un engarce polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión sobre sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp 269-315 (1994).

35 El término "anticuerpos biespecíficos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión del antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante el uso de un engarce demasiado corto para permitir la unión entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios están forzados a unirse con los dominios complementarios de otras cadenas y crear dos sitios de unión de antígeno. Los anticuerpos biespecíficos se describen en mayor profundidad en, por ejemplo, la patente europea 404.097; la patente mundial WO93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

45 Un anticuerpo "aislado" es aquel que ha sido identificado y separado o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Son componentes contaminantes de su entorno natural materiales que interferirían en el uso diagnóstico o terapéutico del anticuerpo, y puede incluir enzimas, hormonas, y otros solutos de naturaleza proteica o no proteica. En realizaciones preferentes, el anticuerpo podrá ser purificado (1) a más de un 95% en peso de anticuerpo determinado por el método de Lowry, y más preferentemente a más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos del extremo N-terminal o de la secuencia aminoacídica interna mediante el uso de un secuenciador de *spinning cup* o, (3) a homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Comassie o, preferentemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo localizado dentro de las células recombinantes en el que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Ordinariamente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante una etapa de purificación

55 La palabra "marca" cuando se usa aquí se refiere a un compuesto o composición detectable que está conjugado directa o indirectamente con el anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El marcaje puede detectarse por sí mismo (por ejemplo, marcajes radioactivos o fluorescentes) o, en el caso del marcaje enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

60 Como "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la cual puede adherirse el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas incluyen aquellos formados parcialmente o en su totalidad por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una purificación por columna (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término incluye también una fase sólida discontinua de partículas discretas, como las descritas en la patente americana U.S. 4.275.149.

65 Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

II. Composiciones y procedimientos de la invención

Polipéptidos PRO213-1, PRO1330 y PRO1449 completos

5 La presente invención proporciona secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican para polipéptidos denominados en la presente solicitud como PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449. En particular, se han identificado y aislado el cDNA que codifica para un polipéptido PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449, tal como se describe en mayor detalle en los ejemplos mostrados más adelante. Cabe indicar que a las proteínas producidas en rondas de expresión separadas se les puede otorgar diferentes números PRO, pero el número UNQ es único para cualquier ADN dado y la proteína codificada y no cambiará. Sin embargo, por simplicidad, en la presente memoria, las proteínas codificadas por DNA30943-1-1163-1, DNA64907-1163-1 y DNA64908-11-1, así como homólogos y variantes nativos adicionales incluidos en la definición anterior de PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 se referirán como "PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449", independientemente de su origen o modo de preparación.

15 Variantes del Polipéptido PRO

Además del la secuencia nativa completa de los polipéptidos PRO descritos aquí, se contempla que pueden prepararse variantes del polipéptido PRO. Las variantes del polipéptido PRO pueden prepararse mediante la introducción de cambios adecuados en el DNA del polipéptido PRO, o mediante síntesis del polipéptido PRO deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios aminoacídicos pueden alterar procesos post-traduccionales de los polipéptidos PRO, tales como la modificación del número o la posición de sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a la membrana.

Las variaciones en la secuencia completa de los polipéptidos PRO o en varios dominios de los polipéptidos PRO descritas aquí, pueden realizarse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y pautas sobre mutaciones conservativas y no conservativas marcadas, por ejemplo, en la patente americana U.S. 5.364.934. Las variaciones pueden ser sustituciones, deleciones, o inserciones de un o más codones que codifican para el polipéptido PRO que resulten en un cambio de secuencia aminoacídica del polipéptido PRO comparado con la secuencia nativa del polipéptido PRO. Opcionalmente, la variación es por sustitución de al menos un aminoácido por otro aminoácido en un o más dominios del polipéptido PRO. La pauta para determinar qué residuo aminoacídico puede ser insertado, sustituido, o delecionado sin afectar adversamente la actividad deseada puede encontrarse comparando la secuencia del polipéptido PRO con la de moléculas proteicas homólogas conocidas y minimizando el número de cambios en la secuencia aminoacídica en regiones con alta homología. Las sustituciones aminoacídicas pueden ser el resultado de reemplazar un aminoácido por otro que muestre similitud estructural y/o de propiedades químicas, como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones conservativas. Las inserciones o deleciones opcionalmente pueden estar en el rango de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia sistemáticamente, y analizando las variaciones de actividad resultantes en el ensayo *in vitro* descrito más adelante en los Ejemplos.

En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 1 bajo el título de sustituciones preferentes. Si tales sustituciones resultan en un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más substanciales, denominados en la Tabla 1 sustituciones ejemplares, o como se describe más abajo en referencia a clase de aminoácidos, y se analizarán los productos.

TABLA 1

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferentes
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gin; asn	lys
Asn (N)	Gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gin; lys; arg	arg
Ile (I)	Leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu

ES 2 317 967 T3

5	Leu (L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
	Lys (K)	arg; gin; asn	arg
	Met (M)	leu; phe; ile	leu
	Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
10	Pro (P)	ala	ala
	Ser (S)	thr	thr
	Thr (T)	ser	ser
15	Trp (W)	tyr; phe	tyr
	Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
20	Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

Se llevan a cabo modificaciones substanciales en la función o en la identidad inmunológica del polipéptido PRO mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de sustitución, por ejemplo, con una conformación de hélice u hoja, (b) la carga de hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se producen de forma natural se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

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

Las sustituciones no conservativas implicarán el cambio de un miembro de estas clases por otro de otra clase. Tales residuos sustituidos pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativos, o más preferentemente, en los sitios remanentes (no conservativos).

Las variaciones pueden realizarse usando métodos conocidos en el área tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida), el rastreo de alanina y la mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida [Carter y col., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis de casete [Wells y col., Gene, 34: 315(1985)], la mutagénesis de selección por restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden ser utilizadas sobre el DNA clonado para producir la variante de DNA del polipéptido PRO deseado.

El análisis de rastreo de aminoácidos puede emplearse también para identificar un o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos preferidos para el rastreo están los aminoácidos neutros, relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es uno de los aminoácidos de rastreo preferidos entre este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal en la variante. También se prefiere habitualmente la alanina porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como en las expuestas [Creghton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]. Si la sustitución por alanina no rinde suficiente cantidad de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

60 *Modificaciones de los Polipéptido PROs*

Dentro del ámbito de esta invención se incluyen modificaciones covalentes de los polipéptidos PRO. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de los residuos de aminoácidos diana del polipéptido PRO con un agente orgánico derivatizante que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N- o C-terminales del polipéptido PRO. La modificación con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para la unión del polipéptido PRO a una matriz de soporte insoluble en agua o a una superficie para purificar anticuerpos anti-polipéptido PRO y viceversa. Los agentes de unión comúnmente más usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-fenile-

tano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con el ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluidos disuccinimidil ésteres tales como el 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como el metil-3-[p-azidobenil]-ditiopropioimidato.

5 Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutaminil y asparaginil a los correspondientes residuos glutamyl y aspartil, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de 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 de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

10 Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos PRO incluida dentro del ámbito de esta invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. "La alteración del patrón de glicosilación" significa aquí, de cara a los objetivos previstos, la eliminación de un o más grupos carbohidrato que se encuentran en una secuencia nativa del polipéptido PRO, y/o la adición de un o más sitios de glicosilación que están presentes en la
15 secuencia del polipéptido PRO nativa, y/o la alteración del ratio y/o composición de los residuos de azúcar unidos al sitio(s) de glicosilación.

La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO puede conseguirse alterando la secuencia aminoacídica. Esta alteración puede lograrse, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, un o más residuos de serinas o treoninas a la secuencia nativa del polipéptido PRO (para lugares de O-glicosilación). La secuencia aminoacídica del polipéptido PRO puede ser alterada opcionalmente a través de cambios a nivel de DNA, particularmente mutando el DNA que codifica el polipéptido PRO en bases preseleccionadas de tal modo que los codones que se generen se traduzcan en los aminoácidos deseados.

25 El acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido constituye otro mecanismo para incrementar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido del polipéptido PRO. Estos métodos están descritos en la materia, por ejemplo, en la patente internacional WO87/05330 publicada el 11 de Septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp 259- 306 (1981).

30 La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido PRO puede conseguirse químicamente o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican para residuos aminoacídicos que sirven como dianas de glicosilación. Las técnicas de deglicosilación química se conocen en el área y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin y col., Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y por Edge y col., Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La ruptura enzimática de los grupos carbohidrato en los polipéptidos puede lograrse usando distintas endo- y
35 exo-glicosidasas como describe Thotakura y col., Meth. Enzymol., 138: 350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos PRO de la invención comprende la unión del polipéptido PRO a uno de los diversos polímeros no proteicos, e.j. polietilenglicol, polipropilenglicol o poli-oxialquilenos, tal y como se indica en las patentes americanas U.S. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

40 Los polipéptidos PRO de la presente invención pueden ser modificados también para formar una molécula quimérica que comprenda el polipéptido PRO unido a otro polipéptido heterólogo o a una secuencia aminoacídica. En una realización tal molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido PRO con un polipéptido etiqueta que proporciona un epitopo al cual un anticuerpo anti-etiqueta puede unirse de forma selectiva. El epitopo etiqueta generalmente se sitúa en el extremo amino o carboxil del polipéptido PRO. La presencia de dichas formas epitopo-etiqueta del polipéptido PRO pueden detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. También la provisión del epitopo etiqueta permite al polipéptido PRO estar listo para ser purificado fácilmente por afinidad usando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se una al epitopo etiqueta. Alternativamente, la molécula quimera puede comprender una fusión del polipéptido PRO con una inmunoglobulina o una región particular de una
50 inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión podría ser a la región Fc o a una molécula IgG.

Son bien conocidos en la materia varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina; el polipéptido etiqueta flu HA y su anticuerpo 12CA5 [Fleid y col., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y sus anticuerpos, el 8F9, el 3C7, el 6E10, el G4, el B7 y el 9E10 [Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)] y la etiqueta de la glicoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag [Hoop y col., Biotechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido del epitopo KT3 [Martin y col., Science, 225:192-194 (1992)]; el péptido de un epitopo de α -tubulina [Skinner y col., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)] y el péptido etiqueta de la proteína 10 del gen T7. [Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-9397 (1990)].

Preparación de los Polipéptidos PRO

65 La descripción indicada más abajo se refiere principalmente a la producción de polipéptidos PRO mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico correspondiente al polipéptido PRO deseado. Por supuesto, se contempla que se puedan utilizar métodos alternativos para preparar el polipéptido PRO, bien conocidos en la materia. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido PRO o fracciones del mismo,

pueden producirse mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo Stewart y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis proteica *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automática puede conseguirse, por ejemplo, usando un Sintetizador de Péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias porciones del polipéptido PRO deseado separadamente y combinarlas usando métodos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido PRO completo.

A. Aislamiento del DNA que codifica para el Polipéptido PRO

El DNA que codifica para el polipéptido PRO puede obtenerse de una librería de cDNA preparada a partir de un tejido que se considera que posee el mRNA del polipéptido PRO y que lo expresa en un nivel detectable. Por consiguiente, el DNA del polipéptido PRO humano puede ser obtenido adecuadamente a partir de una librería de cDNA preparada de un tejido humano, tal y como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica para el polipéptido PRO puede obtenerse también a partir de una librería genómica o mediante síntesis con oligonucleótidos.

Las librerías pueden ser cribadas con sondas (como anticuerpos contra el polipéptido PRO deseado u oligonucleótidos de alrededor de 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribaje de una librería de cDNA o genómica con la sonda seleccionada puede realizarse utilizando procedimientos estándar, como los descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Otro medio alternativo para aislar el gen que codifica para el polipéptido PRO deseado consiste en usar la metodología del PCR [Sambrook y col., *supra*; Dieffenbach y col., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los Ejemplos mostrados más abajo describen técnicas para el cribaje de librerías de cDNA. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de longitud suficiente y suficientemente específicas como para minimizar falsos positivos. Preferentemente el oligonucleótido se marca de tal forma que tras la hibridación al DNA puede ser detectado en la librería que se está cribando. Los métodos de marcaje son bien conocidos en el área, e incluye el uso de marcadores radioactivos como ATP marcado con P³², biotinización o marcaje enzimático. Sambrook y col., *supra* proporciona las condiciones de hibridación, incluyendo una moderada y alta astringencia.

Las secuencias identificadas mediante dichos métodos de cribaje de librerías pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas en bancos de datos públicos disponibles como el GenBank u otros bancos de datos de secuencias privadas. La identidad de la secuencia (tanto a nivel de aminoácidos como de nucleótidos) dentro de regiones definidas o a lo largo de la totalidad de la secuencia puede determinarse mediante el alineamiento de secuencia usando programas de ordenador como BLAST, ALIGN, DNASTAR e INHERIT que emplean diversos algoritmos para medir la homología.

El cribaje de librerías seleccionadas de cDNA o genómicas permite la obtención de ácidos nucleicos que tienen una secuencia codificante para la proteína usando la secuencia aminoacídica deducida descrita aquí por primera vez, y si es necesario, usando procedimientos convencionales de extensión de cebador como se describe en Sambrook y col., *supra*, para detectar precursores e intermediarios en el procesamiento del mRNA que no han sido inversamente transcritos en cDNA.

B. Selección y transformación de las células huésped

Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonaje descritos aquí para la producción del polipéptido PRO y se cultivan en medio de cultivo convencional modificado para que sea más apropiado para la inducción de promotores, la selección de transformantes, o la amplificación de los genes que codifican para las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y demás, pueden ser seleccionados por el experto en la materia. En general, los principios, protocolos, y técnicas prácticas, para maximizar la productividad de las células pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M Butler, ed (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., *supra*.

Los métodos de transfección son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, el método del CaPO₄ y la electroporación. La transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para las células dependiendo de la célula huésped utilizada. El tratamiento con calcio empleando cloruro cálcico, como se describe en Sambrook y col., *supra*, o la electroporación, generalmente se usan en procariontas u otras células que contienen barreras importantes como las paredes celulares. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células de plantas, como se describe por Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y la patente internacional WO 89/05859 publicada el 29 de Junio de 1989. Para células mamíferas sin tales paredes celulares, puede emplearse el método de la precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de las transformaciones de sistemas de célula huésped de mamífero en la patente americana U.S. 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo típicamente según el método de Van Solingen y col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, pueden usarse también otros métodos para introducir DNA en las células, tales como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policaciones, por ejemplo, polibrene o poliornitina. Para diversas

técnicas de transformación de células de mamífero, véase Keown y col., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., *Nature*, 336:348-352 (1988).

Entre las células huésped adecuadas para clonar o expresar el DNA en vectores se incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Entre los procariotas apropiados se incluyen, aunque no están limitados a ellos, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceas como *E. coli*. Se encuentran disponibles públicamente varias cepas de *E. coli* tales como la cepa *E. coli*K12 MM294 (ATCC 31, 446); *E. coli*X1776 (ATCC 31, 537); la cepa *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) y K5 772(ATCC 53,635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceas como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilli tales como *B. subtilis* y *B. Licheniformis* (por ejemplo, *B. Licheniformis*41P descrito en DD 266,710 publicado el 12 de Abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. Aeruginosa*, y *Streptomyces*. Se encuentran públicamente disponibles varias cepas de *E. coli* tales como la cepa *E. coli*K12 MM294 (ATCC 31, 446); *E. coli*X1776 (ATCC 31, 537); la cepa *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) y K5 772(ATCC 53,635). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes. La cepa W3110 es un huésped particularmente preferido o un huésped parental porque es una cepa común para la generación de productos de DNA recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticos. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para causar una mutación genética en los genes que codifican para proteínas endógenas del huésped; los ejemplos de tales huéspedes incluyen la cepa *E. coli* W3110 1A2, la cual tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa *E. coli* W3110 9E4, que presenta el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55,244) que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 ptr3phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan¹*; la cepa *E. coli* W3110 37D6 que tiene el genotipo completo *tonA ptr3phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilyG kan¹*; la cepa *E. coli* W3110 40B4 que es la cepa 37D6 con una mutación por delección *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa *E. coli* que presenta una proteasa periplásmica mutada descrita en la patente americana U.S. 4.946.783 publicada el 7 de Agosto de 1990. Alternativamente, están disponibles métodos de clonaje *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de las polimerasas de ácidos nucleicos.

Junto a procariotas, microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes adecuados para clonaje o expresión de vectores que codifican para el polipéptido PRO. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior que se usa comúnmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyce pombe* (Beach y Nurse, *Nature*, 290: 140[1981]; patente europea EP 139,383 publicado el 2 de Mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (patente americana U.S. 4.943.529; Fleer y col., *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C,CBC683, CBS4574; Louvencort 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. drosophilarium* (ATCC 36,906; Van den Berg y col., *bio/Technology*, 8: 135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (patente europea EP 402.226); *Pichia pastoris* (patente europea EP 183.070; Sreekrishna y col., *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (patente europea EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:5259-5263[1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (patente europea EP 394.538 publicado el 31 de Octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Totopocladium* (patente internacional WO 91/00357 publicada el 10 de Enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., *Biochem. Biophys. Res. Commn.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn y col., *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton y col., *Proc. Natl. Acad. USA*, 81: 1470-1474 [1984] y *A. niger* (Kelly y Hynes EMBO J., 4: 475-479 [1985]). Son adecuadas aquí levaduras metilotróficas e incluyen aunque no se limitan a ellas, levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas de los géneros *Hansenula*, *candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Puede encontrarse una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras en C. Anthony, *The Biochemistry of Methyloprotophytes*, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptidos PRO glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células de plantas. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para crecer en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977); células de ovario de hámster chino deficientes en 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 humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células humanas de hígado (Hep G2, HB 8065); y células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped adecuada se tomará según el criterio del experto en la materia.

C. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, cDNA o DNA genómico) que codifica un polipéptido PRO deseado puede ser insertado en un vector replicable para clonaje (amplificación del DNA) o para expresión. Varios vectores están disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, un cósmido, una partícula viral, o un fago. La secuencia del ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el DNA se inserta en un sitio(s) apropiado reconocido por un enzima de restricción usando técnicas conocidas en la materia. Los componentes de los vectores generalmente incluyen, aunque no están limitados a ello, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor, y una secuencia de finalización de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contengan uno o más de estos componentes requiere técnicas de ligación estándar conocidas por el experto en la materia.

El polipéptido PRO de interés puede producirse mediante recombinación no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, el cual puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un lugar específico de corte en el extremo N-terminal de la proteína madura o el polipéptido. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del DNA del polipéptido PRO que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp, o líderes de endotoxina II termoestables. Para la secreción en levaduras la secuencia señal puede ser por ejemplo, la del líder de invertasa de levadura, el líder factor alfa (incluidos los líderes de los factores α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la patente americana U.S. 5.010.182), el líder ácido fosfatasa, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. Albicans* (patente europea EP 362.176 publicada el 4 de Abril de 1990) o la señal descrita en la patente internacional WO 90/13646 publicada el 15 de Noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, pueden usarse secuencias señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tales como las secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de especies relacionadas, así como líderes secretores virales.

Tanto los vectores de expresión como los de clonaje contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Tales secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para muchas bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido μ es adecuado para levaduras, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonaje en células de mamíferos.

Los vectores de clonaje y expresión contienen típicamente un gen de selección, también llamado marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican para proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, ej., ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suplementan nutrientes críticos no disponibles en un medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica por la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células mamíferas son aquellos que permiten la identificación de células competentes que llevan el ácido nucleico del polipéptido PRO, como la DHFR o la timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea la DHFR salvaje es la línea celular CHO deficiente en DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub y col., Proc. Natl., Acad. Sci. USA 77:4216 (1980). El gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 es un gen de selección adecuado para ser usado en levadura [Stinchcomb y col., Nature, 282:39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7:141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura a la que le falta la habilidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 [Jones Genetics, 85:12 (1977)].

Los vectores de expresión y clonaje habitualmente contienen un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico del polipéptido PRO para dirigir la síntesis del mRNA. Se conocen promotores reconocidos por una variedad de potenciales células huésped. Los promotores adecuados para ser usados en huéspedes procariotas incluyen los sistemas de promotores de la β -lactamasa y la lactosa [Chang y col., Nature, 275:615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281:544 (1979)], la fosfatasa alcalina, un sistema de promotor del triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); patente europea EP 36.776], y promotores híbridos como el promotor *tac* [deBoer u col., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S. D.) unida operativamente al DNA que codifica por el polipéptido PRO deseado.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para ser usadas en huéspedes de levadura se incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otros enzimas glicolíticos [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tales como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexoquinasa, la piruvato decarboxilasa, la fosfofructoquinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la 3-fosfoglicerato mutasa, la piruvato quinasa, la triosafosfato isomerasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, promotores inducibles con la ventaja adicional de tener la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, las enzimas degradadoras asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. En la patente europea EP 73.657 se describen vectores adecuados y promotores para ser usados en la expresión en levaduras.

La transcripción del polipéptido PRO a partir de vectores en células huésped mamíferas se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de genomas de virus como el virus del polioma, el virus de la viruela aviar (patente inglesa UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), el 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 el virus del simio 40 (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con el sistema de célula huésped.

La transcripción de un DNA que codifica para el polipéptido PRO deseado en eucariotas superiores puede incrementarse insertando una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos del DNA que actúan en cis, habitualmente de alrededor de 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcrip-

ción. Actualmente se conocen muchas secuencias intensificadoras de genes mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un intensificador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el intensificador SV40 en el sitio tardío del origen de replicación (pb 100-270), el intensificador del promotor temprano del citomegalovirus, el intensificador del polio en el sitio tardío del origen de replicación, e intensificadores de adenovirus. El intensificador puede empalmarse en el vector en la posición 5' o 3' de la secuencia codificante del polipéptido PRO, pero es preferible que esté localizado en el sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del mRNA. Dichas secuencias están disponibles comúnmente en las regiones no traducidas en 5' y ocasionalmente en 3' de DNAs o cDNAs eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la región no traducida del mRNA que codifica para los polipéptidos PRO.

Aún se describen otros métodos, vectores y células huésped adecuadas para ser adaptadas a la síntesis de polipéptidos PRO en cultivo de células de vertebrados recombinantes en Gething y col., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei y col., *Nature*, 281:40-46 (1979); patente europea EP 117.060; y patente europea EP117.058.

D. Detección de la Amplificación/Expresión Génica

La amplificación génica y/o la expresión pueden medirse directamente en una muestra, por ejemplo, mediante transferencia de Southern convencional o transferencia de Northern para cuantificar la transcripción del mRNA [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de DNA), o hibridación *in situ*, usando una sonda adecuada marcada, basada en las secuencias proporcionadas aquí. Alternativamente, pueden usarse anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluidas cadena doble de DNA, de RNA y cadena doble híbridas de DNA-RNA o DNA-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo en donde la cadena doble esté unida a una superficie, por lo que una vez se ha formado la cadena doble en la superficie, puede detectarse la presencia del anticuerpo unido a la cadena doble.

La expresión génica puede medirse de forma alternativa mediante métodos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de las células o secciones de tejido y ensayos del cultivo celular o de los fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto del gen. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayos sobre fluidos de la muestra pueden ser tanto monoclonales como policlonales y pueden prepararse en cualquier animal. Es conveniente que los anticuerpos puedan prepararse contra la secuencia nativa del polipéptido PRO o contra un péptido sintético basado en las secuencias de DNA proporcionadas aquí o contra una secuencia exógena fusionada al DNA del polipéptido PRO y que codifique por un epitopo del anticuerpo específico.

E. Purificación del polipéptido

Las formas del polipéptido PRO pueden ser recuperadas del medio de cultivo o de los lisados de las células huésped. Si están unidos a membrana, pueden liberarse de la membrana mediante una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Tritón-X 100) o por ruptura enzimática. Las células empleadas en la expresión del polipéptido PRO pueden romperse a través de diversos mecanismos físicos o químicos como ciclos de congelación y descongelación, sonicación, ruptura mecánica o agentes que lisan las células.

Puede desearse purificar los polipéptidos PROs a partir de proteínas celulares recombinantes o polipéptidos. Los siguientes métodos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento o por columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase reversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con persulfato amónico; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A Sepharose para eliminar contaminantes como IgG; y columnas quelantes de metales para unirse a las formas epitopo-etiqueta del polipéptido PRO. Pueden usarse diversos métodos de purificación de proteínas, métodos conocidos en el área y descritos por ejemplo en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). El/Los paso(s) de purificación dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y en particular del polipéptido PRO sintetizado.

Usos de los Polipéptidos PRO

Las secuencias nucleotídicas (o sus complementarias) que codifican para los polipéptidos PRO de la presente invención tienen diversas aplicaciones en el área de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en mapeo cromosómico y génico y en la generación de RNA antisentido y DNA. El ácido nucleico que codifica para el polipéptido PRO puede también ser útil para la preparación de polipéptidos PRO mediante las técnicas recombinantes descritas aquí.

La secuencia nativa completa del ácido nucleico que codifica para el polipéptido PRO o porciones de la misma, pueden usarse como sondas sobre una librería de cDNA para aislar el gen del polipéptido PRO completo o para aislar incluso otros genes (por ejemplo, aquellos que codifican para variantes naturales del polipéptido PRO o polipéptidos PRO de otras especies) que tienen una identidad de secuencia con las secuencias nucleicas del polipéptido PRO.

Opcionalmente, la longitud de las sondas podrá ser de alrededor de 20 a 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivarse de la secuencia nucleotídica de cualquiera de las moléculas de DNA descritas aquí o a partir de secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos intensificadores e intrones de la secuencia de DNA nativa que codifica para el polipéptido PRO. A modo de ejemplo, un método de cribaje comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen del polipéptido PRO usando la secuencia de DNA conocida para sintetizar una sonda seleccionada de unas 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse con diversos marcadores, incluyendo radionucleótidos como P³² o S³⁵, o marcadores enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada con la sonda vía sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen del polipéptido PRO específico de la presente invención pueden usarse para analizar librerías de cDNA humano, DNA genómico o mRNA para determinar a qué miembros de dichas librerías hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen en más detalle más adelante en la sección de Ejemplos.

Los ESTs descritos en la aplicación presente pueden ser usados de forma similar como sondas, utilizando los métodos descritos aquí.

Las sondas pueden usarse también en técnicas de PCR para generar un banco de secuencias para la identificación de secuencias íntimamente relacionadas con el polipéptido PRO.

Las secuencias que codifican para el polipéptido PRO pueden usarse también para construir sondas de hibridación que permitan mapear el gen que codifica para ese polipéptido PRO y para el análisis genético de individuos con desórdenes genéticos. Las secuencias nucleotídicas proporcionadas aquí pueden ser mapeadas en un cromosoma y a regiones específicas de un cromosoma usando técnicas conocidas como la hibridación *in situ*, el análisis de ligamiento contra marcadores cromosómicos conocidos, y el análisis de hibridación con librerías.

Cuando la secuencia codificante para el polipéptido PRO codifica una proteína que se une a otra proteína, el polipéptido PRO puede usarse en ensayos para identificar sus ligandos. De forma similar, se pueden identificar inhibidores de la unión receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión pueden usarse también para la búsqueda de péptidos o pequeñas moléculas inhibitoras o agonistas de la interacción de unión. Los ensayos de cribaje pueden usarse para encontrar compuestos líderes que imitan la actividad biológica del polipéptido PRO nativo o de un ligando del polipéptido PRO. Dichos ensayos de cribaje incluirán ensayos susceptibles de analizar librerías químicas a gran escala, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de pequeñas moléculas candidatas a fármacos. Las pequeñas moléculas contempladas incluyen compuestos sintéticos orgánicos o inorgánicos. Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de análisis bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en el área.

Los ácidos nucleicos que codifican para el polipéptido PRO o sus formas modificadas pueden usarse también para generar tanto animales transgénicos como animales "knock out", los cuales, a su vez, son útiles en el desarrollo y análisis de reactivos útiles terapéuticamente. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que presenta células que contienen un transgen, el cual se introdujo en el animal o en un ancestro del animal en un estadio prenatal, por ejemplo, estadio embrional. Un transgen es un DNA que se ha integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla el animal transgénico. En una realización, el cDNA que codifica para el polipéptido PRO de interés puede usarse para clonar el DNA genómico que codifica para el polipéptido PRO según técnicas establecidas y las secuencias genómicas serán usadas para generar los animales transgénicos que contienen células que expresan el DNA que codifica para el polipéptido PRO. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, han llegado a ser convencionales dentro del área, por ejemplo en las patentes americanas U.S. 4.736.866 y 4.870.009. Determinadas células podrían ser diana para la incorporación del transgen que codifica para el polipéptido PRO mediante intensificadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia del transgen que codifica para el polipéptido PRO, introducido en la línea germinal del animal en un estadio embrional, pueden usarse para examinar el efecto del aumento de la expresión del DNA que codifica para el polipéptido PRO. Dichos animales pueden usarse como animales de análisis para reactivos que confieran protección frente, a por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. En concordancia con esta faceta de la invención, un animal es tratado con el reactivo de forma que una reducción de la incidencia de la condición patológica, comparado con animales no tratados que llevan el transgen, indicaría un potencial terapéutico de la intervención para la condición patológica.

Alternativamente, pueden usarse homólogos no-humanos de los polipéptidos PRO para construir un animal "knock out" para el polipéptido PRO el cual presenta un gen, que codifica para el polipéptido PRO de interés, defectivo o alterado como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica para el polipéptido PRO y el DNA genómico alterado que codifica para el polipéptido PRO introducido en una célula embrional del animal. Por ejemplo, el cDNA que codifica para el polipéptido PRO puede usarse para clonar el DNA genómico que codifica para el polipéptido PRO según técnicas establecidas. Una porción del DNA genómico que codifica para el polipéptido PRO puede ser eliminada o reemplazada por otro gen, como por un gen que codifique para un marcador seleccionable que puede utilizarse para monitorizar la integración. Típicamente se incluyen en el vector varias kilobases de secuencia de DNA flanqueante no modificada (tanto en el extremo 5' como en el 3') [véase ej., Thomas and Capecchi, Cell,51:503 (1987) para la descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de célula madre embrional (ej., por electroporación) y se seleccionan aquellas células en las que el DNA introducido se ha recombinado homológicamente con el DNA endógeno [véase ej., Li y col., Cell,69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan en un blastocito del animal (ej., un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación

[véase ej., Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A practical Approach, E.J. Robertson, ed (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Un embrión quimérico puede entonces implantarse en un animal adoptivo que sea una hembra pseudopreñada adecuada y el embrión se llevará a término para generar el animal "knock out". La progenie que porta el DNA recombinado homológamente en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándar y puede usarse para cruzarse con animales en los que todas las células del animal contienen el DNA recombinado homológamente. Los animales knockout pueden ser caracterizados por ejemplo, para su capacidad para defenderse de ciertas condiciones patológicas y para el desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido PRO.

10 Cuando se emplea la administración *in vivo* de un polipéptido PRO, las dosis normales pueden variar entre 10 ng/kg y 100 mg/kg de peso corporal de un mamífero o más por día, preferentemente de 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la literatura se provee de una guía sobre dosis particulares y métodos de administración; véase, por ejemplo, las patentes americanas U.S. 4.657.760; 5.206.344; ó 5.225.212. Es de esperar, que diferentes formulaciones serán efectivas para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes desórdenes, que la administración que tiene como objetivo un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar ser administrada de manera diferente a la de otro órgano o tejido.

20 Cuando se desee la administración sostenida de un polipéptido PRO en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiere la administración del polipéptido PRO, se puede contemplar la microencapsulación del polipéptido PRO. La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación sostenida se ha realizado con éxito con la hormona del crecimiento humana (rhGH, el interferón-(rhIFN-), la interleucina-2 y MN rgp120. Johnson y col., Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223(1993); Hora y col., Bio/Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Desing and Production of single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems." en Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Powell y Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; las patentes internacionales WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399, y patente americana U.S. 5,654.010.

30 Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando el polímero de ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y al rango amplio de propiedades biodegradables. Los productos de degradación del PLGA, los ácidos láctico y glicólico, pueden ser rápidamente aclarados del cuerpo humano. Además la degradabilidad de este polímero puede ajustarse desde meses hasta años dependiendo de su peso molecular y su composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en: M. Chasin y R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: New York, 1990, pp. 1-41.

35 Por ejemplo, para una formulación que pueda proveer una dosis de aproximadamente 80 g/kg/día en mamíferos con un peso corporal máximo de 85 kg, la mayor dosis sería aproximadamente de 6,8 mg del polipéptido PRO por día. Para conseguir este nivel de dosis, se necesita una formulación de liberación sostenida que contenga un máximo posible de carga de proteína (15-20% peso/peso de polipéptido PRO) con la menor liberación inicial posible (<20%). También es deseable una liberación continuada (orden cero) del polipéptido PRO a partir de micropartículas durante 1-2 semanas. Además la proteína encapsulada que va a ser liberada debe mantener su integridad y estabilidad durante todo el período de liberación deseado.

45 Los compuestos de la presente invención pueden ser formulados de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, a través de las cuales el polipéptido PRO de la presente invención se combina en adición con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Se describen portadores vehículos adecuados y sus formulaciones, incluidas otras proteínas humanas, por ejemplo, albúmina sérica humana en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980 Mack Publishing Co., editada por Oslo y col.

50 Las dosis y concentraciones deseadas de fármaco de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular pensado. Por ejemplo, en el tratamiento de la trombosis venosa profunda o de la enfermedad vascular periférica, se prefieren típicamente dosis en bolo con administraciones subsecuentes con el objetivo de mantener un nivel sanguíneo aproximadamente constante, preferentemente en el orden de unos 3 µg/ml.

55 Sin embargo, para usarse en conexión con las instalaciones de asistencia médica de emergencia en donde la capacidad de infusión generalmente no está disponible y debido a la naturaleza generalmente crítica de la enfermedad subyacente (por ejemplo, embolismo, infarto), generalmente será deseable proporcionar unas dosis iniciales mayores, tales como un bolo intravenoso.

60 *Anticuerpos contra el Polipéptido PRO*

La presente invención proporciona además anticuerpos anti-polipéptido PRO. Se incluyen ejemplos de anticuerpos que incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biospecíficos, y heteroconjugados.

65 *D. Anticuerpos policlonales*

Los anticuerpos contra el polipéptido PRO puede comprender anticuerpos policlonales. El personal experto en la materia conoce métodos para la preparación de anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales pueden desarro-

llarse en un mamífero, por ejemplo, mediante la administración de una o más inyecciones de un agente inmunizante, y si se desea un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir al polipéptido PRO o a una proteína suya de fusión. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante con una proteína que se conozca como inmunogénica en el mamífero que va a ser inmunizado. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas se incluyen, aunque no están limitados a ellos, la hemocianina de lapa, la albúmina sérica, la tiroglobulina bovina y el inhibidor de la tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que pueden ser utilizados se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalosa sintética dicorinomicolato). El protocolo de inmunización puede ser seleccionado por los expertos en la materia.

A. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos contra el polipéptido PRO pueden ser alternativamente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando los métodos de hibridoma, tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, un hámster u otro animal huésped adecuado, se inmuniza típicamente con un agente inmunizante para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unan específicamente al agente inmunizante. De manera alternativa, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*.

Típicamente, el agente inmunizante incluirá el polipéptido PRO de interés o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se usan o bien linfocitos de sangre periférica ("PBLs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos entonces se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Habitualmente las líneas celulares inmortalizadas son células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de roedores, de origen bovino y de origen humano. Habitualmente se usan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en medios de cultivo adecuados que preferentemente contienen una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si a las células parentales les falta el enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo de los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, que sostienen niveles estables elevados de expresión del anticuerpo por las células seleccionadas productoras de anticuerpo, y que son sensibles a medios tales como el medio HAT. Las líneas de mieloma murino se encuentran entre las células inmortalizadas más preferidas, las cuales pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. También se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos las líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc, New York, (1987) pp. 51-63].

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ser analizado para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el polipéptido PRO de interés. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA). Dichas técnicas y ensayos son conocidas en el área. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede ser determinada, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que las células de hibridoma deseadas hayan sido identificadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y crecimiento según métodos estándar [Goding, *supra*]. El medio adecuado para este propósito incluye, por ejemplo, medios como el Dulbecco's Modified Eagle's Medium y el RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como ascitas en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser aislados o purificados a partir del medio de cultivo o del fluido de los ascitas mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, proteína-A-Sepharose, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse también mediante métodos de DNA recombinante, tales como los descritos en la patente americana U.S. 4.816.567. El DNA que codifica para los anticuerpos monoclonales de la invención puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican para las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferente de dicho DNA. Una vez aislado, el DNA puede incorporarse en vectores de expresión, los cuales son entonces transfectados en células huésped como las células de simio COS, las células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de lo contrario no producirían la proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El DNA puede modificarse también, por ejemplo, sustituyendo la secuencia

codificante para los dominios constantes humanos de las cadenas pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas [patente americana U.S. 4.816.567; Morrison y col., *supra*] o por la unión covalente de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulina a la secuencia codificante para la inmunoglobulina. Dicho polipéptido no inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o puede ser sustituido por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Los métodos para preparar anticuerpos monovalentes son bien conocidos en el área. Por ejemplo, un método implica la expresión recombinante de una cadena ligera de la inmunoglobulina y una cadena pesada modificada. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto de la región Fc para prevenir la unión de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes se sustituyen por otro residuo aminoacídico o se eliminan para evitar la unión.

También son adecuados métodos *in vitro* para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de los anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente fragmentos Fab, puede conseguirse usando técnicas de rutina conocidas en el área.

C. Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos anti-polipéptido PRO de la invención pueden además comprender anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no-humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab)₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las cuales se sustituyen residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor por residuos de un CDR de especies no humanas (anticuerpo donador) como ratón, rata o conejo que tengan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el CDR importado o en secuencias de la región estructural. En general el anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todos o al menos un, y típicamente dos, dominios variables, en el cual todas o substancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o substancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), típicamente aquella de una inmunoglobulina humana [Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

Se conocen bien en el área métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene un o más residuos aminoacídicos introducidos en él a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos aminoacídicos no-humanos se denominan con frecuencia como residuos "de importación", los cuales típicamente son tomados de un dominio variable "de importación". La humanización puede ser realizada esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeven y col., Science, 239: 1534-1536 (1988)], sustituyendo CDRs de roedor o secuencias CDR por las secuencias correspondientes a un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente americana U.S. 4.816.567), en donde substancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido 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 se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

Los anticuerpos humanos pueden producirse también usando diversas técnicas conocidas en el área, incluyendo librerías de expresión en fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. están también disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77 (1985) y Boerner y col., J Immunol., 147(1):86-95 (1991)].

D. Anticuerpos Biespecíficos

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

Los métodos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el área. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de 2 parejas de inmunoglobulina de cadena pesada/cadena ligera, en donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]. Debido a la aleatoria variedad de cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de los cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta habitualmente se consigue

mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en la patente internacional WO 93/08829 publicada el 13 de Mayo de 1993 y en Traunecker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Se pueden fusionar dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferentemente se produce con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, y las regiones CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los DNAs que codifican para las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina se insertan en vectores de expresión separados, y son co-transfectados en un organismo huésped adecuado. 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 están también dentro del ámbito de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos, por ejemplo, han sido propuestos para dirigir células del sistema inmune hacia células no deseadas [patente americana U.S. 4.676.980], y para el tratamiento de la infección por VIH [patentes internacionales WO 91/00360; WO 92/2000373; patente europea EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* usando métodos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes de unión. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato y aquellos descritos, por ejemplo en la patente americana U.S. 4.676.980.

25 Utilizaciones de los Anticuerpos anti-polipéptido PRO

Los anticuerpos anti-polipéptido PRO de la invención tienen diversas utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-polipéptido PRO pueden usarse en ensayos de diagnóstico para un polipéptido PRO, por ejemplo, detectando su expresión en células, tejidos o sueros específicos. Pueden usarse diversas técnicas de diagnóstico conocidas en el área, tales como los ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados tanto en fases heterogéneas como homogéneas [Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. Los anticuerpos usados en los ensayos de diagnóstico pueden marcarse con una fracción detectable. La fracción detectable debería ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la fracción detectable puede ser un radioisótopo, como H³, C¹⁴, P³², S³⁵, o I¹²⁵, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, como el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina o la luciferina, o bien un enzima como la fosfatasa alcalina, la beta-galactosidasa o la peroxidasa de rábano. Puede emplearse cualquier método conocido en el área para conjugar el anticuerpo con la fracción detectable, incluyendo aquellos métodos 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).

Los anticuerpos anti-polipéptido PRO pueden ser útiles también para la purificación por afinidad del polipéptido PRO a partir de cultivos celulares recombinantes o fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos contra el polipéptido PRO están inmovilizados sobre un soporte adecuado, como Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en el área. El anticuerpo inmovilizado se pone entonces en contacto con una muestra que contenga el polipéptido PRO a purificar, y a partir de entonces se lava el soporte con un solvente adecuado que eliminará substancialmente todo el material en la muestra excepto el polipéptido PRO, el cual está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro solvente apropiado que liberará el polipéptido PRO del anticuerpo.

Se ofrecen los siguientes ejemplos con propósitos únicamente ilustrativos, y no se pretende de ningún modo limitar el ámbito de la presente invención.

Ejemplos

Los reactivos disponibles comercialmente nombrados en los ejemplos se usan según las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de toda la especificación, por número de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland.

Ejemplo 1

60 *Cribado por homología de los dominios extracelulares para la identificación de nuevos polipéptidos y de los correspondientes cDNAs que los codifican*

Las secuencias del dominio extracelular (ECD) (incluidas las secuencias correspondientes al péptido señal de secreción, si existía) de alrededor de 950 proteínas conocidas secretadas procedentes del banco de datos público Swiss-Prot se utilizaron para la búsqueda de bancos de datos EST. Los bancos de datos EST, incluyeron los bancos de datos públicos (por ejemplo, Dayhoff, GenBank), y bancos de datos en propiedad (por ejemplo, LIFESECTM, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó mediante el programa informático BLAST o BLAST2 (Altschul y Gish, *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)) comparando las secuencias de proteína ECD con secuencias EST en 6

pautas de traducción. Estas comparaciones con una puntuación en el Blast de 70 (o en algunos casos 90) o mayor, que no codificaban para proteínas conocidas, se agruparon y combinaron en secuencias de DNA consenso con el programa "phrap" (Phil Gree, University of Washington, Seattle, WA; (<http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html>)).

Mediante esta búsqueda por homología del dominio extracelular, se ensamblaron secuencias consenso de DNA en relación a otras secuencias EST identificadas mediante Phrap. Además, las secuencias de DNA consenso obtenidas, fueron a menudo (pero no siempre) ampliadas con ciclos repetidos de BLAST y phrap para aumentar la secuencia consenso tanto como era posible en las fuentes de secuencias EST descritas más arriba.

En base a las secuencias consenso obtenidas tal como se ha descrito, se sintetizaron oligonucleótidos y se utilizaron por PCR para la identificación de una librería de cDNA que contenía la secuencia de interés y como sondas para el aislamiento de un clon con la secuencia codificante completa de un polipéptido PRO. Los cebadores para la PCR, sentido de la traducción (.f) y antisentido (.r), por lo general de 20 a 30 nucleótidos, se diseñaron frecuentemente para generar un producto de PCR con un tamaño de 100-1000 bp. La secuencia consenso es mayor que 1-1.5 kbp. Con el fin de cribar algunas librerías para un clon de secuencia completa, el DNA de las librerías se sometió a amplificación por PCR, tal como Ausubel *et al.*, en Current Protocols in Molecular Biology, con el par de cebadores de PCR. Una librería positiva se utilizó a continuación para el aislamiento de clones codificantes para el gen de interés mediante un oligonucleótido sonda y uno de los pares de cebadores.

Las librerías de cDNA utilizadas para el aislamiento de clones de cDNA se contruyeron mediante métodos estándares con reactivos disponibles comercialmente como los que facilita la firma Invitrogen, San Diego, CA. El cDNA se cebó con un oligo dT que contenía una diana NotI, unida con adaptadores romos SalI tratados con quinasas, se digirió con NotI, se separó por tamaño en electroforesis en gel y se clonó en una orientación determinada en un vector de clonado adecuado (como por ejemplo pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene lugares SfiI; Holmes *et al.*, Science, 253: 1278-1280 (1991)) en las dianas únicas XhoI y NotI.

Ejemplo 2

Aislamiento de clones de cDNA por cribado con amilasa

1. Preparación de una librería de cDNA cebada con oligo dT

El mRNA se aislaba de un tejido humano de interés mediante los reactivos y protocolos de Invitrogen, San Diego, CA (Fast Track 2). Este RNA se utilizó para generar una librería de cDNA oligodT en el vector pRK5D con los reactivos y protocolos de Life Technologies, Gathersburg, MD (Super Script Plasmid System). En este procedimiento, el cDNA de doble cadena mayor de 1000 bp, se separó por tamaño y el que estaba unido a SalI/NotI se clonó en un vector digerido con XhoI/NotI. pRK5D es un vector de clonaje que tienen un lugar de inicio de la transcripción sp6 seguido por una diana de restricción SfiI precedido de las dianas de clonaje XhoI/NotI.

2. Preparación de librería de cDNA cebada aleatoriamente

Una librería de cDNA secundaria se generó para representar de manera preferencial los extremos 5' de los clones de cDNA. El RNA Sp6 se generó de una librería primaria (descrita más arriba) y ese RNA se utilizó para generar una librería de cDNA cebada aleatoriamente en el vector pSST-AMY.0 con los reactivos y protocolos de Life Technologies (Super Script Plasmid System, a los que se ha hecho referencia más arriba). En este procedimiento, el cDNA de doble cadena se separó por tamaño de 500-1000 bp., se unió a adaptadores romos NotI, con SfiI y se clonó en un vector digerido por SfiI/NotI. pSST-AMY.0 es un vector de clonaje que tienen el promotor de la alcohol deshidrogenasa de levadura precedido por dianas de clonaje de cDNA y la secuencia de la amilasa de ratón (la secuencia madura sin la señal de secreción) seguida por el terminador de la alcohol deshidrogenasa de levadura después de las dianas de clonaje. Por tanto los cDNAs clonados en ese vector, fusionados en la misma pauta de lectura con la secuencia de la amilasa, permitirán la secreción de la amilasa de las colonias de levaduras convenientemente transfectadas.

3. Transformación y detección

El DNA de la librería descrito en el párrafo 2 más arriba, se enfrió en hielo y se añadieron bacterias electrocompetentes DH10B (Life Technologies, 20 ml). La bacteria y la mezcla del vector se electroporaron según recomendaciones del fabricante). A continuación, se añadió medio SOC (Life Technologies, 1 ml) y la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Los transformantes se plaquearon en 20 placas de LB estándares de 150 mm, que contenían ampicilina y se incubaron durante 16 horas (37°C). Se aislaron las colonias positivas y se aisló el DNA de los clones del bacteriano con protocolos estándares, por ejemplo, gradiente de CsCl. Con el DNA purificado se procedió según los protocolos de levadura que siguen.

Los métodos de levadura se separaron en tres categorías: (1) Transformación de levadura con el plásmido combinado con el vector de cDNA, (2) Detección y aislamiento de clones de levadura que secretaban amilasa; (3) amplificación por PCR del inserto directamente de la colonia de levadura y purificación del DNA para secuenciación y análisis posteriores.

ES 2 317 967 T3

La cepa de levadura utilizada fue HD56-5^a (ATCC-90785). Esta cepa tiene el fenotipo siguiente: MAT alfa, ura3-52, leu2-3, leu2-112, his3-11, his3-15, MAL⁺, SUC⁺, GAL⁺. Se suelen emplear de manera preferente, mutantes de levadura que tienen mecanismos post-traduccionales deficientes. Estos mutantes pueden tener alelos deficientes translocados *sec71*, *sec72*, *sec62*, siendo el *sec71* truncado el más preferente. De forma alternativa, los antagonistas (incluyendo nucleótidos antisentido y/o ligandos) que interfieren con la acción normal de estos genes, otras proteínas implicadas en el mecanismo post-traduccionales (por ejemplo, SEC61p, SEC72p, SEC62p, SEC63p, TDJ1p o SSA1p-4p) o la formación de complejos de esas proteínas pueden emplearse en combinación con la levadura que expresa la amilasa.

La transformación se realizó en base al protocolo descrito por Gietz *et al.*, Nucl. Acid. Res., 20:1425 (1992). Las células transformadas se inocularon del agar a un medio complejo de caldo YEPD (100 ml) y se crecieron toda la noche a 30°C. El caldo de YEPD se preparó tal como está descrito en Kaiser *et al.*, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 207 (1994). El cultivo de toda la noche se diluyó hasta 2×10^6 células/ml (aproximadamente OD₆₀₀=0,1) en caldo de YEPD (500 ml) y se dejó crecer hasta 1×10^7 células/ml (aproximadamente OD₆₀₀=0,4-0,5).

Las células se recogieron y prepararon para la transformación transfiriéndolas a botellas para el rotor GS3 y se centrifugaron en el rotor GS3 durante 5 min a 5000 rpm, el sobrenadante se descartó y a continuación el precipitado se resuspendió en agua estéril, y se centrifugó otra vez en tubos falcon de 50 ml a 3500 rpm en una centrífuga Beckman GS-6KR. El sobrenadante se descartó y las células se lavaron subsiguientemente con LiAc/TE (10 ml, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5, 100 mM Li₂OOCCH₃), y se resuspendieron en LiAc/TE (2,5 ml).

La transformación se realizó por la mezcla en tubos de microcentrífuga de las células preparadas (100 µl), con DNA de esperma de salmón de cadena sencilla desnaturizado recientemente (Lofstrand Labs, Gaithersburg, MD) y el DNA transformante (1 µg, vol < 10 µl). La mezcla se mezcló brevemente en el vórtex y se añadió a continuación, PEG/TE al 40% (600 ml, 40% polietileno-glicol-4000, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM Li₂OOCCH₃, pH 7,5). La mezcla se agitó cuidadosamente en un vaso de reacción centrifugado en una microfuga a 12000 rpm durante 5-10 segundos, se decantó y resuspendió en TE (500 µl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) seguido por centrifugación. Las células se diluyeron en TE (1 ml) y las alícuotas (200 µl) se propagaron en un medio selectivo previamente preparado en placas de 150 mm (VWR).

De forma alternativa, a pesar de las múltiples pequeñas reacciones, la transformación se realizó como una reacción simple a gran escala en la que las cantidades de reactivos se añadieron proporcionalmente.

El medio selectivo utilizado fue un agar de dextrosa completamente sintético sin uracilo (SCD-Ura) preparado como se ha descrito en Kaiser *et al.*, Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 208-210 (1994). Los transformantes se crecieron a 30°C durante 2-3 días.

La detección de las colonias que secretaban amilasa se realizó por inclusión de almidón rojo en el medio selectivo de crecimiento. El almidón se combinó con el colorante rojo (Reactive Red-120, Sigma) como en el procedimiento descrito por Biely *et al.*, Anal. Biochem. 172: 176-179 (1988). El almidón combinado se incorporó a las placas de agar SCD-Ura a una concentración final de 0,15% (p/v) y se tamponó con fosfato de potasio hasta un pH de 7,0 (50-100 mM de concentración final).

Las colonias positivas se picaron y se sembraron en un medio selectivo fresco (en placas de 150 mm) con el fin de obtener colonias aisladas identificables. Las colonias sencillas aisladas positivas para la secreción de la amilasa se detectaron por incorporación directa de almidón rojo en el agar SCD-Ura tamponado. Las colonias positivas se determinaron mediante su capacidad para romper el almidón resultando en un halo claro rodeando las colonias positivas, visualizable de manera directa.

4. Aislamiento de DNA mediante amplificación por PCR

Cuando se aisló una colonia positiva, se recogió una parte con un asa de siembra y se diluyó en agua estéril (30 µl) en una placa de 96 pocillos. Las colonias positivas, en ese punto, se congelaron y guardaron para un análisis posterior o se amplificaron inmediatamente. Se utilizó una alícuota de células (5 µl) como molde para la reacción de PCR en un volumen de 25 µl que contenía 0,5 µl Klentaq (Clontech, Palo Alto, CA); 4,0 µl de dNTPs 10 mM (Perkin Elmer-Cetus); 2,5 µl de tampón Kentaq (Clontech); 0,25 µl oligo de sentido 5' 1; 0,25 µl de oligo anti-sentido 2; 12,5 µl agua destilada. La secuencia del oligonucleótido 1 sentido fue:

5' -TGTA AACGACGGCCAGTTAAATAGACCTGCAATTATTAATCT -3'

La secuencia del oligonucleótido anti-sentido 2 fue:

5' -CAGGAAACAGCTATGACCACCTGCACACCTGCAAATCCATT -3'

ES 2 317 967 T3

La PCR se realizó como sigue:

- | | | | |
|----|-----------------|-------------------------|-------------|
| 5 | a. | Desnaturalización 92°C, | 5 min |
| | b. 3 ciclos de | Desnaturalización 92°C, | 30 segundos |
| | | Hibridación 59°C, | 30 segundos |
| 10 | | Extensión 72°C, | 60 segundos |
| | c. 3 ciclos de | Desnaturalización 92°C, | 30 segundos |
| 15 | | Hibridación 57°C, | 30 segundos |
| | | Extensión 72°C, | 60 segundos |
| | d. 25 ciclos de | Desnaturalización 92°C, | 30 segundos |
| 20 | | Hibridación 55°C, | 30 segundos |
| | | Extensión 72°C, | 60 segundos |
| 25 | e. | Mantener a 4°C | |

Las regiones subrayadas de los oligonucleótidos anillaron con las regiones promotoras de ADH y de la amilasa, respectivamente, y amplificaron una región de 307 bp del vector pSST-AMY.0 cuando el inserto no estaba presente. De forma frecuente, los primeros 18 nucleótidos del extremo 5'- terminal de esos oligonucleótidos, contenía lugares de hibridación para los cebadores de secuenciación. Por tanto, el producto de la reacción de PCR de un vector vacío fue de 343 bp. Sin embargo, la secuencia señal fusionada con el cDNA resultó en secuencias largas de nucleótidos.

A continuación de la PCR, una alícuota de la reacción (5 µl) se examinó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) tal como se describió en Sambrook *et al.*, *supra*. Los clones resultantes, en un único producto de PCR mayor que 400 bp, se analizaron por secuenciación después de la purificación con un equipo de columnas 96 Qiaquick PCR (Qiagen Inc., Chtsworth. CA).

Ejemplo 3

40 *Aislamiento de clones de cDNA que codificaban PRO213-1, PRO1330 y PRO1449 humana*

Se ensambló una secuencia de DNA de consenso en relación a otras secuencias EST utilizando phrap tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior. Esta secuencia consenso se designa en la presente invención como DNA28735. En base a la secuencia consenso DNA28735, se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar por PCR una librería de cDNA que contenía la secuencia de interés, y 2) para usar como sondas para el aislamiento de un clon de la secuencia codificante completa para PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449. Se sintetizaron una pareja de cebadores de PCR (sentido y anti-sentido):

50 Cebador PCR sentido 5'-TGGAGCAGCAATATGCCAGCC-3'

55 Cebador PCR anti-sentido 5'-TTTCCACTCCTGTCGGGTTGG-3'

De forma adicional, se construyó una sonda de hibridación con oligonucleótidos sintéticos a partir de la secuencia consenso DNA28735 que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

60 sonda de hibridación

5'-GGTGACACTTGCCAGTCAGATGTGGATGAATGAATGCAGTGCTAGGAGGG-3'

65 Con el fin de cribar algunas librerías como fuente de clones de secuencia completa, el DNA de librerías se cribó mediante amplificación por PCR con la pareja de cebadores para PCR descrita anteriormente. A continuación, se utilizó una librería positiva para el aislamiento de clones que codificaban para el gen de PRO213-1, PRO1330 y/o

ES 2 317 967 T3

PRO1449 utilizando los oligonucleótidos de la sonda y uno de los cebadores de PCR. El RNA para la construcción de las librerías de cDNA se aisló de tejido humano fetal de pulmón.

5 La secuenciación del DNA de los clones aislados tal como se ha descrito anteriormente produjo la secuencia completa de DNA que codificaba PRO213-1, PRO1330 y/o PRO1449 [DNA30943-1-1163-1, DNA64907-1163-1 y DNA64908-1163-1, respectivamente].

10 Las secuencias de nucleótidos completas que corresponden a DNA30943-1-1163-1, DNA64907-1163-1 y DNA64908-1163-1, respectivamente. DNA30943-1-1163-1, DNA64907-1163-1 y DNA64908-1163-1 contienen un único marco de lectura abierto con un sitio de inicio de la traducción aparente en las posiciones de nucleótidos 399-401, 488-490 y 326-328, respectivamente, y que acaba en el codón de parada en las posiciones de nucleótidos 1218-1220, 1307-1309 y 1145-1147, respectivamente (figuras 1, 3 y 5). El precursor de los polipéptidos previstos tiene 273, 273 y 273 aminoácidos de largo, respectivamente (figuras 2, 4 y 6). DNA30943-1-1163-1, DNA64907-1163-1 y DNA64908-1163-1 se han depositado con ATCC y les asignó los no. de depósito ATCC 209791, 203243 y 203242, respectivamente.

15 El análisis de la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO123-1 completo, sugiere que una parte del mismo posee una homología significativa con la proteína del gen 6 específico de la detención del crecimiento humano. Más específicamente, un análisis del banco de datos Dayhoff (versión 35.45 SwissProt 35) puso de manifiesto una homología significativa entre la secuencia de aminoácidos de PRO213 y las siguientes secuencias Dayhoff, HSMHC3W5A_6 y B48089.

20 El análisis adicional de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos PRO1330 y PRO1449 completos indica una identidad significativa con notch4. Más específicamente, un análisis del banco de datos Dayhoff (versión 35.130 SwissProt 35) puso de manifiesto una identidad significativa entre PRO1330 y las siguientes secuencias Dayhoff, D86566_1 y NEL_HUMAN.

Ejemplo 4

30 *Uso de ácidos nucleicos codificantes del polipéptido PRO como sondas de hibridación*

El procedimiento siguiente describe el uso de secuencias de nucleótidos codificantes para polipéptidos PRO como sondas de hibridación.

35 El DNA que comprende la secuencia codificante para el polipéptido PRO de interés tal como se ha descrito, puede emplearse como sonda o como material de base para la preparación de sondas que permitan la búsqueda de DNAs homólogos (como los que codifican para variantes del polipéptido PRO presentes en la población natural) en librerías de cDNA de tejido humano o de librerías genómicas de tejido humano.

40 La hibridación y el lavado de los filtros que contienen la librería de DNAs se realizó bajo condiciones de alta astringencia tal como se detalla a continuación. Una sonda marcada, derivada del ácido nucleico codificante para el polipéptido PRO, se hibrida con un filtro en formamida al 50%, SSX 5X, SDS 0,1%, 0,1% pirofosfato sódico, fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, solución de Denhardtts 2X, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de SSC 0,1 X y SDS 0,1% a 42°C.

45 Los DNAs que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia nativa codificante para el polipéptido PRO, puede a continuación ser identificada con técnicas estándares conocidas en este campo.

Ejemplo 5

50 *Expresión de polipéptidos PRO en E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de un polipéptido PRO deseado por expresión recombinante en *E. coli*.

55 La secuencia de DNA codificante para el polipéptido PRO deseado se amplifica inicialmente con los cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener lugares de restricción para enzimas que corresponden con los lugares de restricción presentes en el vector de expresión seleccionado. Pueden emplearse una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo es el vector disponible pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar *et al.*, *Gene*, 2:95 (1977)), que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. Este vector, se digiere con enzimas de restricción y se desfosforila. Las secuencias de PCR amplificadas se ligan al vector. El vector preferentemente incluye secuencias que codifican para un gen de resistencia a los antibióticos, un promotor *trp*, un segmentos poli-His (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y lugares de digestión por enteroquinasa), la región codificante para el polipéptido específico PRO, un terminador transcripcional de lambda y un gen *argU*.

65 La mezcla de ligación se utiliza a continuación para transformar una cepa de *E. coli* seleccionada con los métodos descritos en Sambrook *et al.*, *supra*. Los transformantes se identifican por su habilidad para crecer en placas de LB y se

ES 2 317 967 T3

seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El DNA del plásmido puede aislarse y confirmarse por análisis de restricción y secuenciación.

5 Los clones seleccionados pueden crecer toda la noche en medio de cultivo líquido como caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda una noche puede subsecuentemente utilizarse para el inóculo de un cultivo a gran escala. A continuación, se crecen las células hasta la densidad óptica deseada, tiempo durante el cual se activa el promotor.

10 Después del cultivo durante algunas horas, las células se recogen por centrifugación. El precipitado celular obtenido por centrifugación se solubiliza con varios agentes conocidos en la materia, y el polipéptido PRO solubilizado puede a continuación ser purificado con una columna de quelación de metales en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

15 En la aplicación EP No. 99912321.9, el polipéptido PRO se expresaba en *E. coli* en una forma unida a un fragmento poli-His según el método que sigue a continuación. El DNA codificante para los polipéptidos PRO se amplificó primero los cebadores seleccionados para la PCR. Los cebadores contenían lugares para enzimas de restricción que corresponden a los lugares de restricción presentes en el vector de expresión, y otras secuencias útiles que proporcionan un lugar eficiente de inicio de la traducción, purificación rápida en una columna de quelación de metales, y digestión proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias amplificadas por PCR y unidas a secuencias poly-His se li-
20 garon después con un vector de expresión que se utilizó para transformar un huésped *E. coli* derivado de la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) Ion galE rpoHts(htpRTS)clpP(lacip)). Los transformantes se crecieron primero en LB que contenía 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta una O.D. de 600 desde 3-5. Los cultivos se diluyeron entre 50-100 veces en medio CRPA (preparado por mezcla de 3,57 g(NH₄)₂SO₄, 0.71 g de citrato sódico 2H₂O, 1.07 g KCl, extracto de levadura de Difco 5.36 g, Sheffield Hycase SF 5,36 g en 500 ml de agua al mismo tiempo que 110 mM
25 MPOS, PH 7,3, glucosa 0,55 % (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se crecieron durante 20-30 horas aproximadamente a 30°C en agitación. Se tomaron muestras para verificar su expresión por análisis en SDS-PAGE, y el conjunto del cultivo se centrifugó y se obtuvo un precipitado celular. El precipitado celular se congeló hasta su purificación y replegado.

30 La pasta de *E. coli* procedente de fermentaciones de 0,5 a 1 L. (6-10 g de precipitado), se resuspendió en 10 volúmenes (w/v) de guanidina 7 M, tampón Tris 20 mM, PH 8. Se añadieron sulfito sódico sólido y tetratiónato sódico, para unas concentraciones finales de 0.1 M y 0.01, respectivamente y la solución se dejó en agitación magnética durante toda la noche a 4°C. Este paso resulta en desnaturalización de la proteína, con los residuos cisteínas bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifugó a 40.000 rpm en una Ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluyó con 3-5 volúmenes de tampón de la columna quelante de metales (guanidina 6 M, 20 ml Qiagen
35 Ni-NTA columna quelante de metales equilibrada en el tampón 53. La columna se lavó con tampón adicional que contenía imidazol 50 mM. Las fracciones que contenían la proteína deseada se precipitaron y almacenaron a 4°C. La concentración de proteína se estimó por su absorbancia a 280 nm con el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

40 Las proteínas se replegaron por dilución de la muestra lentamente en tampón de replegado preparado fresco que consistía en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegado se escogieron de manera que la concentración final de la proteína estuviera entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegado se dejó en agitación magnética cuidadosa durante 12-36 horas a 4°C. La reacción de replegado se enfrió por la adición de TFA a una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente
45 3). Antes de una purificación ulterior de la proteína, la solución se filtró a través de un filtro de 0.22 micras y se añadió acetonitrilo hasta una concentración final de 2-10%. La proteína replegada se cromatografió en una columna de fase reversa Poros R1/H con un tampón móvil de 0,1% TFA con elución en un gradiente de acetonitrilo de 10 a 80%. Alícuotas de fracciones con una absorbancia A280 se analizaron en geles de poliacrilamida SDS y las fracciones
50 conteniendo proteína replegada homogénea se precipitaron. En general, las especies replegadas adecuadamente de la mayoría de las proteínas, se eluyeron a concentraciones menores de acetonitrilo ya que esas especies son las más compactas con su hidrofobicidad interior tapada por la interacción con la resina de fase reversa. Las especies agregadas se eluyeron habitualmente a altas concentraciones de acetonitrilo. Además para resolver las formas de proteínas no plegadas completamente de la forma plegada, el paso de la fase reversa también extrae la endotoxina de las muestras.

55 Las fracciones que contenían las proteínas PRO replegadas deseadas se precipitaron y el acetonitrilo se extrajo con evaporación de nitrógeno cuidadosamente directamente sobre la solución. Las proteínas se formularon en Hepes 20 mM, pH 6,8 cloruro de sodio 0,14 M y manitol al 4% por diálisis o por filtración en gel mediante resina Superfina G25 (Pharmacia) equilibrada en el tampón formulado y filtrado de manera estéril.

60 Ejemplo 6

Expresión de Polipéptidos PRO en células de mamífero

65 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma glicosilada de un polipéptido PRO deseado, mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

El vector pRK5 (véase la EP 307, 247, publicada el 15 de Marzo, 1989), se empleó como vector de expresión. De manera opcional, el DNA codificante para el polipéptido PRO se ligó a pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas

ES 2 317 967 T3

para permitir la inserción del DNA del polipéptido PRO por los métodos de ligación descritos en Sambrook *et al.*, *supra*. El vector resultante se denominó pRK5-polipéptido PRO.

5 En otra realización, las células huéspedes seleccionadas pueden ser las células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se crecen en confluencia en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero bovino fetal y opcionalmente con componentes nutritivos y/o antibióticos. Unos 10 μg de DNA de pRK5-polipéptido PRO se mezclan con 1 μg de DNA codificante para el gen VA RNA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31:543 (1982)] y se disuelven en 500 μl de Tris-HCl 1 mM, 0,1 mM EDTA, 0,227 M CaCl_2 . A esta mezcla se añaden, en gotas, 500 μl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, 1,5 mM NaPO_4 y se deja progresar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se resuspende y se añade a las células 293 dejándose durante cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. Las células 293 se lavan con medio de cultivo libre de suero, se añade medio fresco y las células se incuban durante 5 días.

15 Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se sustituye por medio de cultivo solo o por medio que contiene 200 $\mu\text{Ci/ml}^{35}\text{S}$ -cisteína y 200 $\mu\text{Ci/ml}^{35}\text{S}$ -metionina. Después de 12 horas de incubación, el medio condicionante se recoge, concentra en un filtro en centrifugación, y se carga en un gel de SDS 15%. El gel procesado se seca y se expone por un período de tiempo que permita revelar la presencia del polipéptido PRO. Los cultivos que contienen las células transfectadas pueden someterse a una incubación adicional (en medio libre de suero), analizándose el medio en bioensayos seleccionados.

20 En una técnica alternativa, el polipéptido PRO puede introducirse en las células 293 de forma transitoria utilizando el procedimiento del dextrano de sulfato descrito por Sompanyrac y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). Las células 293 se crecen a una densidad máxima en un frasco de cultivo centrifugador y se añaden 700 μg de DNA de pRK5-polipéptido PRO. Las células se concentran en el frasco centrifugador y se lavan con PBS. El precipitado de DNA-dextrano se incuba con el sedimento celular durante cuatro horas. Las células se tratan a continuación con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con el medio de cultivo de tejidos y se re-introducen en el frasco centrifugador que contiene medio de cultivo, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina bovina y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina bovina. Al cabo de cuatro días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los restos celulares. La muestra que contenía el polipéptido PRO puede entonces concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento, como la diálisis y/o la cromatografía por columna.

30 En otra realización, los polipéptidos PRO pueden expresarse en células CHO. El DNA de pRK5-polipéptido PRO puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos como el CaPO4 o el dextrano-DEAE. Tal como se describió más arriba, los cultivos celulares pueden incubarse y el medio reemplazarse con medio de cultivo (solo) o con medio que contenga un marcador radioactivo como la metionina-S35. Después de determinar la presencia del polipéptido PRO, el medio de cultivo puede reemplazarse con medio sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y luego se cosecha el medio condicionado. El medio que contenía el polipéptido PRO expresado pueden a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

40 El polipéptido PRO etiquetado epitópicamente también puede expresarse en células huésped CHO. El polipéptido PRO puede subclonarse en otro vector distinto al pRK5. El inserto del subclón puede experimentar PCR para fusionarse en el marco de lectura con una etiqueta epitópicamente seleccionada, tal como una etiqueta poli-his en un vector de expresión en Baculovirus. El inserto del polipéptido PRO etiquetado con poli-His se puede subclonar a continuación en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Por último, las células CHO se pueden transfectar (tal como se describió anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje se puede realizar, tal como se describió anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el polipéptido PRO etiquetado con poli-His se puede concentrar a continuación y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante la cromatografía de afinidad con Ni^{2+} -quelato. En EP99912321.9, la expresión estable en células CHO se realizó utilizando el procedimiento siguiente. Las proteínas se expresaron como una construcción de IgG (inmuno adhesina), en las que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo, dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionaron a una secuencia de la región constante de IgG1 que contenía la bisagra, los dominios CH2 y CH3 y/o es una forma etiquetada con poli-His.

55 Después de la amplificación por PCR, los DNAs respectivos se subclonan en un vector de expresión en CHO utilizando técnicas estándares, tal como se describió en Ausubel y col., Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley y Sons (1997). Se construyeron vectores de expresión en CHO con dianas de restricción compatibles en 5' y 3' del DNA de interés para permitir el barajamiento adecuado de los cDNAs. El vector utilizado para la expresión en CHO se describe por Lucas y col., Nucl. Acids. Res. 24:9 (1774-1779, (1996)) y utiliza el intensificador de la transcripción del promotor temprano de SV40 para dirigir la expresión del cDNA de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

65 Se introdujeron 12 μg del DNA plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección disponibles comercialmente Superfect® (Quiagen), Dospert® o Fugene® (Boehringer Mannheim). Las células se crecieron tal como se describe en Lucas y col., *supra*. Aproximadamente, 3×10^7 células se congelaron en una ampolla para el posterior crecimiento producción tal como se describe más adelante.

ES 2 317 967 T3

Las ampollas que contenían el DNA del plásmido se descongelaron colocándolas en un baño y se mezclaron con el vórtex. Los contenidos se pipetearon en un tubo de centrifuga que contenía 10 ml de medio y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 10 ml de medio selectivo (filtrado con un filtro PS20 de 0,2 μm con suero bovino fetal al 5% filtrado con un filtro de 0,2 μm). Las células se alicuotaron en tubos de centrifugación de 100 ml que contenían 90 ml de medio selectivo. Al cabo de 1-2 días, las células se transfirieron a un frasco de 250 ml que se rellenó con 150 ml de medio selectivo y se incubó a 37°C. Al cabo de 2-3 días, se sembraron frascos de cultivo centrifugadores de 250, 500 y 2000 ml con 3×10^5 células/ml. El medio celular se cambió por medio fresco mediante centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque puede utilizarse cualquier tipo de medio para CHO, se utilizó un medio de producción descrito en la patente americana U.S. 5.122.469, publicada el 16 de junio de 1992. Un frasco de cultivo centrifugador de 3 l se sembró con $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determinó el número de células y el pH. El día 1, se obtuvo una muestra del cultivo y se inició la introducción de aire filtrado. El día 2, se obtuvo una muestra del cultivo, la temperatura se desplazó a 33°C, y se añadieron 30 ml de una solución de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Durante la producción, se ajustó el pH para mantenerlo a aproximadamente 7,2. Al cabo de 10 días, o hasta que la viabilidad descendiera por debajo del 70%, el cultivo celular se cosechó mediante centrifugación y se filtró con un filtro de 0,22 μm . El filtrado se guardó a 4°C o se cargó inmediatamente en columnas para su purificación.

Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las proteínas se purificaron utilizando una columna Ni-NTA (Quiagen). Después de la purificación, se añadió imidazol al medio condicionado a una concentración de 5 mM. El medio condicionado se pasó por una columna de 6 ml N9-NTA equilibrada con Hepes 20 mM, pH 7,4, tampón que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después del cargado, la columna se lavó con tampón de equilibrado adicional y la proteína se eluyó con tampón de equilibrado que contenía imidazol 0,25 mM. La proteína altamente purificada se desaló a continuación en un tampón de almacenamiento que contenía Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml de Pharmacia y se guardó a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purificaron del medio condicionado de la manera siguiente. El medio condicionado se cargó en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado con tampón fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lavó extensamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluída se neutralizó inmediatamente recogiendo alícuotas de 1 ml en tubos que contenían 275 μl de tampón Tris 1 M, pH 9. A continuación, se desaló la proteína altamente neutralizada en tampón de almacenamiento, tal como se describió anteriormente para las proteínas etiquetadas poli-His. La homogeneidad se valoró en geles de acrilamida-SDS y por secuenciación N-terminal mediante degradación de Edman.

Ejemplo 7

Expresión de polipéptidos PRO en levaduras

El procedimiento siguiente describe la expresión recombinante de un polipéptido PRO deseado en levaduras.

En primer lugar, los vectores de expresión en levaduras se construyeron para la producción o la secreción intracelular de polipéptidos PRO a partir de un promotor ADH2/GAPDH. El DNA que codifica un polipéptido PRO deseado, una secuencia de péptido señal y el promotor se insertaron en dianas de restricción adecuadas en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular del polipéptido PRO. El DNA que codifica el polipéptido PRO puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el DNA que codifica el promotor ADH2/GAPDH, la secuencia líder/señal secretora del factor alfa de levaduras y las secuencias engarces (si fuera necesario) para la expresión del polipéptido PRO.

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

El polipéptido PRO recombinantes puede aislarse a continuación y purificarse eliminando las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y luego concentrar el medio utilizando cartuchos de filtros seleccionados. El concentrado que contiene el polipéptido PRO puede purificarse posteriormente utilizando columnas de resinas cromatográficas.

Ejemplo 8

Expresión de los polipéptidos PRO en células de insecto infectadas con Baculovirus

El procedimiento siguiente describe la expresión recombinante de polipéptidos PRO en células de insecto infectadas con Baculovirus.

ES 2 317 967 T3

El polipéptido PRO deseado se fusiona cadena arriba de una etiqueta epitópica en un vector de expresión de baculovirus. Dicha etiqueta epitópica incluye las etiquetas poli-his y las etiquetas de inmunoglobulinas (como las regiones Fc de IgG). Se pueden utilizar diversos plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los comercialmente disponibles como el pVL1393 (Novagen). En resumen, el polipéptido PRO o la porción deseada del polipéptido PRO (como la secuencia codificante del dominio extracelular de una proteína transmembrana) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios en las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar dianas de restricción enzimática. El producto se digiere a continuación con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclonan en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera mediante co-transfección del plásmido anterior y el DNA del virus BaculoGold™ (Pharmigen) en células *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) con lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Al cabo de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se cosechan y utilizan para amplificaciones posteriores. La infección viral y la expresión de proteínas se realizan tal como se describe en O'Reilly y col., *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual*, Oxford University Press (1994).

A continuación, se purifica el polipéptido PRO-etiquetado con poli-His expresado, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con quelato-Ni²⁺ de la manera siguiente. Se preparan los extractos de las células Sf9 infectadas con virus recombinantes, tal como se describe por Rupert y col., *Nature*, 362:175-179 (1993). En resumen, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%, EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; KCl 0,4 M) y se sonican dos veces durante 20 s en hielo. Los sonicados se aclaran mediante centrifugación y a continuación se diluye el sobrenadante 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (disponible comercialmente de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a una velocidad de flujo de 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta alcanzar una A₂₈₀ basal con tampón de carga, en dicho punto la fracción se inicia la recolecta de fracciones. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye específicamente la proteína unida. Después de alcanzar de nuevo la A₂₈₀ basal, se hace pasar por la columna un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan por SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia de western con Ni²⁺-NTA conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contenían el polipéptido PRO etiquetado con His-10 se recogen, agrupan y se dializan contra tampón de carga.

Alternativamente, la purificación del polipéptido PRO etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse utilizando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo por ejemplo, cromatografía en columnas de Proteína A o G.

En la solicitud de patente europea EP 999.12321.9, los polipéptidos PRO se expresaron satisfactoriamente en células de insecto Sf9 infectadas con baculovirus. Aunque la expresión se realizó actualmente a una escala de 0,5-2 l, puede realizarse fácilmente a mayores escalas (por ejemplo, 8 l). Las proteínas se expresaron como una construcción IgG (inmuno adhesina), en la que la región extracelular de la proteína se fusionó a una región constante de una IgG1 que contenía la bisagra, dominios CH2 y CH3 y/o las formas etiquetadas con poli-His.

Para la expresión en células Sf9 en baculovirus, después de la amplificación por PCR, las secuencias codificantes respectivas en el vector de expresión de baculovirus (pb.PH.IgG para fusiones proteicas con IgG y pb.PH.His.c para fusiones proteicas etiquetadas con poli-His) y el vector y el DNA del baculovirus Baculogold® (Pharmigen) se co-transfectaron en 10⁵ células de *Spodoptera frugiperda* (Sf9) (ATCC CRL 1711), utilizando Lipofectin (Gibco BRL). Los plásmidos pb.PH.His y pb.PH.IgG son modificaciones del vector pVL1393, vector de expresión de baculovirus ampliamente disponible comercialmente (Pharmigen), con regiones poliengarce modificadas para incluir las secuencias etiquetas His o Fc. Las células se crecieron en medio Hink TNM-FH suplementado con FBS al 10% (Hyclone). Las células se incubaron durante 5 días a 28°C. El sobrenadante se cosechó y se utilizó para la amplificación viral infectando células Sf9 en medio Hink TNM-FH suplementado con FBS al 10% a una multiplicidad de infección (MOI) de 10. Las células se incubaron durante 30 días a 28°C. El sobrenadante se cosechó y la expresión de las construcciones en el vector de expresión de baculovirus se determinó mediante unión del lote de 1 ml de sobrenadante con 25 ml de bolas de Ni-NTA (Qiagen) para las proteínas etiquetadas con histidina o bolas de Proteína-A Sepharose CL-4B (Pharmacia) para proteínas etiquetadas con IgG seguido por el análisis de SDS-PAGE, comparándolo con una concentración conocida de una proteína estándar teñida con de azul de Coomassie.

El sobrenadante de la primera amplificación viral se utilizó para infectar un cultivo en frascos centrifugadores (500 ml) de células Sf9 crecidas en medio ESF-921 (Sistemas de expresión LLC) a una MOI aproximada de 0,1. Las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se cosechó y filtró. Se repitieron los análisis de unión de lote y de SDS-PAGE, tantas veces como fue necesario, hasta confirmar la expresión de cultivo.

El medio condicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 l) se cosechó mediante centrifugación para eliminar las células y se filtró con un filtro de 0,22 µm. Para las construcciones etiquetadas con poli-His, la proteína se purificó con una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio condicionado a una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombeó en una columna Ni-NTA de 6 ml equilibrada con Hepes 20 mM, pH 7,4, y un tampón que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después de cargar, la columna se lavó con tampón de equilibrio adicional y se eluyó la proteína con el tampón de equilibrio que contenía imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se desaló a continuación en un tampón

ES 2 317 967 T3

de almacenamiento con Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacenó a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contenían Fc) de proteínas se purificaron del medio condicionado de la manera siguiente. El medio condicionado se hizo pasara por una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en tampón fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Después de cargar, la columna se lavó extensamente con el tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluída se neutralizó inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en los tubos con 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desaló en tampón de almacenamiento tal como se describió para las proteínas etiquetadas con poli-His. Se verificó la homogeneidad de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PEG) y secuenciación aminoacídica N-terminal mediante degradación de Edman.

En la solicitud de Patente Europea No. 99912321.9, los polipéptidos PRO se expresaron de forma satisfactoria en células de insecto Hi5 infectadas con baculovirus.

Para la expresión de células de insecto Hi5 infectadas con baculovirus, el DNA codificante del polipéptido PRO se puede amplificar con sistemas adecuados, como la Pfu (Stratagene), o fusionarse cadena arriba (5' de) de etiqueta epitópica contenida en un vector de expresión de baculovirus. Dichas etiquetas epitópicas incluyen las etiquetas poli-his y las etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Se pueden utilizar diversos plásmidos, incluyendo los derivados de plásmidos disponibles comercialmente como el pVL1393 (Novagen). En resumen, el polipéptido PRO o la porción deseada del polipéptido PRO (como la secuencia codificante del dominio extracelular de una proteína transmembrana) se amplifica mediante PCR con los cebadores complementarios con las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar dianas de enzimas de restricción flanqueantes (seleccionadas). A continuación, se digiere el producto con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión. Por ejemplo, los derivados de pVL1393 pueden incluir la región Fc de la IgG humana (pb.PH.IgG) o una etiqueta histidina (pb.PH.His) cadena abajo (3' de) de la secuencia NOMBRE. Preferentemente, la construcción del vector se secuencia para su verificación.

Las células Hi5 se crecen a una confluencia del 50% en condiciones de, 27°C, sin CO₂, sin penicilina/estreptomina. Para cada placa de 150 mm, 30 µg del vector derivado de pIE que contiene el polipéptido PRO se mezcla con 1 ml de medio Ex-Cell (Medio: Ex-Cell + 1/100 L-Glu JRH Biosciences # 14401-78P (nota: este medio es sensible a la luz), y en un tubo separado, 100 µl de CellFectin (CellFECTIN (GibcoBRL #10362-010) (agitar con ayuda del vórtex hasta mezclado completo)), se mezclan con 1 ml de medio Ex-Cell. Las dos soluciones se combinan y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añaden 8 ml de medio ExCell a 2 ml de la mezcla de DNA/CellFECTIN y todo ello se dispone sobre las células Hi5 previamente lavadas una vez con medio ExCell. La placa se incuba en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla de DNA/CellFECTIN se aspira, y las células se lavan una vez con ExCell para eliminar el exceso de CellFECTIN. Se añaden 30 ml de medio ExCell fresco y las células se incuban durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se cosecha y la expresión del polipéptido PRO en el vector de expresión de baculovirus puede determinarse mediante ensayos de unión de lote de 1 ml de sobrenadante con 25 ml de bolas de Ni-NTA (Qiagen) para las proteínas etiquetadas con histidina o bolas Proteína A-Sepharose CL4B (Pharmacia) para proteínas etiquetadas con IgG, seguido del análisis de SDS-PAGE comparándolo con una concentración conocida de una proteína estándar por tinción de azul de Coomassie.

El medio condicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 l) se cosechó mediante centrifugación para eliminar las células y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm. Para las construcciones etiquetadas con poli-His, la proteína que comprende el polipéptido PRO se purifica utilizando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado a una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombea a la columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada con Hepes 20 mM, pH 7,4, tampón que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min, a 4°C. Después de cargar, la columna se lava con tampón de equilibrio adicional y se eluye la proteína con el mismo tampón que contiene imidazol 0,25 M. La proteína altamente purificada se desala a continuación en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna de G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se almacena a -80°C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) de proteínas se purifican del medio condicionado de la manera siguiente. El medio condicionado se bombea en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que ha sido equilibrada con tampón fosfato Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava extensamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 5,3. La proteína eluída se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala a continuación en tampón de almacenamiento tal como se describió anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad del polipéptido PRO se puede valorar mediante geles de poliacrilamida-SDS y secuenciación aminoacídica N-terminal por degradación de Edman y otros procedimientos analíticos, según se requiera.

Ejemplo 9

65 Preparación de anticuerpos que se unen a los polipéptidos PRO

Este ejemplo muestra la preparación de anticuerpos monoclonales que se pueden unir específicamente a un polipéptido PRO.

ES 2 317 967 T3

Las técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en Goding, *supra*. Los inmunógenos que pueden utilizarse incluyen el polipéptido PRO purificado, las proteínas de fusión que contienen el polipéptido PRO y las células que expresan el polipéptido PRO recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse por el experto en la materia sin excesiva experimentación.

5 Se inmunizaron ratones Balb/c con el inmunógeno polipéptido PRO emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyectaron subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsionó en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyectó en las almohadillas de las patas traseras del animal. Los ratones inmunizados se estimularon a continuación 10 a 12 días más tarde con inmunógeno adicional emulsionado con adyuvante seleccionado. Durante varias semanas después, también podían estimularse los ratones con inyecciones de inmunización adicionales. Se obtuvieron muestras de suero periódicamente de los ratones mediante sangrado retro-orbital para analizar en ensayos ELISA para detectar los anticuerpos anti-polipéptido PRO.

15 Después de haber detectado un anticuerpo adecuado, los animales “positivos” para los anticuerpos pueden ser inyectados con una inyección intravenosa de polipéptido PRO. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se obtienen las células del bazo. Las células del bazo se fusionan (utilizando polietilén glicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionada, como por ejemplo P3X63AgU.1, disponible del ATCC, CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que pueden sembrarse en placas de cultivo de 96 pocillos con medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no-fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

20 Las células de hibridomas se rastrearán en un ensayo ELISA por su reactividad contra el polipéptido PRO. La determinación de células de hibridoma “positivas” secretoras de anticuerpos monoclonales deseados contra el polipéptido PRO se halla dentro del ámbito de la materia.

Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones Balb/c para producir ascitas que contengan anticuerpos anti-polipéptido PRO. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecerse en frascos de cultivo o botellas de cultivo giratorias. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en las ascitas puede lograrse utilizando la precipitación con sulfato amónico, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, se puede utilizar la cromatografía de afinidad mediante la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

Ejemplo 10

35 *Polipéptidos PRO quiméricos*

Los polipéptidos PRO pueden expresarse como proteínas quiméricas con uno o más dominios polipeptídicos adicionales añadidos para facilitar la purificación de la proteína. Dichos dominios facilitadores de la purificación incluyen, pero no se limitan a, péptidos queladores de metales como los módulos histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, los dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/ afinidad FLAGS™ (Immunex Corp., Seattle Wash.). La inclusión de una secuencia de engarce escindible como el Factor Xa o la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego Calif) entre el dominio de purificación y se secuencia del polipéptido PRO puede ser de utilidad para facilitar la expresión del DNA codificante del polipéptido PRO.

Ejemplo 11

50 *Purificación de polipéptidos PRO utilizando anticuerpos específicos*

Los polipéptidos PRO nativos o recombinantes pueden purificarse mediante diversas técnicas estándares en la materia relativas a la purificación de proteínas. Por ejemplo, el pro-polipéptido PRO, el polipéptido PRO o el pre-polipéptido PRO se purifican mediante cromatografía de inmunospecificidad utilizando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO de interés. En general, una columna de inmunospecificidad se construye mediante acoplamiento covalente del anticuerpo anti-polipéptido PRO con una resina cromatográfica activada.

Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir del suero bien mediante precipitación con sulfato amónico o mediante purificación sobre Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Al igual que los anticuerpos monoclonales se preparan de ascitas de ratones mediante precipitación con persulfato amónico o cromatografía sobre Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica como la SEPHAROSE™ activada por CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se utiliza una columna de inmunospecificidad de dicho tipo en la purificación del polipéptido PRO mediante preparación de una fracción de células que contienen el polipéptido PRO en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de las células completas o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial con adición de detergente o por otros procedimientos bien conocidos en la materia. Alternativamente, el polipéptido PRO contiene una secuencia señal que puede secretarse en cantidad útil en el medio donde crecen las células.

Una preparación que contiene el polipéptido PRO soluble se pasa por la columna de afinidad, a continuación se lava la columna en condiciones que permiten la absorción preferencial del polipéptido PRO (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones tales que se rompe la unión anticuerpo/polipéptido PRO (por ejemplo, un tampón con pH bajo de aproximadamente pH 2-3, o una concentración elevada de un agente caotrópico como la urea o el ión tiocianato) y por último se recoge el polipéptido PRO.

Ejemplo 12

10 *Búsqueda de fármacos*

La invención es particularmente útil para el rastreo de compuestos utilizando polipéptidos PRO o mediante la unión a un fragmento de éste con cualquiera de las técnicas de búsqueda de fármacos. El polipéptido PRO o un fragmento de éste que se utilice en dicho análisis puede hallarse en libre en solución, fijado a un soporte sólido, adherido a la superficie celular o localizado intracelularmente. Un procedimiento de rastreo de fármacos utiliza células eucariotas o procarionas que se transforman establemente con los ácidos nucleicos recombinantes y expresan el polipéptido PRO o sus fragmentos. Los fármacos se seleccionan frente a dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, bien en la forma viable o fija, pueden utilizarse para ensayos de unión estándar. Se puede cuantificar por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido PRO o un fragmento y el agente que se analiza. Alternativamente, se puede examinar la disminución de la formación del complejo entre el polipéptido PRO y su célula diana o sus receptores diana que está causada por el agente que se analiza.

En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos de rastreo de fármacos o cualquier otro agente que pueda afectar a la enfermedad o trastorno asociado con el polipéptido PRO. Estos procedimientos comprenden el contacto con uno de dichos agentes que contengan el polipéptido PRO o un fragmento de éste y el análisis de (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO o su fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO o un fragmento de éste y la célula, mediante procedimientos bien conocidos en la materia. En dichos ensayos de unión competitiva, el polipéptido PRO o un fragmento de éste se marca de modo característico. Después de una incubación adecuada, el polipéptido PRO libre o un fragmento de éste se separa de la forma unida y la cantidad de libre o de marcaje no presente en el complejo es una medida de la capacidad del agente determinado para unirse al polipéptido PRO o para interferir con el complejo polipéptido PRO/célula.

Otra técnica para el rastreo de fármacos proporciona una selección de alto rendimiento para compuestos con afinidad de unión adecuada por un polipéptido y se describe con detalle en la patente internacional WO 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. En resumen, grandes cantidades de compuestos de pequeños péptidos distintos a analizar se sintetizan sobre un sustrato sólido, como puntas o cualquier otra superficie. Tal como se aplica para un polipéptido PRO, los compuestos peptídicos a analizar se hacen reaccionar con el polipéptido PRO y se lavan. El polipéptido PRO unido se detecta mediante procedimientos bien conocidos en la materia. El polipéptido PRO purificado también puede servir como recubrimientos de placas para utilizar en las técnicas de rastreo de fármacos mencionadas anteriormente. Además, se pueden utilizar anticuerpos neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

La presente invención también contempla la utilización de ensayos de rastreo competitivo de fármacos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse al polipéptido PRO compiten específicamente con un compuesto test por la unión con el polipéptido PRO o con fragmentos del mismo. De esta manera, pueden utilizarse anticuerpos para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido PRO.

Ejemplo 13

50 *Diseño racional de fármacos*

El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales del polipéptido activo biológicamente de interés (es decir, un polipéptido PRO) o de moléculas pequeñas con las que interactúan, por ejemplo, los agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos puede utilizarse para generar fármacos que sean formas más activas o estables del polipéptido PRO o que intensifiquen o interfieran con la función del polipéptido PRO *in vivo* (Hodgson, *Bio/Technology*, 9:19-21 (1991)).

En una aproximación, la estructura tridimensional del polipéptido PRO, o de un complejo inhibidor del polipéptido PRO, se determina mediante cristalografía de rayos X, mediante modelado informático o, de forma más característica, mediante una combinación de dos aproximaciones. Es necesario conocer tanto la forma como las cargas del polipéptido PRO para comprender la estructura y determinar los sitios activos de la molécula. Aunque a veces, pero no muy frecuentemente, se puede obtener información útil sobre la estructura del polipéptido PRO mediante modelado basado en la estructura de proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural relevante se utiliza para diseñar moléculas de tipo polipéptido-PRO análogas o para identificar inhibidores eficientes. Ejemplos útiles del diseño racional de fármacos puede incluir moléculas con una actividad mejorada o estabilidad, tal como se muestra por Braxton y Wells, *Biochemistry*, 31:7796-7801 (1992) o que actúan como inhibidores, o antagonistas de péptidos nativos tal como se muestra por Athauda y col., *J. Biochem.*, 113:742-746 (1993).

ES 2 317 967 T3

También es posible aislar un anticuerpo específico de una diana, seleccionado mediante ensayo funcional, tal como se describió anteriormente y a continuación resolver su estructura cristalina. Esta aproximación, en principio, produce un núcleo del fármaco, o farmacore, sobre el cual se pueden diseñar otros fármacos. Es posible evitar la cristalografía de proteínas generando anticuerpos anti-idiotipos (anti-ids) contra un anticuerpo funcional, activo farmacológicamente. Como una imagen en espejo de una imagen en el espejo, el sitio de unión de los anti-ids se esperaría que fuera un análogo del receptor original. El anti-id podría utilizarse para identificar y aislar péptidos a partir de bancos de péptidos producidos química o biológicamente. Los péptidos aislados actuarían a continuación como el farmacore.

En virtud de la presente invención, se pueden obtener cantidades suficientes del polipéptido PRO para realizar dichos estudios analíticos como la cristalografía por rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia aminoacídica del polipéptido PRO que se proporciona aquí facilitará una guía para los que utilicen técnicas de modelado informático en lugar de o además de la cristalografía por rayos X.

Ejemplo 14

Amplificación génica

Este ejemplo muestra que los genes que codifican varios polipéptidos PRO se amplifican en el genoma de ciertos cánceres humanos. La amplificación se asocia con la sobreexpresión del producto génico, lo que indica que el polipéptido PRO es una diana útil para la intervención terapéutica en algunos cánceres, tales como colon, pulmón, y otros cánceres. Los agentes terapéuticos pueden tomar la forma de antagonistas de genes que codifican polipéptidos PRO, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murinos-humanos, humanizados o humanos contra el polipéptido PRO.

El material de partida para el cribado fue el ADN genómico aislado a partir de diversos cánceres. El ADN se cuantifica de forma precisa, por ejemplo, fluorimétricamente. Como control negativo, se aisló ADN de las células de 10 individuos sanos normales que se agrupó y utilizó como controles del ensayo para la copia génica en individuos sanos (NorHu).

Se utilizaron el ensayo de la nucleasa 5' (por ejemplo TaqMan™) y la PCR cuantitativa a tiempo real (por ejemplo, ABI Prism 7700 Sequence Detection System™ (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)) para hallar genes potencialmente amplificados en algunos cánceres. Los resultados se utilizaron para determinar si el ADN que codifica el polipéptido PRO está sobreexpresado en cualquiera de los cánceres de pulmón o colon que se cribaron. El resultado se indicó en unidades Delta CT. Una unidad corresponde a 1 ciclo de PCR o a aproximadamente una amplificación de 2 veces con respecto a la normal, dos unidades corresponden a 4 veces, 3 unidades a 8 veces y así sucesivamente. La cuantificación se obtuvo utilizando cebadores y una sonda fluorescente TaqMan™ derivada del gen codificante del polipéptido PRO. Las regiones del polipéptido PRO que seguramente contienen secuencias de ácido nucleico único y que son las menos probables de tener intrones ayustados ("spliced out") son las preferidas para la derivación con cebador, por ejemplo, la región 3' no traducida.

La reacción del ensayo de la nucleasa 5' es una técnica basada en la PCR fluorescente que utiliza la actividad 5'-exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para monitorizar la amplificación a tiempo real. Se utilizan dos cebadores de oligonucleótidos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar una secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de la PCR. La sonda no es extensible por la enzima Taq ADN polimerasa, y se marca con un colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente desactivante. Cualquier emisión inducida por láser del colorante informador es desactivado por el colorante desactivante cuando los dos colorantes se localizan estrechamente próximos, ya que están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la enzima Taq ADN polimerasa corta la sonda de forma dependiente del molde. Los fragmentos de la sonda resultantes se disocian en solución, y la señal del colorante informador liberado se libera del efecto desactivante del segundo fluoróforo. Una molécula del colorante informador se libera para cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante informador no desactivante proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los resultados.

El procedimiento de la nucleasa 5' se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativa a tiempo real, tal como el de ABI Prism 7700™ Sequence Detection. El sistema consiste en un termociclador, un láser, una cámara de dispositivo acoplado a la carga (CCD) y un ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser se recoge a tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos, y se detecta en la CCD. El sistema incluye el programa para poner en marcha el instrumento y para analizar los resultados.

Los resultados del ensayo con nucleasa 5' se expresan inicialmente como Ct, o el umbral del ciclo. Esto se define como el ciclo en el que se acumula la señal del informador sobre el nivel de fondo de fluorescencia. Los valores de Ct se utilizan como medición cuantitativa del número relativo de copias iniciales de una secuencia diana particular en una muestra de ácido nucleico.

Se observó que los genes que codifican los siguientes polipéptidos PRO se amplificaban en el ensayo anterior: PRO213-1.

ES 2 317 967 T3

Ejemplo 15

Hibridación in situ

5 La hibridación in situ es una técnica potente y versátil para la detección y localización de secuencias de ácido nucleico en las preparaciones celulares o de tejidos. Puede ser útil, por ejemplo, para identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución en el tejido, identificar y localizar la infección viral, seguir los cambios en la síntesis de mRNA específico y con la ayuda del mapeo cromosómico.

10 La hibridación *in situ* se realizó según la versión optimizada del protocolo de Lu y Gillet, Cell Vision 1:169-176 (1994), utilizando las ribosondas marcadas con P³² generadas por PCR. En resumen, los tejidos humanos incluidos en parafina, fijados en formalina se seccionaron, desparafinaron, desproteinizaron en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37°C y se procesaron posteriormente para la hibridación in situ tal como se describió por Lu y Gillet, *supra*. Una ribosonda antisentido marcada con UTP-P³² se generó de un producto de PCR y se hibridó a 55°C durante la noche. A continuación los portaobjetos con las hibridaciones se sumergieron en la emulsión fotográfica Kodak NTB2 y se expusieron durante 4 semanas.

Síntesis de la ribosonda marcada con P³³

20 6,0 µl de UTP-P³² (125 mCi) (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) se secaron al vacío. Y a cada tubo que contenía el UTP-P³² secado se añadieron los siguientes ingredientes:

2,0 µl de tampón de transcripción 5X

25 1,0 µl de DTT (100 mM)

2,0 µl de mezcla de NTP (2,5 mM: 10 µl de cada GTP, CTP, TTP y ATP a 10 mM + 10 µl de H₂O)

1,0 µl de UTP (50 µM)

30 1,0 de Rnasin

1,0 µl de DNA molde (1 µg)

35 1,0 µl de H₂O

1,0 µl de RNA polimerasa (para productos de PCR T3= antisentido, T7= sentido 5', generalmente).

40 Los tubos se incubaron a 37°C durante 1 hora. Se añadió 1,0 µl de DNasa RQ1, seguido de una incubación a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron 90 µl de TE (10 mM de Tris pH 7,6/EDTA 1 mM, pH 8,0) y la mezcla se pipeteó en papel DE81. La solución restante se cargó en una unidad de ultrafiltración Microcon-50 y se centrifugó utilizando el programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió sobre un segundo tubo y se centrifugó con el programa 2 (3 minutos). En la última recuperación, se añadieron 100 µl de TE. Se pipeteó 1 µl de producto final sobre papel DE81 y se contaron en 6 ml de Biofluor II.

50 La sonda se migró en un gel de TBE/urea. Se añadieron 1-3 µl de la sonda o 5 µl de RNA Mrk II a 3 µl de tampón de carga. Se calentó la mezcla a 95°C en termobloque durante 3 min e inmediatamente después se colocó en hielo. Se nivelaron los pocillos, se cargó la muestra y se migró a 180-250 voltios durante 45 minutos. El gel se envolvió en *saran-wrap* y se expuso a una película XAR con una pantalla intensificadora a -70°C durante 1 h a toda la noche.

Hibridación con P³³

55 A. Pretratamiento de secciones congeladas

Los portaobjetos se sacaron del congelador, se colocaron en bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocaron en el incubador a 55°C durante 5 minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% en hielo en la campana de gases y se lavaron en 0,5XSSC durante 5 minutos, a temperatura ambiente (25 ml de 20XSSC + 975 ml de H₂O SQ). Después de desproteinizar con proteinasa K a 0,5 µg/ml durante 10 minutos a 37°C (12,5 µl de solución madre de proteinasa K en 250 ml de tampón sin RNasa precalentado), las secciones se lavaron en 0,5XSSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en etanol al 70%, 95%, 100%, durante 2 min en cada baño.

65

ES 2 317 967 T3

B. *Pretratamiento de secciones incluidas en parafina*

Los portaobjetos se desparafinaron, se colocaron en H₂O SQ y se lavaron dos veces con 2XSSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez. Las secciones de embriones humanos se desproteinizaron con proteinasa K 20 µg/ml (500 µl de una solución madre de 10 mg/ml en 250 ml de tampón sin RNasa; 37°C, 15 minutos), o 8X proteinasa K (100 µl en 250 ml de tampón sin RNasa, 37°C, 30 minutos) para tejidos en formalina. A continuación, se realizaron lavados en 0,5XSSC y se deshidrataron tal como se describió anteriormente.

C. *Prehibridación*

Las preparaciones de los portaobjetos se colocaron en una cajita de plástico con tampón Box (4XSSC, formamida al 50%) - saturada con papel de filtro. El tejido se recubrió con 50 µl de tampón de hibridación (3,75 g de Dextrano de sulfato + 6 ml de H₂O SQ), se mezcló con ayuda del vórtex y se calentó en el microondas durante 2 minutos con la tapa aflojada. Después de enfriar las cajas con los tejidos en hielo, se añadieron 18,75 ml de formamida, 3,75 ml de 20XSSC y 9 ml de H₂O SQ, se volvió a mezclar bien con el vórtex y se incubó a 42°C durante 1-4 horas.

D. *Hibridación*

Un sonda de 1,0x10⁶ cpm y 1,0 µl de tRNA (50 mg/ml de solución madre) por porta se calentaron a 95°C durante 3 minutos. Los portas se enfriaron en hielo, y se añadieron 48 µl de tampón de hibridación por porta. Después de mezclar con el vórtex, se añadieron 50 µl de P3 a 50 µl de solución de prehibridación sobre el porta. Y se incubaron durante toda la noche a 55°C.

E. *Lavados*

Se realizaron dos lavados durante 10 minutos con 2XSSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20XSSC + 16 ml de EDTA 0,25 M, V_f = 4L), seguido de un tratamiento con RNasa a 37°C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón RNasa = 20 mg/ml). Los portas se lavaron 2x10 min con 2XSSC, EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de astringencia del lavado fueron las siguientes: 2 horas a 55°C, 0,1 SSC, EDTA (20 ml de 20XSSC + 16 ml de EDTA, V_f = 4 l).

F. *Oligonucleótidos*

El análisis *in situ* se realizó con diversas secuencias de DNA descritas en la patente europea EP 99912321.9. Los oligonucleótidos utilizados para estos análisis se derivaron de secuencias nucleotídicas descritas en la patente europea 99912321.9 y por lo general tuvieron una longitud de 40 a 55 nucleótidos.

G. *Resultados*

Se realizó un análisis *in situ* en una serie de secuencias de ADN descritas en la presente invención. Los resultados de estos análisis son los siguientes.

DNA64907-1163 (PRO1330)

En tejidos fetales humanos hubo una fuerte expresión específica sobre el endotelio arterial, venoso, capilar y sinusoidal en todos los tejidos examinados, a excepción del cerebro fetal. En tejidos adultos normales, la expresión fue de baja a ausente, pero cuando estaba presente, la expresión aparecida se limitaba a la vasculatura. La mayor expresión en tejidos adultos se observó de manera regional en vasos sanguíneos que recorrían la materia blanca del cerebro de rhesus - la importancia de este patrón no está clara. Se observó una expresión elevada en la vasculatura de muchos tejidos inflamados y enfermos, incluyendo la vasculatura tumoral. En algunos de estos tejidos, no estaba claro si la expresión estaba solamente limitada al endotelio vascular. En los 15 tumores de pulmón examinados no se observó expresión sobre el epitelio maligno, aunque sin embargo, se observó expresión vascular en muchos de los tumores y tejido pulmonar adyacente. Se observó con esta sonda un fondo moderado aparentemente no específico sobre colágeno hialinizado y puntos de necrosis tisular. Sin embargo, en ausencia de un control del sentido, no es posible estar completamente seguros de que toda esta señal es no específica. Se observó parte de señal, aunque se creía que no específica, sobre la mucosa gástrica de chimpancé, epitelio de células transicionales de vejiga adulta humana y retina fetal.

ES 2 317 967 T3

Depósito de Material

Los siguientes materiales se han depositado en el American Type Culture Collection, 12301.

5 *Parklawn Drive, Rockville, MD, USA (ATCC)*

Material	Número Dep. ATCC	Fecha del depósito
DNA30943-1-1163-1	ATCC 209791	21 de abril de 1998
DNA64907-1163-1	ATCC 203243	9 de septiembre de 1998
DNA64908-1163-1	ATCC 203242	9 de septiembre de 1998

Este depósito se realizó de acuerdo con la normativa del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos de Procedimientos de Patentes y de la Regulación que se contempla (Tratado de Budapest). Ello asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años desde la fecha del depósito. Los depósitos estarán disponibles por el ATCC bajo los términos del tratado de Budapest y sometidos a un acuerdo entre Genentech, Inc. Y ATCC, que asegure la disponibilidad permanente y no restringida de la progenie del cultivo del depósito para el público tras la emisión de la patente americana pertinente o tras que sea accesible al público cualquier patente americana o europea, que la preceda, y asegure la disponibilidad de la progenie a uno determinado por el de acuerdo con el 35§122 y las normas del Comisionado de Patentes y Marcas (incluyendo 37 CFR§1,14 con la referencia especial a 886 OG 638).

El beneficiario de la presente solicitud está de acuerdo que si el cultivo de los materiales en depósito perece, se pierde o se destruye cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán en la mayor prontitud posible con otro similar. La disponibilidad del material depositado no debe considerarse como una licencia para practicar la invención en contravención de los derechos garantizados bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patentes.

La especificación escrita en la presente invención se considera suficiente para que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no limita su ámbito por la construcción depositada, ya que la realización depositada se considera una ilustración de ciertos aspectos de la invención y cualquier construcción que sea equivalente funcionalmente se halla dentro del ámbito de la presente invención. El depósito de materiales no constituye una admisión de que la descripción aquí descrita sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de realización, tampoco debe considerarse como limitante del ámbito de las reivindicaciones con las ilustraciones específicas que se representan. Incluso, diversas modificaciones de la invención, además de las aquí mostradas y descritas, serán evidentes a los expertos en la materia a partir de la descripción presente y se hallan por tanto dentro del ámbito de las reivindicaciones anexadas.

Referencias citadas en la descripción

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

Documentos de patente citados en la descripción

- US 5536637 A [0003]
- US 4675187 A [0067]
- EP 404097 A [0081]
- WO 9311161 A [0081]
- US 4275149 A [0084]
- US 5364934 A [0088]

ES 2 317 967 T3

- WO 8705330 A [0099]
- US 4640835 A [0101]
- 5 • US 4496689 A [0101]
- US 4301144 A [0101]
- US 4670417 A [0101]
- 10 • US 4791192 A [0101]
- US 4179337 A [0101]
- 15 • WO 8905859 A [0111]
- US 4399216 A [0111]
- DD 266710 [0112]
- 20 • US 4946783 A [0112]
- EP 139383 A [0113]
- 25 • US 4943529 A [0113]
- EP 402226 A [0113]
- EP 183070 A [0113]
- 30 • EP 244234 A [0113]
- EP 394538 A [0113]
- 35 • WO 9100357 A [0113]
- US 5010182 A [0116]
- EP 362179 A [0116]
- 40 • WO 9013646 A [0116]
- EP 36776 A [0120]
- 45 • EP 73657 A [0122]
- GB 2211504 A [0123]
- EP 117060 A [0126]
- 50 • EP 117058 A [0126]
- US 4736866 A [0137]
- 55 • US 4870009 A [0137]
- US 4657760 A [0139]
- US 5206344 A [0139]
- 60 • US 5225212 A [0139]
- WO 9703692 A [0140]
- 65 • WO 9640072 A [0140]
- WO 9607399 A [0140]

ES 2 317 967 T3

- US 5654010 A [0140]
- US 4816567 A [0154] [0154] [0158]
- 5 • WO 9308829 A [0161]
- US 4676980 A [0163] [0163]
- WO 9100360 A [0163]
- 10 • WO 92200373 A [0163]
- EP 03089 A [0163]
- 15 • EP 99912321 A [0204] [0214] [0229] [0234]
- EP 307247 A [0209]
- US 5122469 A [0217]
- 20 • WO 8403564 A [0252]

Documentos que no son patentes citados en la descripción

- 25 • **KLEIN** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, vol. 93, 7108-7113 [0003]
- **HUNTER**. *Cell*, 1991, vol. 64, 1129 [0008]
- **BISHOP**. *Cell*, 1991, vol. 64, 235-248 [0008]
- 30 • **ALITALO** *et al. Adv. Cancer Res.*, 1986, vol. 47, 235-281 [0009]
- **SLAMON** *et al. Science*, 1987, vol. 235, 177-182 [0010]
- 35 • **SLAMON** *et al. Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0010]
- **SCHWAB** *et al. Genes Chromosomes Cancer*, 1990, vol. 1, 181-193 [0011]
- **RAVDIN; CHAMNESS**. *Gene*, 1995, vol. 159, 19-27 [0011]
- 40 • **HYNES; STERN**. *Biochem Biophys Acta*, 1994, vol. 1198, 165-184 [0011]
- **BASELGA** *et al. Oncology*, 1997, vol. 11 (3 Suppl 1), 43-48 [0011]
- 45 • **BASELGA** *et al. J. Clin. Oncol.*, 1996, vol. 14, 737-744 [0011]
- **SHIRAYOSHI** *et al. Genes Cells*, 1997, vol. 2 (3), 213-224 [0012]
- **ALTSCHUL** *et al. Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480, <http://blast.wustl.edu/blast/README.html> [0038]
- 50 • **AUSUBEL** *et al. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley Interscience Publishers*, 1995 [0053]
- **SAMBROOK** *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0106]
- 55 • **BOLIVAR** *et al. Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0061] [0200]
- **RIETSCHEL; BRADE**. *Scientific American*, August 1992, 54-61 [0062]
- 60 • **BONE**. *Ann. Intern Med.*, 1991, vol. 114, 332-333 [0063]
- The Molecular Basis of Cancer. **MURAKAMI** *et al. Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs.* WB Saunders, 1995, 13 [0068]
- 65 • **KABAT** *et al. NIH Publ. No.91-3242*, 1991, vol. I, 647-669 [0073]
- **ZAPATA** *et al. Protein Eng.*, 1995, vol. 8 (10), 1057-1062 [0074]

ES 2 317 967 T3

- **PLUCKTHUN**. The Pharmacology of Monoclonal Antibodies. *Springer-Verlag*, 1994, vol. 113, 269-315 [0080]
- **HOLLINGER et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6444-6448 [0081]
- 5 • **CARTER et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 13, 4331 [0093]
- **ZOLLER et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 10, 6487 [0093]
- **WELLS et al.** *Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0093]
- 10 • **WELLS et al.** *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 1986, vol. 317, 415 [0093]
- **CREIGHTON**. The Proteins., *W.H. Freeman & Co.*, N.Y, [0094]
- 15 • **CHOTHIA**. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0094]
- **T.E. CREIGHTON**. Proteins: Structure and Molecular Properties. *W.H. Freeman & Co*, 1983, 79-86 [0096]
- **APLIN; WRISTON**. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 1981, 259-306 [0099]
- 20 • **HAKIMUDDIN et al.** *Arch. Biochem. Biophys.*, 1987, vol. 259, 52 [0100]
- **EDGE et al.** *Anal. Biochem.*, 1981, vol. 118, 131 [0100]
- 25 • **THOTAKURA et al.** *Meth. Enzymol.*, 1987, vol. 138, 350 [0100]
- **FIELD et al.** *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2165 [0103]
- **EVAN et al.** *Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0103]
- 30 • **PABORSKY et al.** *Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0103]
- **HOPP et al.** *Bio Technology*, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0103]
- 35 • **MARTIN et al.** *Science*, 1992, vol. 255, 192-194 [0103]
- **SKINNER et al.** *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0103]
- **LUTZ-FREYERMUTH et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0103]
- 40 • **STEWART et al.** Solid-Phase Peptide Synthesis. *W.H. Freeman Co*, 1969 [0104]
- **MERRIFIELD**. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0104]
- 45 • **DIEFFENBACH et al.** PCR Primer:A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1995 [0106]
- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. *IRL Press*, 1991 [0110]
- **SHAW et al.** *Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0111]
- 50 • **GRAHAM; VAN DER EB**. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0111]
- **VAN SOLINGEN et al.** *J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0111]
- 55 • **HSIAO et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0111]
- **KEOWN et al.** *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0111]
- **MANSOUR et al.** *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0111]
- 60 • **BEACH; NURSE**. *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0113]
- **FLEER et al.** *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0113]
- 65 • **LOUVENCOURT et al.** *J. Bacteriol.*, 1983, 737 [0113]
- **VAN DEN BERG et al.** *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0113]

ES 2 317 967 T3

- **SREEKRISHNA** *et al. J. Basic Microbiol.*, 1988, vol. 28, 265-278 [0113]
- **CASE** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0113]
- 5 • **BALLANCE** *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 112, 284-289 [0113]
- **TILBURN** *et al. Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0113]
- **YELTON** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0113]
- 10 • **KELLY; HYNES**. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0113]
- **C. ANTHONY**. *The Biochemistry of Methylootrophs*, 1982, 269 [0113]
- 15 • **GRAHAM** *et al. J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0114]
- **URLAUB; CHASIN**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0114]
- **MATHER**. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0114]
- 20 • **URLAUB** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0119]
- **STINCHCOMB** *et al. Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0119]
- 25 • **KINGSMAN** *et al. Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0119]
- **TSCHEMPER** *et al. Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0119]
- **JONES**. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0119]
- 30 • **CHANG** *et al. Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0120]
- **GOEDEL** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0120]
- 35 • **GOEDEL**. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0120]
- **DEBOER** *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0120]
- **HITZEMAN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0121]
- 40 • **HESS** *et al. J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0121]
- **HOLLAND**. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0121]
- 45 • **GETHING** *et al. Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0126]
- **MANTEI** *et al. Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0126]
- **THOMAS**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0127]
- 50 • **DEUTSCHER**. *Methods in Enzymology*, 1990, 182 [0130]
- **SCOPE**S. Protein Purification: Principles and Practice., *Springer-Verlag*, 1982 [0130]
- 55 • **THOMAS; CAPECCHI**. *Cell*, 1987, vol. 51, 503 [0138]
- **LI** *et al. Cell*, 1992, vol. 69, 915 [0138]
- **BRADLEY**. Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: *A Practical Approach*, IRL, 1987, 113-152 [0138]
- 60 • **JOHNSON** *et al. Nat. Med.*, 1996, vol. 2, 795-799 [0140]
- **YASUDA**. *Biomed. Trier.*, 1993, vol. 27, 1221-1223 [0140]
- 65 • **HORA** *et al. Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 755-758 [0140]
- Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems.
CLELAND. Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach., *Plenum Press*, 1995, 439-462 [0140]

ES 2 317 967 T3

• Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer. **LEWIS**. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. *Marcel Dekker*, 1990, 1-41 [0141]

• Remington's Pharmaceutical Sciences., *Mack Publishing Co*, 1980 [0143]

• **KOHLER; MILSTEIN**. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0148]

• **GODING**. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice., *Academic Press*, 1986, 59-103 [0149]

• **KOZBOR**. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0150]

• **BRODEUR et al.** *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 1987, 51-63 [0150]

• **MUNSON; POLLARD**. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0151]

• **JONES et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0157]

• **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-329

• **PRESTA**. *Curr. Op. Struct. Biol.*, 1992, vol. 2, 593-596 [0157]

• **RIECHMANN et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0158]

• **VERHOEYEN et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0158]

• **HOOGENBOOM; WINTER**. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 227, 381 [0159]

• **MARKS et al.** *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581 [0159]

• **COLE et al.** Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. *Alan R. Liss*, 1985, 77 [0159]

• **BOERNER et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0159]

• **MILSTEIN; CUELLO**. *Nature*, 1983, vol. 305, 537-539 [0161]

• **TRAUNECKER et al.** *EMBO J*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0161]

• **SURESH et al.** *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0162]

• **ZOLA**. Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques. *CRC Press, Inc*, 1987, 147-158 [0164]

• **HUNTER et al.** *Nature*, 1962, vol. 144, 945 [0164]

• **DAVID et al.** *Biochemistry*, 1974, vol. 13, 1014 [0164]

• **PAIN et al.** *J. Immunol. Meth.*, 1981, vol. 40, 219 [0164]

• **NYGREN**. *J. Histochem. and Cytochem.*, 1982, vol. 30, 407 [0164]

• **ALTSCHUL; GISH**. *Methods in Enzymology*, 1996, vol. 266, 460-480 [0168]

• **HOLMES et al.** *Science*, 1991, vol. 253, 1278-1280 [0171]

• **GIETZ et al.** *Nucl. Acid. Res.*, 1992, vol. 20, 1425 [0177]

• **KAISER et al.** *Methods in Yeast Genetics*. *Cold Spring Harbor Press*, 1994, 207 [0177]

• **KAISER et al.** *Methods in Yeast Genetics.*, *Cold Spring Harbor Press*, 1994, 208-210 [0181]

• **BIELY et al.** *Anal. Biochem.*, 1988, vol. 172, 176-179 [0182]

• **THIMMAPPAYA et al.** *Cell*, 1982, vol. 31, 543 [0210]

• **SOMPARYRAC et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1981, vol. 12, 7575 [0212]

• **AUSUBEL et al.** *Current Protocols of Molecular Biology.*, *John Wiley and Sons*, 1997 [0215]

• **LUCAS et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1996, vol. 24 (9), 1774-1779 [0215]

ES 2 317 967 T3

• **O'REILLEY** *et al.* Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual. *Oxford University Press*, 1994 [0226]

• **RUPERT** *et al.* *Nature*, 1993, vol. 362, 175-179 [0227]

5 • **HODGSON**. *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 19-21 [0254]

• **BRAXTON; WELLS**. *Biochemistry*, 1992, vol. 31, 7796-7801 [0255]

10 • **ATHAUDA** *et al.* *J. Biochem.*, 1993, vol. 113, 742-746 [0255]

• **LU; GILLETT**. *Cell Vision*, 1994, vol. 1, 169-176 [0266].

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 317 967 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es por lo menos un 80% idéntica a la secuencia de aminoácidos de los residuos 20 a 273 mostrada en las figuras 2 y 4, o el complemento de la misma, en el que dicha identidad de secuencia se determina sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan, y en el que dicho ácido nucleico es amplificado en tumores de pulmón y/o colon humanos.
- 10 2. Ácido nucleico según la reivindicación 1, en el que el nivel de identidad es por lo menos del 85%.
3. Ácido nucleico según la reivindicación 2, en el que el nivel de identidad es por lo menos del 95%.
- 15 4. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que codifica un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 20 a 273 mostrada en cualquiera de las figuras 2, 4 y 6.
- 20 5. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha secuencia de nucleótidos comprende la secuencia codificante completa de cualquiera de las secuencias mostradas en las figuras 1, 3 y 5, o el complemento de las mismas.
- 25 6. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha secuencia de nucleótidos comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en cualquiera de las figuras 1, 3 y 5, o el complemento de las mismas.
- 30 7. Ácido nucleico que comprende la secuencia codificante completa del inserto de ADN (DNA30943-1-1163-1, DNA64907-1163-1 o DNA64908-1163-1) depositado bajo el número de acceso ATCC 209791, ATCC 203243 o ATCC 203242, o el complemento del mismo.
- 35 8. Vector que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Vector según la reivindicación 8, en el que dicho ácido nucleico está unido operativamente a secuencias de control reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.
- 40 10. Célula huésped que comprende el vector según la reivindicación 8 o la reivindicación 9.
11. Célula huésped según la reivindicación 10, en la que dicha célula es una célula CHO, un *E. coli* o una célula de levadura.
- 45 12. Procedimiento para la producción de un polipéptido que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 10 o la reivindicación 11 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido y recuperar dicho polipéptido del cultivo celular.
13. Polipéptido aislado que es por lo menos un 80% idéntico a la secuencia de aminoácidos de residuos 20 a 273 mostrada en las figuras 2 y 4, en el que dicha identidad de secuencia se determina sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan, y en el que dicho polipéptido es codificado por un ácido nucleico que es amplificado en tumores de pulmón y/o colon humanos.
- 50 14. Polipéptido según la reivindicación 13, en el que el nivel de identidad es por lo menos del 85%.
15. Polipéptido según la reivindicación 14, en el que el nivel de identidad es por lo menos del 95%.
- 55 16. Polipéptido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que incluye la secuencia de aminoácidos de residuos 20 a 273 mostrada en las figuras 2 y 4.
17. Polipéptido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, que incluye la secuencia de aminoácidos de residuos 20 a 273 mostrada en las figura 6.
- 60 18. Polipéptido aislado según la reivindicación 16, que consiste en la secuencia de aminoácidos de residuos 20 a 273 mostrada en las figuras 2 y 4.
19. Polipéptido aislado según la reivindicación 18, que consiste en la secuencia de aminoácidos de residuos 20 a 273 mostrada en la figura 6.
- 65 20. Polipéptido aislado, que es obtenible mediante la expresión del inserto de ADN (DNA30943-1-1163-1, DNA64907-1163-1 o DNA64908-1163-1) depositado bajo el número de acceso ATCC 209791, ATCC 203243 o ATCC 203242.

ES 2 317 967 T3

21. Molécula quimérica que comprende un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20, fusionado a una secuencia de aminoácidos heteróloga.

5 22. Molécula quimérica según la reivindicación 21, en la que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga es una secuencia epítipo etiqueta.

23. Molécula quimérica según la reivindicación 21, en la que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga es una región Fc de una inmunoglobulina.

10 24. Anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20.

25. Anticuerpo según la reivindicación 24, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

26. Anticuerpo según la reivindicación 24, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

15 27. Anticuerpo según la reivindicación 26, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

28. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, para su uso en un método de tratamiento médico.

20 29. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, para su uso en el tratamiento del crecimiento de células neoplásicas.

30 30. Uso de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del crecimiento de células neoplásicas.

25 31. Composición que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27 en mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable.

30 32. Método para determinar la presencia de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20, que comprende exponer una célula sospechosa de contener dicho polipéptido a un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27, y determinar la unión del anticuerpo a la célula.

35 33. Método de diagnóstico de un tumor en un mamífero, que comprende detectar el nivel de expresión del ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 (a) en una muestra de prueba de células de tejido del mamífero y (b) en una muestra de control de células de tejido normales conocidas del mismo tipo de células, donde un nivel de expresión más elevado en la muestra de prueba indica la presencia de un tumor en el mamífero del que se obtuvieron las células de tejido de prueba.

40 34. Método de diagnóstico de un tumor en un mamífero, que comprende (a) poner en contacto un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27 con una muestra de prueba de células de tejido obtenidas del mamífero, y (b) detectar la formación en la muestra de prueba de un complejo entre el anticuerpo y un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20.

45 35. Método según la reivindicación 34, en el que la detección se realiza en comparación con la monitorización de la formación del complejo en una muestra de control de células de tejido normales conocidas del mismo tipo de células, indicando una mayor cantidad de complejos formados en la muestra de prueba la presencia de un tumor en el mamífero del que se obtuvieron las células de tejido de prueba.

50 36. Método según la reivindicación 34 o la reivindicación 35, en el que el anticuerpo transporta una marca detectable.

55 37. Kit de diagnóstico del cáncer, que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 24 a 27 y un portador en un envase adecuado, junto con instrucciones para el uso del anticuerpo para detectar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 20.

60

65

CCAGGTCCAAC TGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCCCGGGGATCCTCTAGAGATCCCT
 CGACCTCGACCCACGCGTCCGCCAAGCTGGCCCTGCACGGCTGCAAGGGAGGCTCCTGTGGA
 CAGGCCAGGCAGGTGGGCCTCAGGAGGTGCCTCCAGGCGGCCAGTGGGCCTGAGGCCCCAGC
 AAGGGCTAGGGTCCATCTCCAGTCCCAGGACACAGCAGCGGCCACCATGGCCACGCCTGGGC
 TCCAGCAGCATCAGCAGCCCCAGGACCGGGGAGGCACAGGTGGCCCCACCACCCGGAGGA
 GCAGTCCCTGCCCTGTCCGGGGGATGACTGATTCTCCTCCGCCAGGCCACCCAGAGGAGAA
 GGCCACCCCGCTGGAGGCACAGGCCATGAGGGGGCTCTCAGGAGGTGCTGCTGATGTGGCTT
 CTGGTGTGGCAGTGGGCGGCACAGAGCACGCCTACCGGCCCGGCCGTAGGGTGTGTGCTGT
 CCGGGCTCACGGGGACCCTGTCTCCGAGTCGTTTCGTGCAGCGTGTGTACCAGCCCTTCCTCA
 CCACCTGCGACGGGCACCGGGCCTGCAGCACCTACCGAACCATCTATAGGACCGCCTACCGC
 CGCAGCCCTGGGCTGGCCCTGCCAGGCCTCGCTACGCGTGCTGCCCGGCTGGAAGAGGAC
 CAGCGGGCTTCCTGGGGCCTGTGGAGCAGCAATATGCCAGCCGCCATGCCGGAACGGAGGGA
 GCTGTGTCCAGCCTGGCCGCTGCCGCTGCCCTGCAGGATGGCGGGGTGACACTTGCCAGTCA
 GATGTGGATGAATGCAGTGC TAGGAGGGGGCGGCTGTCCCCAGCGCTGCATCAACACCGCCGG
 CAGTTACTGGTGCCAGTGTGGGAGGGGCACAGCCTGTCTGCAGACGGTACACTCTGTGTGC
 CCAAGGGAGGGCCCCCAGGGTGGCCCCAACCCGACAGGAGTGGACAGTGCATGAAGGAA
 GAAGTGCAGAGGCTGCAGTCCAGGGTGGACCTGCTGGAGGAGAAGCTGCAGCTGGTGTGGC
 CCCACTGCACAGCCTGGCCTCGCAGGCACTGGAGCATGGGCTCCCGGACCCCGGCAGCCTCC
 TGGTGCACCTCCTCCAGCAGCTCGGCCGCATCGACTCCCTGAGCGAGCAGATTCCTTCCTG
 GAGGAGCAGCTGGGGTCTGCTCCTGCAAGAAAGACTCGTGACTGCCAGCGCCCCAGGCTG
 GACTGAGCCCCACGCGCCCTGCAGCCCCCATGCCCTGCCCAACATGCTGGGGGTCCAG
 AAGCCACCTCGGGGTGACTGAGCGGAAGGCCAGGCAGGGCCTTCCTCCTCTTCCTCCTCCCC
 TTCTCGGGAGGCTCCCCAGACCCTGGCATGGGATGGGCTGGGATCTTCTCTGTGAATCCAC
 CCCTGGCTACCCCCACCCTGGCTACCCCAACGGCATCCCAAGGCCAGGTGGGCCCTCAGCTG
 AGGGAAGGTACGAGCTCCCTGCTGGAGCCTGGGACCCATGGCACAGGCCAGGCAGCCCGGAG
 GCTGGGTGGGGCCTCAGTGGGGGCTGCTGCCTGACCCCCAGCACATAAAAAATGAAACGTGA
 AAAGGGCGGCCGCGACTCTAGAGT
 CGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAT

Fig. 1

MRGSQEVLLMLLVLAVGGTEHAYRPGRRVCAVRAHGDPVSESFVQRVYQPFLTTCDGHRAC
STYRTIYRTAYRRSPGLAPARPRYACCPGWKRTSGLPGACGAAICQPPCRNGGSCVQPGRCR
CPAGWRGDTQCSDVDECSARRGGCPQRCINTAGSYWCQCWEGHSLSADGTLCVPKGGPPRVA
PNPTGVDSAMKEEVQRLQSRVDLLEEKQLVLAPLHSLASQALEHGLPDPGSLLVHSFQQLG
RIDSLSEQISFLEEQLGSCSCKKDS

Fig. 2

GCCAGGCAGGTGGGCCTCAGGAGGTGCCTCCAGGCGGCCAGTGGGCCTGAGGCCCCAGCAAG
 GGCTAGGGTCCATCTCCAGTCCCAGGACACAGCAGCGGCCACCATGGCCACGCTGGGCTCC
 AGCAGCATCAGAGCAGCCCCTGTGGTTGGCAGCAAAGTTCAGCTTGGCTGGGCCCCGCTGTGA
 GGGGCTTCGCGCTACGCCCTGCGGTGTCCCAGGGCTGAGGTCTCCTCATCTTCTCCCTAGC
 AGTGGATGAGCAACCCAAACGGGGGCCCCGGGGAGGGGAAGTGGCCCCGAGGGAGAGGAACCCC
 AAAGCCACATCTGTAGCCAGGATGAGCAGTGTGAATCCAGGCAGCCCCAGGACCGGGGAGG
 CACAGGTGGCCCCACCACCCGGAGGAGCAGCTCCTGCCCTGTCCGGGGGATGACTGATTC
 TCCTCCGCCAGGCCACCCAGAGGAGAAGGCCACCCCGCCTGGAGGCACAGGCCATGAGGGGC
 TCTCAGGAGGTGCTGCTGATGTGGCTTCTGGTGTGGCAGTGGGCGGCACAGAGCACGCCTA
 CCGGCCCGGCCGTAGGGTGTGTGCTGTCCGGGCTCACGGGGACCCTGTCTCCGAGTCGTTCCG
 TGCAGCGTGTGTACCAGCCCTTCTCACCACCTGCGACGGGCACCGGGCCTGCAGCACCTAC
 CGAACCATCTATAGGACCGCCTACCGCCGCAGCCCTGGGCTGGCCCCCTGCCAGGCCTCGCTA
 CGCGTGCTGCCCCGGCTGGAAGAGGACCAGCGGGCTTCTGGGGCCTGTGGAGCAGCAATAT
 GCCAGCCGCCATGCCGGAACGGAGGGAGCTGTGTCCAGCCTGGCCGCTGCCGCTGCCCTGCA
 GGATGGCGGGGTGACACTTGCCAGTCAGATGTGGATGAATGCAGTGCTAGGAGGGGCGGCTG
 TCCCCAGCGCTGCATCAACACCCCGGCAGTTACTGGTGCCAGTGTGGGAGGGGCACAGCC
 TGTCTGCAGACGGTACACTCTGTGTGCCAAGGGAGGGCCCCCAGGGTGGCCCCAACCCG
 ACAGGAGTGGACAGTGAATGAAGGAAGAAGTGCAGAGGCTGCAGTCCAGGGTGGACCTGCT
 GGAGGAGAAGCTGCAGCTGGTGCTGGCCCCACTGCACAGCCTGGCCTCGCAGGCACTGGAGC
 ATGGGCTCCCGGACCCCGGCAGCCTCCTGGTGCACTCCTTCCAGCAGCTCGGCCGCATCGAC
 TCCCTGAGCGAGCAGATTTCTTCTGGAGGAGCAGCTGGGGTCTGCTCCTGCAAGAAAGA
 CTCGTGACTGCCAGCGCTCCAGGCTGGACTGAGCCCCACGCCGCCCTGCAGCCCCCATG
 CCCCTGCCAACATGCTGGGGGTCCAGAAGCCACCTCGGGGTGACTGAGCGGAAGGCCAGGC
 AGGGCCTTCTCCTTCTCCTCCTCCCTTCTCGGGAGGCTCCCCAGACCCTGGCATGGGAT
 GGGCTGGGATCTTCTCTGTGAATCCACCCCTGGCTACCCCCACCCTGGCTACCCCAACGGCA
 TCCCAAGGCCAGGTGGACCCTCAGCTGAGGGAAGGTACGAGCTCCCTGCTGGAGCCTGGGAC
 CCATGGCACAGGCCAGGCAGCCCGGAGGCTGGGTGGGGCCTCAGTGGGGGCTGCTGCCTGAC
 CCCCAGCACAATAAAAATGAAACGTG

Fig. 3

MRGSQEVLLMWLLVLA VGGTEHAYRPGRRVCAVRAHGDPVSESFVQRVYQPFLTTCDGHRAC
STYRTIYRTAYRRSPGLAPARPRYACCPGWKRTSGLPGACGAAICQPPCRNGGSCVQPGRCR
CPAGWRGDTQCSDVDECSARRGGCPQRCINTAGSYWCQCWEGHSLSADGTL CVPKGGPPRVA
PNPTGVDSAMKEEVQRLQSRVDLLEEKLQLVLA PLHSLASQALEHGLPDPGSLLVHSFQQLG
RIDSLSEQISFLEEQLGSCSCKKDS

Fig. 4

CCCACGCGTCCGAAGCTGGCCCTGCACGGCTGCAAGGGAGGCTCCTGTGGACAGGCCAGGCA
 GGTGGGCCTCAGGAGGTGCCTCCAGGCGGCCAGTGGGCCTGAGGCCCCAGCAAGGGCTAGGG
 TCCATCTCCAGTCCCAGGACACAGCAGCGGCCACCATGGCCACGCTGGGCTCCAGCAGCAT
 CAGCAGCCCCCAGGACCGGGGAGGCACAGGTGGCCCCACCACCCGGAGGAGCAGCTCCTGC
 CCCTGTCCGGGGATGACTGATTCTCCTCCGCCAGGCCACCCAGAGGAGAAGGCCACCCCGC
 CTGGAGGCACAGGCCATGAGGGGCTCTCAGGAGGTGCTGCTGATGTGGCTTCTGGTGTGGC
 AGTGGGCGGCACAGAGCACGCTACCGGCCCGCCGTAGGGTGTGTGCTGTCCGGGCTCACG
 GGGACCCTGTCTCCGAGTCGTTCTGTGCAGCGTGTGTACCAGCCCTTCCTCACCACCTGCGAC
 GGGCACCGGGCCTGCAGCACCTACCGAACCATCTATAGGACCGCCTACCGCCGACGCCCTGG
 GCTGGCCCCCTGCCAGGCCTCGCTACGCGTGTGCCCGGGCTGGAAGAGGACCAGCGGGCTTC
 CTGGGGCCTGTGGAGCAGCAATATGCCAGCCGCATGCCGGAACGGAGGGAGCTGTGTCCAG
 CCTGGCCGCTGCCGCTGCCCTGCAGGATGGCGGGGTGACACTTGCCAGTCAGATGTGGATGA
 ATGCAGTGCTAGGAGGGGCGGCTGTCCCAGCGCTGCGTCAACACCGCCGGCAGTTACTGGT
 GCCAGTGTGGGAGGGGCACAGCCTGTCTGCAGACGGTACACTCTGTGTGCCAAGGGAGGG
 CCCCCAGGGTGGCCCCAACCCGACAGGAGTGGACAGTGAATGAAGGAAAGTGCAGAG
 GCTGCAGTCCAGGGTGGACCTGCTGGAGGAGAAGCTGCAGCTGGTGCTGGCCCCACTGCACA
 GCCTGGCCTCGCAGGCACTGGAGCATGGGCTCCCGACCCCGGCAGCCTCCTGGTGCCTCC
 TTCCAGCAGCTCGGCCGCATCGACTCCCTGAGCGAGCAGATTCCTTCCTGGAGGAGCAGCT
 GGGGTCTGCTCCTGCAAGAAAGACTCGTGACTGCCAGCGCCCCAGGCTGGACTGAGCCCC
 TCACGCCGCCCTGCAGCCCCATGCCCTGCCAACATGCTGGGGGTCCAGAAGCCACCTCG
 GGGTGAAGTGCAGCGGAAGGCCAGGCAGGGCCTTCCTCCTCTTCCTCCTCCCTTCCTCGGGAG
 GCTCCCCAGACCCTGGCATGGGATGGGCTGGGATCTTCTCTGTGAATCCACCCCTGGCTACC.
 CCCACCTGGCTACCCCAACGGCATCCCAAGGCCAGGTGGGCCCTCAGCTGAGGGAAGGTAC
 GAGCTCCCTGCTGGAGCCTGGGACCCATGGCACAGGCCAGGCAGCCCGGAGGCTGGGTGGGG
 CCTCAGTGGGGGCTGCTGCCTGACCCCCAGCACAATAAAAAATGAAACGTG

Fig. 5

MRGSQEVLLMWLLVLA VGGTEHAYRPGRRVCAVRAHGDPVSESFVQRVYQPFLLTTCDGHRAC
STYRTIYRTAYRRSPGLAPARPRYACCPGWKRTSGLPGACGAAICQPPCRNGGSCVQPGRCR
CPAGWRGDTQCSDVDECSARRGGCPQRCVNTAGSYWCQCWEGHSL SADGTL CVPKGGPPRVA
PNPTGVDSAMKEEVQRLQSRVDLLEEKLQLVLA PLHSLASQALEHGLPDPGSLLVHSFQQLG
RIDSLSEQISFLEEQLGSCSCKKDS

Fig. 6