



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 020**

51 Int. Cl.:
C07K 14/715 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99912330 .0**
96 Fecha de presentación : **05.03.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1093457**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.04.2001**

54 Título: **Análogo de cadena gamma común de receptor de citocina.**

30 Prioridad: **19.03.1998 US 78563 P**
22.05.1998 US 86505 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.04.2011

73 Titular/es: **HUMAN GENOME SCIENCES**
9410 Key West Avenue
Rockville, Maryland 20850, US
HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.

72 Inventor/es: **Ruben, Steven, M.;**
Rosen, Craig, A. y
Moore, Paul, A.

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 357 020 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

Análogo de cadena gamma común de receptor de citocina.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un gen humano novedoso que codifica para un polipéptido que es un miembro de la familia de receptores de citocinas. Más específicamente, la presente invención se refiere a un polinucleótido que codifica para un polipéptido humano novedoso denominado análogo de cadena gamma común de receptor de citocina, o "CRCGCL". Esta invención también se refiere a polipéptidos de CRCGCL, así como a vectores, células huésped, anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de CRCGCL y a los métodos recombinantes para producir los mismos.

Antecedentes de la invención

A menudo resultan efectos bioquímicos y fisiológicos de la unión de una citocina a una molécula receptora específica. Entonces, la unión al receptor estimula determinadas rutas de transducción de señales, y a menudo independientes (Kishimoto, T., *et al.*, Cell 76:253-262 (1994)). La interacción entre una citocina y un receptor es un regulador primario de una variedad de procesos celulares, incluyendo activación, proliferación y diferenciación (Arai, K. -I, *et al.*, Ann. Rev. Biochem. 59:783-836 (1990); Paul, W. E. y Seder, R. A., Cell 76:241-251 (1994)).

Takehita, T., *et al.*, Science 257:379-382 (1992) describieron la clonación de la cadena gamma del receptor de IL-2 humano. Las citocinas que se unen a la cadena gamma común (gamma c) de receptor de interleucina-2 (IL-2), incluyendo IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, son importantes para el crecimiento y la diferenciación de células inmunitarias, tales como linfocitos T y B, células citolíticas naturales, macrófagos y monocitos. Estas citocinas tienen efectos biológicos solapantes que en parte resultan del uso de la subunidad de receptor compartida gamma c. Recientemente, se ha demostrado que estas citocinas activan varias moléculas de señalización intracelular importantes, mediante la unión a la cadena gamma común (gamma c) de receptor de interleucina-2 (IL-2), incluyendo las cinasas Janus JAK1 y JAK3 y miembros de la familia de factores de transcripción de transductores de señales y activadores de la transcripción (STAT).

El descubrimiento de estas rutas de señalización ha conducido a importantes conocimientos nuevos sobre su papel en la maduración de linfocitos, ya que se desprende que las mutaciones en los genes que codifican tanto para gamma c como JAK3 dan como resultado formas similares de inmunodeficiencia combinada grave (SCID). Por ejemplo, mutaciones en el receptor gamma de interleucina-2 (IL-2) humana, mapeado en el cromosoma X, están asociadas con inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (Human Molecular Genetics, 2(8): 1099 (1993)).

Por tanto, existe una necesidad de polipéptidos que regulen la diferenciación y proliferación de células, puesto que alteraciones de tal regulación pueden estar implicadas en trastornos relacionados con el sistema inmunitario. Por tanto, existe una necesidad de identificación y caracterización de tales polipéptidos humanos que puedan desempeñar un papel en la detección, prevención, mejora o corrección de tales trastornos.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un polinucleótido novedoso y al polipéptido de CRCGCL codificado. Además, la presente invención se refiere a vectores, células huésped, anticuerpos y métodos recombinantes para producir los polipéptidos y polinucleótidos.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1B muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID NO: 2) de CRCGCL. La secuencia líder pronosticada se ubica en aproximadamente los aminoácidos 1-22.

La figura 2 muestra las regiones de identidad entre la secuencia de aminoácidos de la proteína de CRCGCL y el producto de traducción del homólogo más cercano, el receptor gamma de interleucina-2 de *Bos taurus* (n.º de registro 1532088) (SEQ ID NO:3), determinado mediante análisis BLAST. Los aminoácidos idénticos entre los dos polipéptidos están sombreados en negro, mientras que los aminoácidos conservados están en el recuadro. Examinando las regiones de aminoácidos sombreados y/o en el recuadro, el experto puede identificar fácilmente los dominios conservados entre los dos polipéptidos. Estos dominios conservados son realizaciones preferidas de la presente invención.

La figura 3 muestra un análisis de la secuencia de aminoácidos de CRCGCL. Se muestran regiones alfa, beta, de giro y hélice; hidrofiliidad e hidrofobicidad; regiones anfipáticas; regiones flexibles; índice antigénico y probabilidad de superficie, y todas se generaron usando los parámetros por defecto. En el gráfico de "índice antigénico o Jameson-Wolf", los picos positivos indican ubicaciones de las regiones altamente antigénicas de la proteína de CRCGCL, es decir, regiones a partir de las que pueden obtenerse péptidos que llevan epítomos de la invención. En la presente invención se contemplan los dominios definidos por estos gráficos. En la tabla 1 puede encontrarse la representación en forma de tabla de los datos resumidos gráficamente en la figura 3.

Descripción detallada*Definiciones*

5 Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar la comprensión de determinados términos usados en toda esta memoria descriptiva.

En la presente invención, "aislado" se refiere al material extraído de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si se produce de manera natural), y por tanto está alterado "por la mano del hombre" respecto a su estado natural. Por ejemplo, un polinucleótido aislado podría ser parte de un vector o una composición de materia, o podría estar contenido dentro de una célula, y todavía estar "aislado" porque ese vector, composición de materia, o célula particular no es el entorno original del polinucleótido.

En la presente invención, una proteína de CRCGCL "secretada" se refiere a una proteína que puede dirigirse al RE, las vesículas secretoras o el espacio extracelular como resultado de una secuencia señal, así como una proteína de CRCGCL liberada en el espacio extracelular sin contener necesariamente una secuencia señal. Si se libera la proteína de CRCGCL secretada en el espacio extracelular, la proteína de CRCGCL secretada puede experimentar procesamiento extracelular para producir una proteína de CRCGCL "madura". La liberación en el espacio extracelular puede producirse mediante muchos mecanismos, incluyendo exocitosis y escisión proteolítica.

Tal como se usa en el presente documento, un "polinucleótido" de CRCGCL se refiere a una molécula que tiene una secuencia de ácido nucleico contenida en SEQ ID NO:1 o el ADNc contenido dentro del clon depositado en la ATCC. Por ejemplo, el polinucleótido de CRCGCL puede contener la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ADNc de longitud completa, incluyendo las secuencias no traducidas en 5' y 3', la región codificante, con o sin la secuencia señal, la región que codifica para la proteína secretada, así como fragmentos, epítomos, dominios y variantes de la secuencia de ácido nucleico. Además, tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido" de CRCGCL se refiere a una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos traducida generada a partir del polinucleótido tal como se define ampliamente. Sin embargo, una realización de la presente invención no incluye la secuencia de polinucleótido de n.º de registro de Genbank X91553.

En realizaciones específicas, los polinucleótidos de la invención tienen menos de 300 kb, 200 kb, 100 kb, 50 kb, 15 kb, 10 kb ó 7,5 kb de longitud. En una realización adicional, los polinucleótidos de la invención comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos de la secuencia que codifica para CRCGCL, pero no comprenden todo o una parte de ningún intrón de CRCGCL. En otra realización, el ácido nucleico que comprende la secuencia que codifica para CRCGCL no contiene las secuencias codificantes de un gen flanqueante genómico (es decir, en 5' o 3' con respecto al gen de CRCGCL en el genoma).

En la presente invención, se generó la secuencia de CRCGCL de longitud completa identificada como SEQ ID NO:1 solapando secuencias del clon depositado (análisis de contigios). Un clon representativo que contiene toda o la mayor parte de la secuencia para SEQ ID NO:1 se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") el 23 de marzo de 1998, y se le dio el número de depósito de la ATCC 209691. También se depositó un segundo clon en la ATCC el 25 de febrero de 1998, y se le dio el número de depósito de la ATCC 209641. La ATCC está ubicada en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. El depósito en la ATCC se hizo conforme a los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes.

Un "polinucleótido" de CRCGCL también incluye los polinucleótidos que pueden hibridarse, en condiciones de hibridación rigurosas, con las secuencias contenidas en SEQ ID NO:1 que codifican para los residuos de aminoácido +1 a +371 de SEQ ID NO: 2 y que no consisten en la secuencia de polinucleótido de n.º de registro de Genbank X91553. "Condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a una incubación durante la noche a 42°C en una disolución que comprende formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado 20 µg/ml, seguido de lavado de los filtros en 0,1x SSC a aproximadamente 65°C.

También se contemplan moléculas de ácido nucleico que hibridan con los polinucleótidos de CRCGCL en condiciones de hibridación de rigurosidad moderadamente alta. Se logran cambios en la rigurosidad de la hibridación y la detección de la señal principalmente mediante la manipulación de la concentración de formamida (porcentajes inferiores de formamida dan como resultado disminución de la rigurosidad); las condiciones de sal o la temperatura. Por ejemplo, las condiciones de rigurosidad moderadamente alta incluyen una incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende 6X SSPE (20X SSPE = NaCl 3 M; NaH₂PO₄ 0,2 M; EDTA 0,02 M, pH 7,4), SDS al 0,5%, formamida al 30%, ADN de bloqueo de esperma de salmón 100 µg/ml; seguido de lavados a 50°C con 1X SSPE, SDS al 0,1%. Además, para lograr incluso menor rigurosidad, los lavados realizados tras la hibridación rigurosa pueden realizarse a unas concentraciones de sal superiores (por ejemplo, 5X SSC).

Obsérvese que pueden lograrse variaciones en las condiciones anteriores mediante la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos usados para suprimir el fondo en experimentos de hibridación. Reactivos de bloqueo típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, ADN de esperma de salmón desnaturalizado y

formulaciones patentadas comercialmente disponibles. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación descritas anteriormente, debido a problemas con la compatibilidad.

Por supuesto, un polinucleótido que hibrida sólo con secuencias de poliA+ (tal como cualquier extensión de poliA+ terminal en 3' de un ADNc mostrado en la lista de secuencias), o con un tramo complementario de residuos de T (o U), no se incluiría en la definición de "polinucleótido", dado que un polinucleótido de este tipo hibridaría con cualquier molécula de ácido nucleico que contuviese un tramo de poli (A) o el complemento del mismo (por ejemplo, prácticamente cualquier clon de ADNc bicatenario).

El polinucleótido de CRCGCL puede estar compuesto por cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que pueden ser ADN o ARN no modificado, o ADN o ARN modificado. Por ejemplo, los polinucleótidos de CRCGCL pueden estar compuestos por ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario, y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias. Además, los polinucleótidos de CRCGCL pueden estar compuestos por regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Los polinucleótidos de CRCGCL también pueden contener una o más bases modificadas o estructuras principales de ADN y ARN modificadas para aumentar su estabilidad o por otros motivos. Las bases "modificadas" incluyen, por ejemplo, bases tritiladas y bases poco comunes tales como inosina. Puede hacerse una variedad de modificaciones al ADN y ARN; por tanto, "polinucleótido" abarca formas química, enzimática o metabólicamente modificadas.

Los polipéptidos de CRCGCL pueden estar compuestos por aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. Los polipéptidos de CRCGCL pueden modificarse mediante cualquier proceso natural, tal como procesamiento postraduccional, o mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Tales modificaciones se describen bien en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa bibliografía de investigación. Pueden producirse modificaciones en cualquier parte en el polipéptido de CRCGCL, incluyendo la estructura principal del péptido, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo terminal. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en grados iguales o variables en varios sitios en un polipéptido de CRCGCL dado. Además, un polipéptido de CRCGCL dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos de CRCGCL pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos de CRCGCL cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales tras la traducción o pueden prepararse mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclización, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tal como arginilación, y ubiquitinación (véase, por ejemplo, *PROTEINS - STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES*, 2ª Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann NY Acad Sci* 663:48-62 (1992)).

"SEQ ID NO:1" se refiere a una secuencia de polinucleótido de CRCGCL mientras que "SEQ ID NO:2" se refiere a una secuencia de polipéptido de CRCGCL.

Un polipéptido de CRCGCL "que tiene actividad biológica" se refiere a polipéptidos que presentan actividad similar, pero no necesariamente idéntica a una actividad de un polipéptido de CRCGCL, incluyendo formas maduras, tal como se mide en un ensayo biológico particular, con o sin dependencia de la dosis. En el caso en el que exista dependencia de la dosis, no necesita ser idéntica a la del polipéptido de CRCGCL, sino más bien sustancialmente similar a la dependencia de la dosis en un actividad dada en comparación con el polipéptido de CRCGCL (es decir, el polipéptido candidato presentará mayor actividad o no más de aproximadamente 25 veces menos y, preferiblemente, no más de aproximadamente diez veces menos actividad y, lo más preferiblemente, no más de aproximadamente tres veces menos actividad en relación con el polipéptido de CRCGCL).

Polinucleótidos y polipéptidos de CRCGCL

Se aisló el clon HTAEK53 de una biblioteca de ADNc de células T activadas. Inicialmente, se identificó la secuencia del clon HTAEK53 como SEQ ID NO:26 y se pronosticó la secuencia de aminoácidos deducida como SEQ ID NO:27, con el reconocimiento de que existía un desplazamiento del marco evidente en la secuencia entre los nucleótidos 256 y 277. Este desplazamiento del marco se resolvió fácilmente usando técnicas de biología molecular convencionales, generando la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1 y la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en SEQ ID NO:2.

El clon depositado contiene un ADNc que tiene un total de 1573 nucleótidos, que codifica para un marco de lectura abierto pronosticado de 371 residuos de aminoácido (véanse las figuras 1A-1B). El marco de lectura abierto comienza

ES 2 357 020 T3

en una metionina N-terminal ubicada en la posición de nucleótido 13, y termina en un codón de terminación en la posición de nucleótido 1128. El peso molecular pronosticado de la proteína de CRCGCL debe ser de aproximadamente 42 kDa.

5 El análisis de tipo Northern posterior también mostró un transcrito de 1,6 Kb en una línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa), células T activadas y una línea celular de carcinoma de pulmón (A549), mientras que también se expresa una variante más corta en el ganglio linfático y en un menor grado en los tejidos del bazo, un patrón que concuerda con una expresión específica en el sistema inmunitario.

10 No se observó expresión de CRCGCL en las siguientes líneas celulares, HL60, K562, Molt-4, Raji, SW480, G361, así como en corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón, páncreas, timo, próstata, testículos, ovario, intestino delgado, colon o leucocitos de sangre periférica, un patrón que concuerda con una expresión específica en el sistema inmunitario.

15 Usando análisis BLAST, se encontró que SEQ ID NO:2 era homóloga a los miembros de la familia de receptores de citocinas. Particularmente, SEQ ID NO:2 contiene dominios homólogos al producto de traducción del ARNm de *Bos taurus* para el receptor gamma de interleucina-2 (n.º de registro 1532088) (figura 2) (SEQ ID NO:3), incluyendo los siguientes dominios conservados: (a) un dominio transmembrana pronosticado, dominio ubicado en aproximadamente los aminoácidos 226-260; (b) un WXWS pronosticado (SEQ ID NO:30), o [STGL]-x-W-[SG]-x-W-S (SEQ ID
20 NO:18), dominio ubicado en aproximadamente los aminoácidos 198-204 (T-x-P-Sx-W-S) (SEQ ID NO:19), aunque sin un apareamiento perfecto; y (c) una caja Jak pronosticada, que tiene el motivo W(P,E)X(V,I)P(N,S,D)P (SEQ ID NO:20), dominio ubicado en aproximadamente los aminoácidos 261-268 (I-P-X-V-P-D-P) (SEQ ID NO:21), aunque sin un apareamiento perfecto. Estos fragmentos de polipéptido de CRCGCL se contemplan específicamente en la presente descripción.

25 Además, el polipéptido codificado tiene una secuencia líder pronosticada ubicada en aproximadamente los aminoácidos 1-22. (Véanse las figuras 1A-1B). También se muestra en las figuras 1A-1B una realización de la forma secretada de CRCGCL que abarca aproximadamente los aminoácidos 23-371, aminoácidos 23-225 o aminoácidos 1-231. Algunos de estos fragmentos de polipéptido de CRCGCL se contemplan específicamente en la presente invención.
30

Otros fragmentos de polipéptido comprenden la secuencia de aminoácidos: QIQIIFYNLETQVQVTWNASKYSRT NLTFFHYRFNGDEAYDQCTNILLQEGHTSGC (SEQ ID NO:22); RRHSLFLHQEWDAPRFHRKSLDGLLPETQF (SEQ ID NO: 23); LLYEVQYRSPFDTEWQSKQENTCNVTIEGLDAEKCYSFVVVRVKAMEDVYGPDTYPSDW
35 SEVTCWQRGEIRDACAETPTPK (SEQ ID NO:24); y/o MEDVYGPDTYPSDWSEVTCWQRGEIRDACAETPTPKPKLSKIFILISSLAILLMVSLLLLSLWKLWRXKKFLXPSVDPKSIFFGLFXIHQGNFQEWITDTQNV AHLHK MAGAEQESGPEEPLVVQLAKTEAESPRMLDPQTEEKEASGGSLLQLPHQPLQGGDVVTIGGFTFVMNDRSYV A (SEQ ID NO:25), así como fragmentos de la mismas. También se dan a conocer fragmentos de polinucleótido que codifican para estos fragmentos de polipéptido.
40

Dado que se aisló CRCGCL a partir de células T activadas, los ácidos nucleicos de la invención son útiles como reactivos para la identificación diferencial del/de los tejido(s) o tipo(s) de célula(s) presente(s) en una muestra biológica y para el diagnóstico de trastornos inmunitarios. De manera similar, los polipéptidos y anticuerpos dirigidos contra esos polipéptidos son útiles para proporcionar sondas inmunológicas para la identificación diferencial del/de los tejido(s) o
45 tipo(s) de célula(s). Para varios trastornos del sistema inmunitario, puede detectarse la expresión de este gen a niveles significativamente superiores o inferiores en determinados tejidos (por ejemplo, tejidos cancerosos y lesionados) o líquidos corporales (por ejemplo, suero, plasma, orina, líquido sinovial o líquido cefalorraquídeo) tomados de un individuo que tiene un trastorno de este tipo, en relación con el nivel de expresión génica convencional, es decir, el nivel de expresión en tejido sano de un individuo que no tiene el trastorno.
50

La distribución tisular sólo en células T activadas y la homología con los receptores de citocina IL2 e IL13 sugiere que esta proteína es un miembro novedoso de la familia de receptores de citocinas expresados específicamente en células T. La distribución tisular de este gen en células del sistema inmunitario sugiere que el producto proteico de este clon sería útil para el tratamiento, la profilaxis y el diagnóstico de enfermedades inmunitarias y autoinmunitarias, tales como lupus, rechazo de trasplantes, reacciones alérgicas, artritis, asma, enfermedades de inmunodeficiencia, leucemia,
55 SIDA. Además, su expresión en células T sugiere un posible papel en el tratamiento, la profilaxis y la detección de trastornos del timo tales como enfermedad de Graves, tiroiditis linfocítica, hipertiroidismo e hipotiroidismo. El receptor también podría servir como diana para una molécula pequeña o anticuerpo monoclonal, bloqueando su actividad, lo que podría ser importante en los estados patológicos enumerados en el presente documento.
60

La secuencia de nucleótidos de CRCGCL identificada como SEQ ID NO:1 se ensambló a partir de secuencias parcialmente homólogas ("solapantes") obtenidas a partir del clon depositado, y en algunos casos, de clones de ADN relacionados adicionales. Las secuencias solapantes se ensamblaron en una única secuencia contigua de alta redundancia (habitualmente de tres a cinco secuencias solapantes en cada posición de nucleótido), dando como resultado
65 una secuencia final identificada como SEQ ID NO:1.

Por tanto, SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2 traducida son suficientemente precisas y por lo demás adecuadas para una variedad de usos bien conocidos en la técnica y descritos adicionalmente a continuación. Por ejemplo, SEQ ID

ES 2 357 020 T3

NO:1 es útil para diseñar sondas de hibridación de ácidos nucleicos que detectarán secuencias de ácido nucleico contenidas en SEQ ID NO:1 o el ADNc contenido en el clon depositado. Estas sondas también hibridarán con moléculas de ácido nucleico en muestras biológicas, permitiendo de ese modo una variedad de métodos forenses y de diagnóstico de la invención. De manera similar, los polipéptidos identificados a partir de SEQ ID NO:2 pueden usarse para generar anticuerpos que se unen específicamente a CRCGCL.

No obstante, las secuencias de ADN generadas mediante reacciones de secuenciación pueden contener errores de secuenciación. Los errores existen como nucleótidos mal identificados, o como inserciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de ADN generada. Los nucleótidos insertados o delecionados de manera errónea provocan desplazamientos del marco en los marcos de lectura de la secuencia de aminoácidos pronosticada. En estos casos, la secuencia de aminoácidos pronosticada diverge de la secuencia de aminoácidos real, a pesar de que la secuencia de ADN generada pueda ser mayor del 99,9% idéntica a la secuencia de ADN real (por ejemplo, inserción o deleción de una base en un marco de lectura abierto de más de 1000 bases).

Por consiguiente, para las aplicaciones que requieren precisión en la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos, la presente invención proporciona no sólo la secuencia de nucleótidos generada identificada como SEQ ID NO:1 y la secuencia de aminoácidos traducida pronosticada identificada como SEQ ID NO:2, sino también una muestra de ADN de plásmido que contienen un ADNc humano de CRCGCL depositada en la ATCC. La secuencia de nucleótidos del clon de CRCGCL depositado puede determinarse fácilmente secuenciando el clon depositado según métodos conocidos. Entonces, puede verificarse la secuencia de aminoácidos de CRCGCL pronosticada a partir de tales depósitos. Además, la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por el clon depositado también puede determinarse directamente secuenciando péptidos o expresando la proteína en una célula huésped adecuada que contiene el ADNc de CRCGCL humano depositado, recogiendo la proteína y determinando su secuencia.

La presente invención también se refiere al gen de CRCGCL que corresponde a SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o el clon depositado. El gen de CRCGCL puede aislarse según métodos conocidos usando la información de secuencia dada a conocer en el presente documento. Tales métodos incluyen preparar sondas o cebadores a partir de la secuencia dada a conocer e identificar o amplificar el gen de CRCGCL a partir de fuentes apropiadas de material genómico.

También se proporcionan en la presente descripción especies homólogas de CRCGCL. Pueden aislarse e identificarse especies homólogas preparando sondas o cebadores adecuados a partir de las secuencias proporcionadas en el presente documento y seleccionando una fuente de ácido nucleico adecuada para el homólogo deseado.

Los polipéptidos de CRCGCL pueden prepararse de cualquier manera adecuada. Tales polipéptidos incluyen polipéptidos que se producen de manera natural aislados, polipéptidos producidos de manera recombinante, polipéptidos producidos de manera sintética o polipéptidos producidos mediante una combinación de estos métodos. En la técnica se conocen bien medios para preparar tales polipéptidos.

Los polipéptidos de CRCGCL pueden estar en forma de proteína secretada, incluyendo la forma madura, o pueden ser una parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión (véase a continuación). A menudo es ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias líder o secretoras, prosecretoras, secuencias que ayudan en la purificación, tales como múltiples residuos de histidina, o una secuencia adicional para aumentar su estabilidad durante la producción recombinante.

Preferiblemente, se proporcionan polipéptidos de CRCGCL en forma aislada, y preferiblemente están sustancialmente purificados. Una versión producida de manera recombinante de un polipéptido de CRCGCL, que incluye el polipéptido secretado, puede purificarse sustancialmente mediante el método de una etapa descrito en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988). Los polipéptidos de CRCGCL también pueden purificarse a partir de fuentes naturales o recombinantes usando anticuerpos de la invención generados contra la proteína de CRCGCL en métodos que se conocen bien en la técnica.

Variantes de polinucleótidos y polipéptidos

“Variante” se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido de CRCGCL, pero que conserva propiedades esenciales del mismo. Generalmente, las variantes son, en general, muy similares y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido de CRCGCL.

Por un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, el 95% “idéntica” a una secuencia de nucleótidos de referencia de la presente invención, se pretende que la secuencia de nucleótidos del polinucleótido sea idéntica a la secuencia de referencia excepto porque la secuencia de polinucleótido puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia que codifica para el polipéptido de CRCGCL. En otras palabras, para obtener un polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos al menos el 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, puede deleccionarse o sustituirse por otro nucleótido hasta el 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia, o pueden insertarse en la secuencia de referencia varios nucleótidos hasta el 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia. La secuencia de consulta puede ser una secuencia completa mostrada en SEQ ID NO:1, el ORF (marco de lectura abierto) o cualquier fragmento especificado tal como se describe en el presente documento.

ES 2 357 020 T3

En la práctica, puede determinarse convencionalmente si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos de la presente invención usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento global entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominada alineación de secuencias global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias de ADN. Pueden compararse una secuencia de ARN convirtiendo las U en T. El resultado de dicha alineación de secuencias global es en porcentaje de identidad. Parámetros preferidos usados en una alineación con FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tupla=4, penalización por apareamiento erróneo=1, penalización por unión=30, longitud del grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, penalización por hueco=5, penalización por tamaño de hueco 0,05, tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objeto, la que sea más corta.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a deleciones en 5' ó 3', no debido a deleciones internas, debe realizarse una corrección manual a los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos en 5' y 3' de la secuencia objeto cuando calcula el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', en relación con la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia de consulta que están en 5' y 3' respecto a la secuencia objeto, que no se aparean/alinean, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Se determina si un nucleótido está apareado/alineado mediante resultados de la alineación de secuencias con FASTDB. Entonces, se resta este porcentaje del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es la que se usa para los fines de la presente invención. Sólo las bases fuera de las bases en 5' y 3' de la secuencia objeto, tal como se representa mediante la alineación con FASTDB, que no están apareadas/alineadas con la secuencia de consulta, se calculan para los fines del ajuste manual de la puntuación del porcentaje de identidad.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea con una secuencia de consulta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las deleciones se producen en el extremo 5' de la secuencia objeto y, por tanto, la alineación con FASTDB no muestra un apareamiento/alineación de las 10 primeras bases en el extremo 5'. Las 10 bases no apareadas representan el 10% de la secuencia (el número de bases en los extremos 5' y 3' no apareadas/número de total de bases en la secuencia de consulta) de modo que se resta el 10% de la puntuación de porcentaje de identidad calculada mediante el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran perfectamente apareadas, el porcentaje de identidad final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia de consulta de 100 bases. Esta vez las deleciones son deleciones internas de modo que no existe ninguna base en el extremo 5' o 3' de la secuencia objeto que no esté apareada/alineada con la de consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado mediante FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, sólo las bases en 5' y 3' de la secuencia objeto que no están apareadas/alineadas con la secuencia de consulta se corrigen manualmente. No se hace ninguna otra corrección manual para los fines de la presente invención.

Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, el 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de consulta de la presente invención, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto sea idéntico a la secuencia de consulta excepto porque la secuencia de polipéptido objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de consulta, pueden insertarse, deleccionarse, (indels) o sustituirse por otro aminoácido hasta el 5% de los residuos de aminoácido en la secuencia objeto. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden producirse en las posiciones amino o carboxilo terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas o bien individualmente entre los residuos en la secuencia de referencia o bien en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

En la práctica, puede determinarse convencionalmente si cualquier polipéptido particular es al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO:2 o a la secuencia de aminoácidos codificada por el clon de ADN depositado usando programas informáticos conocidos. Un método preferido para determinar el mejor apareamiento global entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente invención) y una secuencia objeto, también denominada alineación de secuencias global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.* (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245). En una alineación de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son o bien ambas secuencias de nucleótidos o bien ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicha alineación de secuencias global es en porcentaje de identidad. Parámetros preferidos usados en una alineación de aminoácidos con FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tupla=2, penalización por apareamiento erróneo=1, penalización por unión=20, longitud del grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, tamaño de ventana=longitud de secuencia, penalización por hueco=5, penalización por tamaño de hueco=0,05, tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, la que sea más corta.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a deleciones N- o C-terminales, no debido a deleciones internas, debe realizarse una corrección manual a los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos en los extremos N- y C-terminales de la secuencia objeto cuando calcula el porcentaje de identidad global. Para secuencias objetos truncadas en los extremos N- y C-terminales, en relación con la secuencia de consulta, se corrige el porcentaje de identidad calculando el número de residuos de la secuencia de

consulta que están en posición N- y C-terminal con respecto a la secuencia objeto, que no están apareados/alineados con un residuo objeto correspondiente, como porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Se determina si un residuo está apareado/alineado mediante los resultados de la alineación de secuencias con FASTDB. Entonces, se resta este porcentaje del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es la que se usa para los fines de la presente invención. Sólo los residuos en los extremos N- y C-terminales de la secuencia objeto, que no están apareados/alineados con la secuencia de consulta, se consideran para los fines del ajuste manual de la puntuación del porcentaje de identidad. Es decir, sólo las posiciones de residuos de consulta fuera de los residuos N- y C-terminales más alejados de la secuencia objeto.

Por ejemplo, se alinea una secuencia objeto de 90 residuos de aminoácido con una secuencia de consulta de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La delección se produce en el extremo N-terminal de la secuencia objeto y por tanto la alineación con FASTDB no muestra un apareamiento/alineación de los primeros 10 residuos en el extremo N-terminal. Los 10 residuos no apareados representan el 10% de la secuencia (número de residuos en los extremos N- y C-terminales no apareados/número total de residuos en la secuencia de consulta) de modo que se resta el 10% de la puntuación de porcentaje de identidad calculada mediante el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes estuvieran perfectamente apareados, el porcentaje de identidad final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 residuos con una secuencia de consulta de 100 residuos. Esta vez las delecciones son delecciones internas, de modo que no existen residuos en los extremos N- o C-terminal de la secuencia objeto que no estén apareados o alineados con la de consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado mediante FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, sólo las posiciones de residuos fuera de los extremos N- y C-terminales de la secuencia objeto, tal como se representa en el alineamiento con FASTDB, que no están apareadas/alineadas con la secuencia de consulta se corrigen manualmente. No se hace ninguna otra corrección manual para los fines de la presente invención.

Las variantes de CRCGCL pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes o ambas. Se prefieren especialmente variantes de polinucleótidos que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones, o delecciones silenciosas, pero que no alteran las propiedades ni las actividades del polipéptido codificado. Se prefieren variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Además, también se prefieren variantes en las que se sustituyen, delecionan, o añaden 5-10, 1-5 ó 1-2 aminoácidos en cualquier combinación. Pueden producirse variantes de polinucleótidos de CRCGCL por una variedad de motivos, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambio de codones en el ARNm humano por los preferidos por un huésped bacteriano tal como *E. coli*).

Las variantes de CRCGCL que se producen de manera natural se denominan “variantes alélicas,” y hacen referencia a una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar o bien al nivel de polinucleótido y/o bien de polipéptido. Alternativamente, pueden producirse variantes que no se producen de manera natural mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

Usando métodos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante, pueden generarse variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos de CRCGCL. Por ejemplo, puede deleccionarse uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de la proteína secretada sin pérdida sustancial de función biológica. Los autores de Ron *et al.*, J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993), notificaron proteínas KGF variantes que tenían actividad de unión a heparina incluso tras deleccionar 3, 8 ó 27 residuos de aminoácido amino-terminales. De manera similar, el interferón gamma presentaba una actividad hasta diez veces superior tras deleccionar 8-10 residuos de aminoácido del extremo carboxilo terminal de esta proteína (Dobeli *et al.*, J. Biotechnology 7:199-216 (1988)).

Además, muchas pruebas demuestran que las variantes a menudo conservan una actividad biológica similar a la de la proteína que se produce de manera natural. Por ejemplo, Gayle y colaboradores (J. Biol. Chem 268:22105-22111 (1993)) realizaron un extenso análisis mutacional de la citocina humana IL-1a. Usaron mutagénesis al azar para generar más de 3.500 mutantes de IL-1a individuales que promediaron 2,5 cambios de aminoácidos por variante a lo largo de toda la longitud de la molécula. Se examinaron mutaciones múltiples en cada posición de aminoácido posible. Los investigadores encontraron que “la [m]ayoría de la molécula podría alterarse con poco efecto sobre la [actividad o bien de unión o bien biológica]”. (Véase el resumen). De hecho, sólo 23 secuencias de aminoácidos únicas, de más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difería significativamente en su actividad de la de tipo natural.

Además, incluso si la delección de uno o más aminoácidos del extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido da como resultado la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas, pueden conservarse todavía otras actividades biológicas. Por ejemplo, la capacidad de una variante de delección para inducir y/o para unirse a anticuerpos que reconocen la forma secretada probablemente se conservará cuando se eliminan menos de la mayoría de los residuos de la forma secretada del extremo N-terminal o C-terminal. Puede determinarse fácilmente si un polipéptido particular que carece de residuos N- o C-terminales de una proteína conserva tales actividades inmunogénicas mediante métodos de rutina descritos en el presente documento y conocidos por lo demás en la técnica.

Por tanto, la descripción incluye además variantes de polipéptidos de CRCGCL que muestran actividad biológica sustancial. Tales variantes incluyen delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones seleccionadas según reglas generales conocidas en la técnica de modo que tengan poco efecto sobre la actividad. Por ejemplo, se

proporciona orientación referente a cómo realizar sustituciones de aminoácidos fenotípicamente silenciosas en Bowie, J. U. *et al.*, Science 247:1306-1310 (1990), en el que los autores indican que existen dos estrategias principales para estudiar la tolerancia de una secuencia de aminoácidos al cambio.

5 La primera estrategia explota la tolerancia de sustituciones de aminoácidos mediante selección natural durante el proceso de evolución. Al comparar secuencias de aminoácidos en diferentes especies, pueden identificarse aminoácidos conservados. Estos aminoácidos conservados son probablemente importantes para la función de la proteína. Por el contrario, las posiciones de aminoácidos en las que se han tolerado sustituciones mediante selección natural indica que estas posiciones no son críticas para la función de la proteína. Por tanto, las posiciones que toleran sustitución de
10 aminoácidos podrían modificarse mientras que se mantiene todavía la actividad biológica de la proteína.

La segunda estrategia usa ingeniería genética para introducir cambios de aminoácidos en posiciones específicas de un gen clonado para identificar regiones críticas para la función de la proteína. Por ejemplo, pueden usarse mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis por exploración de alanina (introducción de mutaciones de alanina individuales en cada
15 residuo de la molécula) (Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Entonces, las moléculas mutantes resultantes pueden someterse a prueba para detectar la actividad biológica.

Tal como declaran los autores, estas dos estrategias han revelado que las proteínas son sorprendentemente tolerantes a sustituciones de aminoácidos. Los autores indican además que es probable que los cambios de aminoácidos sean permisivos en determinadas posiciones de aminoácidos en la proteína. Por ejemplo, los residuos de aminoácido más enterrados (dentro de la estructura terciaria de la proteína) requieren cadenas laterales no polares, mientras que se conservan algunas características de las cadenas laterales superficiales generalmente. Además, las sustituciones de aminoácidos conservativas toleradas implican sustitución de los aminoácidos alifáticos o hidrófobos Ala, Val, Leu y Ile; sustitución de los residuos de hidroxilo Ser y Thr; sustitución de los residuos ácidos Asp y Glu; sustitución de los
20 residuos de amida Asn y Gln, sustitución de los residuos básicos Lys, Arg e His; sustitución de los residuos aromáticos Phe, Tyr y Trp, y sustitución de los aminoácidos de pequeño tamaño Ala, Ser, Thr, Met y Gly.

Además de la sustitución de aminoácidos conservativa, las variantes de CRCGCL incluyen (i) sustituciones con uno o más de los residuos de aminoácido no conservados, en las que los residuos de aminoácido sustituidos pueden ser o no uno codificado por el código genético, o (ii) sustitución por uno o más de los residuos de aminoácido que tienen un grupo sustituyente, o (iii) fusión del polipéptido maduro con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la estabilidad y/o solubilidad del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) fusión del polipéptido con aminoácidos adicionales, tales como un péptido de región de fusión Fc de IgG, o secuencia líder o secretora, o una secuencia que facilita la purificación. Tales polipéptidos variantes se consideran dentro del alcance de los expertos en
30 la técnica a partir de las enseñanzas en el presente documento.

Por ejemplo, variantes del polipéptido de CRCGCL que contienen sustituciones de aminoácidos cargados por otros aminoácidos cargados o neutros pueden producir proteínas con características mejoradas, tales como menos agregación. La agregación de formulaciones farmacéuticas tanto reduce la actividad como aumenta el aclaramiento debido a la actividad inmunogénica del agregado (Pinckard *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 2:331-340 (1967); Robbins *et al.*, Diabetes 36: 838-845 (1987); Cleland *et al.*, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377 (1993)).
40

Una realización adicional de la descripción se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CRCGCL que tiene una secuencia de aminoácidos que contiene al menos una sustitución de aminoácido, pero no más de 50 sustituciones de aminoácidos, incluso más preferiblemente, no más de 40 sustituciones de aminoácidos, todavía más preferiblemente, no más de 30 sustituciones de aminoácidos, e incluso todavía más preferiblemente, no más de 20 sustituciones de aminoácidos. Por supuesto, con el fin de aumentar más la preferencia, es altamente preferible para un péptido o polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos que comprenda la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de CRCGCL, que contiene al menos uno, pero no más de 10, 9, 8, 7,
50 6, 5, 4, 3, 2 ó 1 sustituciones de aminoácidos. En realizaciones específicas, es preferible que el número de adiciones, sustituciones y/o deleciones en la secuencia de aminoácidos de las figuras 1A-1B o fragmentos de la misma (por ejemplo, la forma madura y/u otros fragmentos descritos en el presente documento), sea de 1-5, 5-10, 5-25, 5-50, 10-50 ó 50-150 sustituciones de aminoácidos conservativas.

55 *Fragmentos de polinucleótido y polipéptido*

En la presente descripción, un “fragmento de polinucleótido” se refiere a un polinucleótido corto que tiene una secuencia de ácido nucleico contenida en el clon depositado o mostrado en SEQ ID NO:1. Los fragmentos de nucleótidos cortos preferiblemente tienen al menos aproximadamente 15 nt, y más preferiblemente al menos aproximadamente 20
60 nt, todavía más preferiblemente al menos aproximadamente 30 nt, e incluso más preferiblemente, al menos aproximadamente 40 nt de longitud. Un fragmento “al menos de 20 nt de longitud”, por ejemplo, se pretende que incluya 20 o más bases contiguas de la secuencia de ADNc contenida en el clon depositado o la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO:1. Estos fragmentos de nucleótidos son útiles como sondas y cebadores de diagnóstico tal como se trata en el presente documento. Por supuesto, se prefieren fragmentos más grandes (por ejemplo, 50, 150, 500, 600,
65 2000 nucleótidos).

Además, ejemplos representativos de fragmentos de polinucleótido de CRCGCL incluyen, por ejemplo, fragmentos que tiene una secuencia desde aproximadamente el número de nucleótido 1-50, 51-100, 101-150, 151-200, 201-

ES 2 357 020 T3

250, 251-300, 301-350, 351-400, 401-450, 451-500, 501-550, 551-600, 651-700, 701-750, 751-800, 800-850, 851-900, 901-950, 951-1000, 1001-1050, 1051-1100, 1101-1150, 1151-1200, 1201-1250, 1251-1300, 1301-1350, 1351-1400, 1401-1450, 1451-1500, 1501-1550, 1551-1600, 1601-1650, 1651-1700, 1701-1750, 1751-1800, 1801-1850, 1851-1900, 1901-1950, 1951-2000 ó 2001 hasta el final de SEQ ID NO: o el ADNc contenido en el clon depositado.

5 En este contexto, “aproximadamente” incluye los intervalos mencionados particularmente, mayores o menores en varios (5, 4, 3, 2 ó 1) nucleótidos, en cualquier extremo terminal o en ambos extremos terminales. Preferiblemente, estos fragmentos codifican para un polipéptido que tiene actividad biológica. Más preferiblemente, estos polinucleótidos pueden usarse como sondas o cebadores tal como se trata en el presente documento.

10 En la presente descripción, un “fragmento de polipéptido” se refiere a una secuencia de aminoácidos corta contenida en SEQ ID NO:2 o codificada por el ADNc contenido en el clon depositado. Los fragmentos de proteína puede ser “independientes”, o pueden estar comprendidos dentro de un polipéptido mayor del cual el fragmento forma una parte o región, lo más preferiblemente como una región continua individual. Ejemplos representativos de fragmentos de polipéptido de la invención incluyen, por ejemplo, fragmentos desde aproximadamente número de aminoácido 1-20, 21-40, 41-60, 61-80, 81-100, 102-120, 121-140, 141-160, 161-180, 181-200, 201-220, 221-240, 241-260, 261-280

15 o 281 hasta el final de la región codificante. Además, los fragmentos de polipéptido pueden tener aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 ó 150 aminoácidos de longitud. En este contexto “aproximadamente” incluye los intervalos mencionados particularmente, mayores o menores en varios (5, 4, 3, 2 ó 1) aminoácidos, en cualquier extremo o en ambos extremos.

20 Fragmentos de polipéptido preferidos incluyen la proteína de CRCGCL secretada así como la forma madura. Fragmentos de polipéptido preferidos adicionales incluyen la proteína de CRCGCL secretada o la forma madura que tiene una serie continua de residuos delecionados del extremo amino o el carboxilo terminal, o ambos. Por ejemplo, puede deleccionarse cualquier número de aminoácidos, que oscila desde 1-60, del extremo amino terminal de o bien el polipéptido de CRCGCL secretado o bien la forma madura. De manera similar, puede deleccionarse cualquier número de aminoácidos, que oscila desde 1-30, del extremo carboxilo terminal de la proteína de CRCGCL secretada o la forma madura. Además, se prefiere cualquier combinación de delecciones en los extremos amino y carboxilo terminales anteriores. De manera similar, también se prefieren fragmentos de polinucleótido que codifican para estos fragmentos de polipéptido de CRCGCL.

30 Particularmente, pueden describirse delecciones N-terminales del polipéptido de CRCGCL mediante la fórmula general m-371, en la que m es un entero desde 2 hasta 370, en la que m corresponde a la posición del residuo de aminoácido identificado en SEQ ID NO:2. Más en particular, se dan a conocer polinucleótidos que codifican para polipéptidos que comprenden, o alternativamente consisten en, la secuencia de aminoácidos de residuos de delecciones N-terminales del polipéptido de CRCGCL de la invención mostrada como SEQ ID NO:2 incluyendo polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de residuos: G-2 a L-371; R-3 a L-371; L-4 a L-371; V-5 a L-371; L-6 a L-371; L-7 a L-371; W-8 a L-371; G-9 a L-371; A-10 a L-371; A-11 a L-371; V-12 a L-371; F-13 a L-371; L-14 a L-371; L-15 a L-371; G-16 a L-371; G-17 a L-371; W-18 a L-371; M-19 a L-371; A-20 a L-371; L-21 a L-371; G-22 a L-371; Q-23 a L-371; G-24 a L-371; G-25 a L-371; A-26 a L-371; A-27 a L-371; E-28 a L-371; G-29 a L-371; V-30 a L-371; Q-31 a L-371; I-32 a L-371; Q-33 a L-371; I-34 a L-371; I-35 a L-371; Y-36 a L-371; F-37 a L-371; N-38 a L-371; L-39 a L-371; E-40 a L-371; T-41 a L-371; V-42 a L-371; Q-43 a L-371; V-44 a L-371; T-45 a L-371; W-46 a L-371; N-47 a L-371; A-48 a L-371; S-49 a L-371; K-50 a L-371; Y-51 a L-371; S-52 a L-371; R-53 a L-371; T-54 a L-371; N-55 a L-371; L-56 a L-371; T-57 a L-371; F-58 a L-371; H-59 a L-371; Y-60 a L-371; R-61 a L-371; F-62 a L-371; N-63 a L-371; G-64 a L-371; D-65 a L-371; E-66 a L-371; A-67 a L-371; Y-68 a L-371; D-69 a L-371; Q-70 a L-371; C-71 a L-371; T-72 a L-371; N-73 a L-371; Y-74 a L-371; L-75 a L-371; L-76 a L-371; Q-77 a L-371; E-78 a L-371; G-79 a L-371; H-80 a L-371; T-81 a L-371; S-82 a L-371; G-83 a L-371; C-84 a L-371; L-85 a L-371; L-86 a L-371; D-87 a L-371; A-88 a L-371; E-89 a L-371; Q-90 a L-371; R-91 a L-371; D-92 a L-371; D-93 a L-371; I-94 a L-371; L-95 a L-371; Y-96 a L-371; F-97 a L-371; S-98 a L-371; I-99 a L-371; R-100 a L-371; N-101 a L-371; R-91 a L-371; D-92 a L-371; D-93 a L-371; I-94 a L-371; L-95 a L-371; Y-96 a L-371; F-97 a L-371; S-98 a L-371; I-99 a L-371; R-100 a L-371; N-101 a L-371; G-102 a L-371; T-103 a L-371; H-104 a L-371; P-105 a L-371; V-106 a L-371; F-107 a L-371; T-108 a L-371; A-109 a L-371; S-110 a L-371; R-111 a L-371; W-112 a L-371; M-113 a L-371; V-114 a L-371; Y-115 a L-371; Y-116 a L-371; L-117 a L-371; K-118 a L-371; P-119 a L-371; S-120 a L-371; S-121 a L-371; P-122 a L-371; K-123 a L-371; H-124 a L-371; V-125 a L-371; R-126 a L-371; F-127 a L-371; S-128 a L-371; W-129 a L-371; H-130 a L-371; Q-131 a L-371; D-132 a L-371; A-133 a L-371; V-134 a L-371; T-135 a L-371; V-136 a L-371; T-137 a L-371; C-138 a L-371; S-139 a L-371; D-140 a L-371; L-141 a L-371; S-142 a L-371; Y-143 a L-371; G-144 a L-371; D-145 a L-371; L-146 a L-371; L-147 a L-371; Y-148 a L-371; E-149 a L-371; V-150 a L-371; Q-151 a L-371; Y-152 a L-371; R-153 a L-371; S-154 a L-371; P-155 a L-371; F-156 a L-371; D-157 a L-371; T-158 a L-371; E-159 a L-371; W-160 a L-371; Q-161 a L-371; S-162 a L-371; K-163 a L-371; Q-164 a L-371; E-165 a L-371; N-166 a L-371; T-167 a L-371; C-168 a L-371; N-169 a L-371; V-170 a L-371; T-171 a L-371; I-172 a L-371; E-173 a L-371; G-174 a L-371; L-175 a L-371; D-176 a L-371; A-177 a L-371; E-178 a L-371; K-179 a L-371; C-180 a L-371; Y-181 a L-371; S-182 a L-371; F-183 a L-371; W-184 a L-371; V-185 a L-371; R-186 a L-371; V-187 a L-371; K-188 a L-371; A-189 a L-371; M-190 a L-371; E-191 a L-371; D-192 a L-371; V-193 a L-371; Y-194 a L-371; G-195 a L-371; P-196 a L-371; D-197 a L-371; T-198 a L-371; Y-199 a L-371; P-200 a L-371; S-201 a L-371; D-202 a L-371; W-203 a L-371; S-204 a L-371; E-205 a L-371; V-206 a L-371; T-207 a L-371; C-208 a L-371; W-209 a L-371; Q-210 a L-371; R-211 a L-371; G-212 a L-371; E-213 a L-371; I-214 a L-371; R-215 a L-371; D-216 a L-371; A-217 a L-371; C-218 a L-371; A-219 a L-371; E-220 a L-371; T-221 a L-371; P-222 a L-371; T-223 a L-371; P-224 a L-371; P-225 a L-371; K-226 a L-371; P-227 a L-371; K-228 a L-371; L-229 a L-371; S-230 a L-371; K-231 a L-371; F-232 a L-371; I-233 a L-371; L-234 a L-371; I-235 a L-371; S-236 a L-371; S-237 a L-371; L-

ES 2 357 020 T3

238 a L-371; A-239 a L-371; I-240 a L-371; L-241 a L-371; L-242 a L-371; M-243 a L-371; V-244 a L-371; S-245 a L-371; L-246 a L-371; L-247 a L-371; L-248 a L-371; L-249 a L-371; S-250 a L-371; L-251 a L-371; W-252 a L-371; K-253 a L-371; L-254 a L-371; W-255 a L-371; R-256 a L-371; V-257 a L-371; K-258 a L-371; K-259 a L-371; F-260 a L-371; L-261 a L-371; I-262 a L-371; P-263 a L-371; S-264 a L-371; V-265 a L-371; P-266 a L-371; D-267 a L-371; P-268 a L-371; K-269 a L-371; S-270 a L-371; I-271 a L-371; F-272 a L-371; P-273 a L-371; G-274 a L-371; L-275 a L-371; F-276 a L-371; E-277 a L-371; I-278 a L-371; H-279 a L-371; Q-280 a L-371; G-281 a L-371; N-282 a L-371; F-283 a L-371; Q-284 a L-371; E-285 a L-371; W-286 a L-371; I-287 a L-371; T-288 a L-371; D-289 a L-371; T-290 a L-371; Q-291 a L-371; N-292 a L-371; V-293 a L-371; A-294 a L-371; H-295 a L-371; L-296 a L-371; H-297 a L-371; K-298 a L-371; M-299 a L-371; A-300 a L-371; G-301 a L-371; A-302 a L-371; E-303 a L-371; Q-304 a L-371; E-305 a L-371; S-306 a L-371; G-307 a L-371; P-308 a L-371; E-309 a L-371; E-310 a L-371; P-311 a L-371; L-312 a L-371; V-313 a L-371; V-314 a L-371; Q-315 a L-371; L-316 a L-371; A-317 a L-371; K-318 a L-371; T-319 a L-371; E-320 a L-371; A-321 a L-371; E-322 a L-371; S-323 a L-371; P-324 a L-371; R-325 a L-371; M-326 a L-371; L-327 a L-371; D-328 a L-371; P-329 a L-371; Q-330 a L-371; T-331 a L-371; E-332 a L-371; E-333 a L-371; K-334 a L-371; E-335 a L-371; A-336 a L-371; S-337 a L-371; G-338 a L-371; G-339 a L-371; S-340 a L-371; L-341 a L-371; Q-342 a L-371; L-343 a L-371; P-344 a L-371; H-345 a L-371; Q-346 a L-371; P-347 a L-371; L-348 a L-371; Q-349 a L-371; G-350 a L-371; G-351 a L-371; D-352 a L-371; V-353 a L-371; V-354 a L-371; T-355 a L-371; I-356 a L-371; G-357 a L-371; G-358 a L-371; F-359 a L-371; T-360 a L-371; F-361 a L-371; V-362 a L-371; M-363 a L-371; N-364 a L-371; D-365 a L-371; R-366 a L-371; de SEQ ID NO:2. La descripción también abarca polinucleótidos que codifican para estos polipéptidos.

Además, también pueden describirse deleciones C-terminales del polipéptido de CRCGCL mediante la fórmula general 1-n, en la que n es un entero desde 2 hasta 371, en la que n corresponde a la posición de residuo de aminoácido identificada en SEQ ID NO:2. Más en particular, se dan a conocer polinucleótidos que codifican para polipéptidos que comprenden, o alternativamente consisten en, la secuencia de aminoácidos de residuos de deleciones C-terminales del polipéptido de CRCGCL de la invención mostrada como SEQ ID NO:2, incluyendo polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de residuos: M-1 a A-370; M-1 a V-369; M-1 a Y-368; M-1 a S-367; M-1 R-366; M-1 a D-365; M-1 a N-364; M-1 a M-363; M-1 a V-362; M-1 a F-361; M-1 a T-360; M-1 a F-359; M-1 a G-358; M-1 a G-357; M-1 a I-356; M-1 a T-355; M-1 a V-354; M-1 a V-353; M-1 a D-352; M-1 a G-351; M-1 a G-350; M-1 a Q-349; M-1 a L-348; M-1 a P-347; M-1 a Q-346; M-1 a H-345; M-1 a P-344; M-1 a L-343; M-1 a Q-342; M-1 a L-341; M-1 a S-340; M-1 a G-339; M-1 a G-338; M-1 a S-337; M-1 a A-336; M-1 a E-335; M-1 a K-334; M-1 a E-333; M-1 a E-332; M-1 a T-331; M-1 a Q-330; M-1 a P-329; M-1 a D-328; M-1 a L-327; M-1 a M-326; M-1 a R-325; M-1 a P-324; M-1 a S-323; M-1 a E-322; M-1 a A-321; M-1 a E-320; M-1 a T-319; M-1 a K-318; M-1 a A-317; M-1 a L-316; M-1 a Q-315; M-1 a V-314; M-1 a V-313; M-1 a G-301; M-1 a A-300; M-1 a M-299; M-1 a K-298; M-1 a H-297; M-1 a L-296; M-1 a H-295; M-1 a A-294; M-1 a V-293; M-1 a N-292; M-1 a Q-291; M-1 a T-290; M-1 a D-289; M-1 a T-288; M-1 a I-287; M-1 a W-286; M-1 a E-285; M-1 a Q-284; M-1 a F-283; M-1 a N-282; M-1 a G-281; M-1 a Q-280; M-1 a H-279; M-1 a I-278; M-1 a E-277; M-1 a F-276; M-1 a L-275; M-1 a G-274; M-1 a P-273; M-1 a F-272; M-1 a I-271; M-1 a S-270; M-1 a K-269; M-1 a P-268; M-1 a D-267; M-1 a P-266; M-1 a V-265; M-1 a S-264; M-1 a P-263; M-1 a I-262; M-1 a L-261; M-1 a F-260; M-1 a K-259; M-1 a K-258; M-1 a V-257; M-1 a R-256; M-1 a W-255; M-1 a L-254; M-1 a K-253; M-1 a W-252; M-1 a L-251; M-1 a S-250; M-1 a L-249; M-1 a L-248; M-1 a L-247; M-1 a L-246; M-1 a S-245; M-1 a V-244; M-1 a M-243; M-1 a L-242; M-1 a L-241; M-1 a I-240; M-1 a A-239; M-1 a L-238; M-1 a S-237; M-1 a S-236; M-1 a I-235; M-1 a L-234; M-1 a I-233; M-1 a F-232; M-1 a K-231; M-1 a S-230; M-1 a L-229; M-1 a K-228; M-1 a P-227; M-1 a K-226; M-1 a P-225; M-1 a P-224; M-1 a T-223; M-1 a P-222; M-1 a T-221; M-1 a E-220; M-1 a A-219; M-1 a C-218; M-1 a A-217; M-1 a D-216; M-1 a R-215; M-1 a I-214; M-1 a E-213; M-1 a G-212; M-1 a R-211; M-1 a Q-210; M-1 a W-209; M-1 a C-208; M-1 a T-207; M-1 a V-206; M-1 a E-205; M-1 a S-204; M-1 a W-203; M-1 a D-202; M-1 a S-201; M-1 a P-200; M-1 a Y-199; M-1 a T-198; M-1 a D-197; M-1 a P-196; M-1 a G-195; M-1 a Y-194; M-1 a V-193; M-1 a D-192; M-1 a E-191; M-1 a M-190; M-1 a A-189; M-1 a K-188; M-1 a V-187; M-1 a R-186; M-1 a V-185; M-1 a W-184; M-1 a F-183; M-1 a S-182; M-1 a Y-181; M-1 a C-180; M-1 a K-179; M-1 a E-178; M-1 a A-177; M-1 a D-176; M-1 a L-175; M-1 a G-174; M-1 a E-173; M-1 a I-172; M-1 a T-171; M-1 a V-170; M-1 a N-169; M-1 a C-168; M-1 a T-167; M-1 a N-166; M-1 a E-165; M-1 a Q-164; M-1 a K-163; M-1 a S-162; M-1 a Q-161; M-1 a W-160; M-1 a E-159; M-1 a T-158; M-1 a D-157; M-1 a F-156; M-1 a P-155; M-1 a S-154; M-1 a R-153; M-1 a Y-152; M-1 a Q-151; M-1 a V-150; M-1 a E-149; M-1 a Y-148; M-1 a L-147; M-1 a L-146; M-1 a D-145; M-1 a G-144; M-1 a Y-143; M-1 a S-142; M-1 a L-141; M-1 a D-140; M-1 a S-139; M-1 a C-138; M-1 a T-137; M-1 a V-136; M-1 a T-135; M-1 a V-134; M-1 a A-133; M-1 a D-132; M-1 a Q-131; M-1 a H-130; M-1 a W-129; M-1 a S-128; M-1 a F-127; M-1 a R-126; M-1 a V-125; M-1 a H-124; M-1 a K-123; M-1 a P-122; M-1 a S-121; M-1 a S-120; M-1 a P-119; M-1 a K-118; M-1 a L-117; M-1 a Y-116; M-1 a Y-115; M-1 a V-114; M-1 a M-113; M-1 a W-112; M-1 a R-111; M-1 a S-110; M-1 a A-109; M-1 a T-108; M-1 a F-107; M-1 a V-106; M-1 a P-105; M-1 a H-104; M-1 a T-103; M-1 a G-102; M-1 a N-101; M-1 a R-100; M-1 a I-99; M-1 a S-98; M-1 a F-97; M-1 a Y-96; M-1 a L-95; M-1 a I-94; M-1 a D-93; M-1 a D-92; M-1 a R-91; M-1 a Q-90; M-1 a E-89; M-1 a A-88; M-1 a D-87; M-1 a L-86; M-1 a L-85; M-1 a C-84; M-1 a G-83; M-1 a S-82; M-1 a T-81; M-1 a H-80; M-1 a G-79; M-1 a E-78; M-1 a Q-77; M-1 a L-76; M-1 a L-75; M-1 a Y-74; M-1 a N-73; M-1 a T-72; M-1 a C-71; M-1 a Q-70; M-1 a D-69; M-1 a Y-68; M-1 a A-67; M-1 a E-66; M-1 a D-65; M-1 a G-64; M-1 a N-63; M-1 a F-62; M-1 a R-61; M-1 a Y-60; M-1 a H-59; M-1 a F-58; M-1 a T-57; M-1 a L-56; M-1 a N-55; M-1 a T-54; M-1 a R-53; M-1 a S-52; M-1 a Y-51; M-1 a K-50; M-1 a S-49; M-1 a A-48; M-1 a N-47; M-1 a W-46; M-1 a T-45; M-1 a V-44; M-1 a Q-43; M-1 a V-42; M-1 a T-41; M-1 a E-40; M-1 a L-39; M-1 a N-38; M-1 a F-37; M-1 a Y-36; M-1 a I-35; M-1 a I-34; M-1 a Q-33; M-1 a I-32; M-1 a Q-31; M-1 a V-30; M-1 a G-29; M-1 a E-28; M-1 a A-27; M-1 a A-26; M-1 a G-25; M-1 a G-24; M-1 a Q-23; M-1 a G-22; M-1 a L-21; M-1 a A-20; M-1 a M-19; M-1 a W-18; M-1 a G-17; M-1 a G-16; M-1 a L-15; M-1 a L-14; M-1 a F-13; M-1 a V-12; M-1 a A-11; M-1 a A-10; M-1 a G-9; M-1 a W-8; M-1 a L-7; de SEQ ID NO:2. La descripción también abarca polinucleótidos que codifican para estos polipéptidos.

ES 2 357 020 T3

Además, cualquiera de las deleciones N- o C-terminales enumeradas anteriormente pueden combinarse para producir un polipéptido de CRCGCL delecionado N- y C-terminal. La descripción también proporciona polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos delecionados tanto del extremo amino como del carboxilo terminal, que pueden describirse generalmente como que tienen m-n residuos de SEQ ID NO:2, en la que n y m son enteros tal como se describieron anteriormente. La descripción también abarca polinucleótidos que codifican para estos polipéptidos.

También se prefieren fragmentos de polipéptido y polinucleótido de CRCGCL caracterizados por dominios estructurales o funcionales. Realizaciones preferidas de la descripción incluyen fragmentos que comprenden hélice alfa y regiones que forma hélices alfa ("regiones alfa"), lámina beta y regiones que forman láminas beta ("regiones beta"), giro y regiones que forman giros ("regiones de giro"), hélice y regiones que forman hélices ("regiones de hélice"), regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones alfa anfipáticas, regiones beta anfipáticas, regiones flexibles, regiones que forman superficie, región de unión a sustrato y regiones de alto índice antigénico. Tal como se expone en las figuras, tales regiones preferidas incluyen regiones alfa de Garnier-Robson, regiones beta, regiones de giro y regiones de hélice, regiones alfa de Chou-Fasman, regiones beta y regiones de giro, regiones hidrófilas de Kyte-Doolittle y regiones hidrófobas, regiones anfipáticas alfa y beta de Eisenberg, regiones flexibles de Karplus-Schulz, regiones que forman superficie de Emini y regiones de alto índice antigénico de Jameson-Wolf. Se contemplan específicamente fragmentos de polipéptido de SEQ ID NO:2 que se encuentran dentro de dominios conservados (véanse la figura 3 y la tabla 1). Además, también se contemplan fragmentos de polinucleótido que codifican para estos dominios.

Otros fragmentos preferidos son fragmentos de CRCGCL biológicamente activos. Fragmentos biológicamente activos son los que presentan actividad similar, pero no necesariamente igual, a una actividad del polipéptido de CRCGCL. La actividad biológica de los fragmentos puede incluir una actividad deseada mejorada, o una disminución de la actividad no deseada.

Sin embargo, muchas secuencias de polinucleótido, tales como secuencias EST, están a disposición del público y son accesibles mediante bases de datos de secuencias. Algunas de estas secuencias están relacionadas con SEQ ID NO:1 y pueden haber estado a disposición del público antes de la concepción de la presente invención. Preferiblemente, tales polinucleótidos relacionados se excluyen específicamente del alcance de la presente invención. Enumerar cada secuencia relacionada sería engorroso. Una realización de la presente invención excluye de la presente invención el número de registro de Genbank X91553. Además, preferiblemente se excluyen de la presente invención uno o más polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos descrita mediante la fórmula general de a-b, en la que a es cualquier número entero entre 1 y 1559 de SEQ ID NO:1, b es un entero de 15 a 1573, en la que tanto a como b corresponden a las posiciones de residuos de nucleótido mostradas en SEQ ID NO:1, y en la que b es mayor que o igual a + 14.

Partes que llevan epítomos

En otro aspecto, la invención proporciona péptidos y polipéptidos que comprenden partes que llevan epítomos de los polipéptidos de la presente invención. Estos epítomos son epítomos inmunogénicos o antigénicos de los polipéptidos de la presente invención. Un "epítomo inmunogénico" se define como una parte de una proteína que provoca una respuesta de anticuerpos *in vivo* cuando el polipéptido completo de la presente invención, o fragmento del mismo, es el inmunógeno. Por otro parte, una región de un polipéptido a la que puede unirse un anticuerpo se define como un "determinante antigénico" o "epítomo antigénico." El número de epítomos inmunogénicos *in vivo* de una proteína generalmente es inferior al número de epítomos antigénicos. Véase, por ejemplo, Geysen, *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002. Sin embargo, pueden prepararse anticuerpos frente a cualquier epítomo antigénico, independientemente de si es un epítomo inmunogénico, usando métodos tales como presentación en fago. Véase por ejemplo, Petersen G. *et al.* (1995) Mol. Gen. Genet. 249:425-431. Por tanto, en la presente descripción se incluyen tanto epítomos inmunogénicos como epítomos antigénicos.

En la tabla 1 más adelante, se muestra una lista de secuencias de aminoácidos a modo de ejemplo que comprenden epítomos inmunogénicos. Se indica que la tabla 1 sólo enumera residuos de aminoácido que comprenden epítomos que se pronostica que tienen el mayor grado de antigenicidad usando el algoritmo de Jameson y Wolf, (1988) Comp. Appl. Biosci. 4:181-186. El análisis antigénico de Jameson-Wolf se realizó usando el programa informático PROTEAN, usando parámetros por defecto (versión 3.11 para Power MacIntosh, DNASTAR, Inc., 1228 South Park Street Madison, WI). La tabla 1 y las partes de los polipéptidos no enumeradas en la tabla 1 no se consideran no inmunogénicos. Los epítomos inmunogénicos de la tabla 1 son una lista a modo de ejemplo, no una lista exhaustiva, porque otros epítomos inmunogénicos no se reconocen meramente como tales por el algoritmo particular usado. Pueden determinarse rutinariamente residuos de aminoácido que comprenden otros epítomos inmunogénicos usando algoritmos similares al análisis de Jameson-Wolf o mediante pruebas *in vivo* para detectar una respuesta antigénica usando métodos conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, Geysen *et al.*, citado anteriormente; patentes estadounidenses 4.708.781; 5.194.392; 4.433.092; y 5.480.971. Tal como se muestra en la tabla 1, se encontró que SEQ ID NO:2 era antigénica en los aminoácidos: 22-29; 48-56; 62-73; 78-85; 88-95; 99-105; 118-126; 139-146; 151-169; 188-206; 208-231; 264-271; 286-293; 300-313; 317-342; 347-353; 363-369.

Se indica particularmente que las secuencias de aminoácidos de la tabla 1 comprenden epítomos inmunogénicos. La tabla 1 enumera sólo los residuos críticos de epítomos inmunogénicos determinados mediante el análisis de Jameson-Wolf. Por tanto, pueden añadirse residuos flanqueantes adicionales en o bien los extremos N-terminal, C-terminal, o bien ambos extremos N- y C-terminales a las secuencias de la tabla 1 para generar un polipéptido que lleva epítomos.

Por tanto, los epítomos inmunogénicos de la tabla 1 pueden incluir residuos de aminoácido en N-terminales o C-terminales adicionales. Los residuos de aminoácido flanqueantes adicionales pueden ser secuencias N-terminales y/o C-terminales flanqueantes contiguas de los polipéptidos de la presente invención, secuencias de polipéptidos heterólogos, o pueden incluir tanto secuencias flanqueantes contiguas de los polipéptidos de la presente invención como secuencias de polipéptidos heterólogos. Los polipéptidos de la presente descripción que comprenden epítomos inmunogénicos o antigénicos tienen al menos 7 residuos de aminoácido de longitud. "Al menos" significa que un polipéptido que comprende un epítomo inmunogénico o antigénico puede tener 7 residuos de aminoácido de longitud o cualquier número entero entre 7 aminoácidos y el número de residuos de aminoácido de los polipéptidos de longitud completa de la invención. Polipéptidos preferidos que comprenden epítomos inmunogénicos o antigénicos tienen al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 ó 100 residuos de aminoácido de longitud. Sin embargo, se indica que en la presente descripción se incluyen todos y cada uno número entero entre 7 y el número de residuos de aminoácido del polipéptido de longitud completa.

Los fragmentos que llevan epítomos inmuno y antigénicos pueden especificarse mediante o bien el número de residuos de aminoácido contiguos, tal como se describió anteriormente, o bien especificarse adicionalmente mediante las posiciones N-terminales y C-terminales de estos fragmentos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En la descripción se incluye cada combinación de una posición N-terminal y C-terminal que un fragmento de, por ejemplo, al menos 7 o al menos 15 residuos de aminoácido contiguos de longitud podría ocupar en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. De nuevo, "al menos 7 residuos de aminoácido contiguos de longitud" significa 7 residuos de aminoácido de longitud o cualquier número entero entre 7 aminoácidos y el número de residuos de aminoácido del polipéptido de longitud completa de la presente invención. Específicamente, en la presente descripción se incluyen todos y cada uno número entero entre 7 y el número de residuos de aminoácido del polipéptido de longitud completa.

Los polipéptidos que llevan epítomos inmunogénicos y antigénicos de la invención son útiles, por ejemplo, para preparar anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la invención, y en inmunoensayos para detectar los polipéptidos de la presente invención. Los anticuerpos son útiles, por ejemplo, en la purificación por afinidad de los polipéptidos de la presente invención. Los anticuerpos también pueden usarse rutinariamente en una variedad de inmunoensayos cualitativos o cuantitativos, específicamente para los polipéptidos de la presente invención usando métodos conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2ª ed. 1988).

Los polipéptidos que llevan epítomos de la presente invención pueden producirse mediante cualquier medio convencional para preparar polipéptidos incluyendo métodos sintéticos y recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden sintetizarse péptidos que llevan epítomos usando métodos conocidos de síntesis química. Por ejemplo, Houghten ha descrito un método sencillo para la síntesis de grandes números de péptidos, tales como 10-20 mgs de 248 péptidos de 13 residuos individuales y distintos que representan variantes de aminoácidos individuales de un segmento del polipéptido HA1, todos los cuales se prepararon y caracterizaron (mediante estudios de unión de tipo ELISA) en menos de cuatro semanas (Houghten, R. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135 (1985)). Este procedimiento de "síntesis simultánea de múltiples péptidos (SMPS)" se describe además en la patente estadounidense n.º 4.631.211 concedida a Houghten y colaboradores (1986). En este procedimiento, las resinas individuales para la síntesis en fase sólida de diversos péptidos están contenidas en paquetes separados permeables al disolvente, lo que permite el uso óptimo de las muchas etapas repetitivas idénticas implicadas en los métodos en fase sólida. Un procedimiento completamente manual permite que se realicen simultáneamente 500-1000 o más síntesis (Houghten *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. 82:5131-5135 a 5134).

Los polipéptidos que llevan epítomos de la presente invención se usan para inducir anticuerpos según métodos bien conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, inmunización *in vivo*, inmunización *in vitro* y métodos de presentación en fago; véase, por ejemplo, Sutcliffe, *et al.*, citado anteriormente; Wilson, *et al.*, citado anteriormente, y Bittle, *et al.* (1985) J. Gen. Virol. 66:2347-2354. Si se usa inmunización *in vivo*, los animales pueden inmunizarse con péptido libre; sin embargo, el título de anticuerpos anti-péptido puede reforzarse acoplado el péptido a un portador macromolecular, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) o toxoide tetánico. Por ejemplo, pueden acoplarse péptidos que contienen residuos de cisteína a un portador usando un ligador tal como éster de maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), mientras que otros péptidos pueden acoplarse a portadores usando un agente de unión más general tal como glutaraldehído. Se inmunizan animales tales como conejos, ratas y ratones con o bien péptidos libres o bien péptidos acoplados a portadores, por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal y/o intradérmica de emulsiones que contienen aproximadamente 100 µg de péptido o proteína portadora y adyuvante de Freund. Pueden necesitarse varias inyecciones de refuerzo, por ejemplo, a intervalos de aproximadamente dos semanas, para proporcionar un título útil de anticuerpo anti-péptido que puede detectarse, por ejemplo, mediante ensayo de ELISA usando péptido libre adsorbido a una superficie sólida. El título de los anticuerpos anti-péptido en suero de un animal inmunizado puede aumentarse mediante la selección de anticuerpos anti-péptido, por ejemplo, mediante absorción al péptido en un soporte sólido y elución de los anticuerpos seleccionados según métodos bien conocidos en la técnica.

Tal como un experto en la técnica apreciará, y tal como se trató anteriormente, los polipéptidos de la presente invención que comprenden un epítomo inmunogénico o antigénico pueden fusionarse con secuencias de polipéptidos heterólogos. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o partes del mismo (CH1, CH2, CH3, cualquier combinación de los mismos incluyendo dominios enteros y partes de los mismos) dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación, y muestran un aumento de la semivida *in vivo*. Esto se ha demostrado, por ejem-

plo, para proteínas quiméricas que consisten en los primeros dos dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas de mamíferos; véanse, por ejemplo, el documento EPA 0.394.827; Traunecker *et al.* (1988) Nature 331:84-86. Las proteínas de fusión que tienen una estructura dimérica unida por disulfuros debido a la parte de IgG también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas que polipéptidos monoméricos o fragmentos de los mismos solos; véase, por ejemplo, Fountoulakis *et al.* (1995) J. Biochem. 270:3958-3964. También pueden recombinarse ácidos nucleicos que codifican para los epítomos anteriores con un gen de interés como etiqueta de epítomo para ayudar en la detección y purificación del polipéptido expresado.

10 Anticuerpos

La presente invención se refiere además a anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente invención. Los anticuerpos de la presente invención incluyen IgG (incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluyendo IgA1 e IgA2), IgD, IgE, o IgM e IgY. Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" (Ac) pretende incluir anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos completos de cadena sencilla, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Lo más preferiblemente, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos humanos de la presente invención incluyendo, pero sin limitarse a, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos por disulfuros (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio o bien V_L o bien V_H. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal incluyendo aves y mamíferos. Preferiblemente, los anticuerpos son humanos, murinos, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de caballo o de pollo.

Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígenos, incluyendo anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la/las región/región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con el total o parte de lo siguiente: región de bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. En la invención también se incluye cualquier combinación de región/región(es) variable(s) y región de bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. La presente invención incluye además anticuerpos quiméricos, humanizados y monoclonales y policlonales humanos que se unen específicamente a los polipéptidos de la presente invención. La presente invención incluye además anticuerpos que son anti-idiotípicos frente a los anticuerpos de la presente invención.

Los anticuerpos de la presente invención pueden ser monoespecíficos, biespecíficos, trispecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítomos de un polipéptido de la presente invención o pueden ser específicos para tanto un polipéptido de la presente invención así como para composiciones heterólogas, tales como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido; véanse, por ejemplo, el documento WO 93/17715; el documento WO 92/08802; el documento WO 91/00360; el documento WO 92/05793; Tutt, A. *et al.* (1991) J. Immunol. 147:60-69; las patentes estadounidenses 5.573.920, 4.474.893, 5.601.819, 4.714.681, 4.925.648; Kostelny, S.A. *et al.* (1992) J. Immunol. 148:1547-1553.

Los anticuerpos de la presente invención pueden describirse o especificarse en cuanto a el/los epítomo(s) o la/las parte(s) de un polipéptido de la presente invención que se reconocen o se unen específicamente por el anticuerpo. El/los epítomo(s) o la(s) parte(s) de polipéptidos puede(n) especificarse tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, mediante posiciones N-terminales y C-terminales, mediante el tamaño en residuos de aminoácido contiguos, o enumerados en las tablas y figuras. También pueden excluirse anticuerpos que se unen específicamente a cualquier epítomo o polipéptido de la presente invención. Por tanto, la presente invención incluye anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de la presente invención, y permite la exclusión de los mismos.

Los anticuerpos de la presente invención también pueden describirse o especificarse en cuanto a su reactividad cruzada. Se incluyen anticuerpos que no se unen a ningún otro análogo, ortólogo u homólogo de los polipéptidos de la presente invención. También se incluyen en la presente invención anticuerpos que no se unen a polipéptidos con menos del 95%, menos del 90%, menos del 85%, menos del 80%, menos del 75%, menos del 70%, menos del 65%, menos del 60%, menos del 55% y menos del 50% de identidad (tal como se calculó usando métodos conocidos en la técnica y descritos en el presente documento) con un polipéptido de la presente descripción. Además, se incluyen en la presente descripción anticuerpos que sólo se unen a polipéptidos codificados por polinucleótidos que hibridan con un polinucleótido de la presente invención en condiciones de hibridación rigurosas (tal como se describe en el presente documento). También se describen o especifican los anticuerpos de la presente invención en cuanto a su afinidad de unión. Afinidades de unión preferidas incluyen aquellas con una constante de disociación K_d menor de 5X10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 5X10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M, 5X10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M, 5X10⁻⁹ M, 10⁻⁹ M, 5X10⁻¹⁰ M, 10⁻¹⁰ M, 5X10⁻¹¹ M, 10⁻¹¹ M, 5X10⁻¹² M, 10⁻¹² M, 5X10⁻¹³ M, 10⁻¹³ M, 5X10⁻¹⁴ M, 10⁻¹⁴ M, 5X10⁻¹⁵ M y 10⁻¹⁵ M.

Los anticuerpos de la presente invención tienen usos que incluyen, pero no se limitan a, métodos conocidos en la técnica para purificar, detectar y dirigir los polipéptidos de la presente invención incluyen métodos de diagnóstico y terapéuticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, los anticuerpos tienen uso en inmunoensayos para medir cualitativa y cuantitativamente niveles de los polipéptidos de la presente invención en muestras biológicas; véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

Los anticuerpos de la presente invención pueden usarse o bien solos o bien en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden fusionarse además de manera recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo

N- o C-terminal o conjugarse químicamente (incluyendo conjugaciones de manera covalente y no covalente) a polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse de manera recombinante a moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras tales como polipéptidos heterólogos, fármacos o toxinas; véanse, por ejemplo, el documento WO 92/08495; el documento
 5 WO 91/14438; el documento WO 89/12624; la patente estadounidense 5.314.995; y el documento EP 0 396 387.

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un polipéptido de la presente invención o un fragmento antigénico del mismo puede administrarse a un animal con el fin de inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales. Pueden prepararse
 10 anticuerpos monoclonales usando una gama de técnicas conocidas en la técnica incluyendo el uso de tecnología de hibridoma y recombinante; véanse, por ejemplo, Harlow *et al.*, ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). Pueden producirse fragmentos Fab y F(ab')₂ mediante escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos
 15 F(ab')₂).

Alternativamente, pueden producirse anticuerpos de la presente invención mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante o mediante química sintética usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse usando diversos métodos de presentación en fago conocidos en la técnica.
 20 En los métodos de presentación en fago, se presentan dominios de anticuerpos funcionales en la superficie de una partícula de fago que porta secuencias de polinucleótido que los codifican. Se seleccionan fagos con una propiedad de unión deseada a partir de un repertorio o una biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humanos o murinos) seleccionando directamente con antígeno, normalmente antígeno unido a o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos normalmente son fagos filamentosos incluyendo fd y M13 con dominios de anticuerpos Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuros fusionados de manera recombinante a o bien el
 25 gen III del fago o bien a la proteína del gen VIII. Ejemplos de métodos de presentación en fago que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente invención incluyen los dados a conocer en Brinkman U. *et al.* (1995) J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames, R.S. *et al.* (1995) J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough, C.A. *et al.* (1994) Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic, L. *et al.* (1997) Gene 187 9-18; Burton, D.R. *et al.* (1994) Advances in
 30 Immunology 57:191-280; el documento PCT/GB91/01134; el documento WO 90/02809; el documento WO 91/10737; el documento WO 92/01047; el documento WO 92/18619; el documento WO 93/11236; el documento WO 95/15982; el documento WO 95/20401; y las patentes estadounidenses 5.698.426, 5.223.409, 5.403.484, 5.580.717, 5.427.908, 5.750.753, 5.821.047, 5.571.698, 5.427.908, 5.516.637, 5.780.225, 5.658.727 y 5.733.743.

Tal como se describió en las referencias anteriores, tras la selección de fagos, pueden aislarse las regiones que codifican el anticuerpo del fago y usarse para generar anticuerpos completos; incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras y bacterias. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ usando métodos conocidos en la
 40 técnica tales como los dados a conocer en el documento WO 92/22324; Mullinax, R.L. *et al.* (1992) BioTechniques 12(6):864-869; y Sawai, H. *et al.* (1995) AJRI 34:26-34; y Better, M. *et al.* (1988) Science 240:1041-1043.

Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fv de cadena sencilla y anticuerpos incluyen las descritas en las patente estadounidenses 4.946.778 y 5.258.498; Huston *et al.* (1991) Methods in Enzymology 203:46-88; Shu, L. *et al.* (1993) PNAS 90:7995-7999; y Skerra, A. *et al.* (1988) Science 240:1038-1040. Para algunos usos, incluyendo el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos; véanse por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4:214 (1986); Gillies, S.D. *et al.* (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; y la patente estadounidense 5.807.715. Pueden humanizarse anticuerpos
 50 usando una variedad de técnicas incluyendo injerto de CDR (documento EP 0 239 400; documento WO 91/09967; patentes estadounidenses 5.530.101 y 5.585.089), inactivación ("veneering") o recubrimiento (documento EP 0 592 106; documento EP 0 519 596; Padlan E.A., (1991) Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka G.M. *et al.* (1994) Protein Engineering 7(6):805-814; Roguska M.A. *et al.* (1994) PNAS 91:969-973) y transposición de cadenas (patente estadounidense 5.565.332). Pueden prepararse anticuerpos humanos mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica incluyendo métodos de presentación en fago descritos anteriormente; véanse también las patentes
 55 estadounidenses 4.444.887, 4.716.111, 5.545.806 y 5.814.318; y el documento WO 98/46645.

En la presente invención se incluyen además anticuerpos fusionados de manera recombinante o conjugados químicamente (incluyendo conjugaciones de manera tanto covalente como no covalente) a un polipéptido de la presente
 60 invención. Los anticuerpos pueden ser específicos para antígenos distintos de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos para dirigir los polipéptidos de la presente invención a tipos de células particulares, o bien *in vitro* o bien *in vivo*, fusionando o conjugando los polipéptidos de la presente invención a anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particulares. Los anticuerpos fusionados o conjugados a los polipéptidos de la presente invención también pueden usarse en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación
 65 usando métodos conocidos en la técnica; véanse por ejemplo, Harbor *et al.* citado anteriormente y el documento WO 93/21232; el documento EP 0 439 095; Naramura, M. *et al.* (1994) Immunol. Lett. 39:91-99; patente estadounidense 5.474.981; Gillies, S.O. *et al.* (1992) PNAS 89:1428-1432; Fell, H.P. *et al.* (1991) J. Immunol. 146:2446-2452.

La presente invención incluye además composiciones que comprenden los polipéptidos de la presente invención fusionados o conjugados a dominios de anticuerpos distintos de las regiones variables. Por ejemplo, los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse a una región Fc de anticuerpo, o parte de la misma. La parte del anticuerpo fusionada a un polipéptido de la presente invención puede comprender la región de bisagra, el dominio CH1, dominio CH2 y dominio CH3 o cualquier combinación de los dominios completos o partes de los mismos. Los polipéptidos de la presente invención pueden fusionarse o conjugarse a las partes de anticuerpos anteriores para aumentar la semivida *in vivo* de los polipéptidos o para su uso en inmunoensayos usando métodos conocidos en la técnica. Los polipéptidos también pueden fusionarse o conjugarse a las partes de anticuerpos anteriores para formar multímeros. Por ejemplo, las partes Fc fusionadas a los polipéptidos de la presente invención pueden formar dímeros mediante enlaces disulfuro entre las partes Fc. Pueden prepararse formas multiméricas superiores fusionado los polipéptidos a partes de IgA e IgM. Se conocen en la técnica métodos para fusionar o conjugar los polipéptidos de la presente invención a partes de anticuerpos; véanse por ejemplo, las patentes estadounidenses 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.112.946; el documento EP 0 307 434, el documento EP 0 367 166; el documento WO 96/04388, el documento WO 91/06570; Ashkenazi, A. *et al.* (1991) PNAS 88:10535-10539; Zheng, X.X. *et al.* (1995) J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil, H. *et al.* (1992) PNAS 89:11337-11341.

Los anticuerpos de la invención pueden actuar como agonistas o antagonistas de los polipéptidos de la presente invención. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden alterar las interacciones receptor/ligando con los polipéptidos de la invención o bien parcialmente o bien completamente. Se dan a conocer anticuerpos específicos de receptor y anticuerpos específicos de ligando. Se dan a conocer anticuerpos específicos de receptor que no evitan la unión del ligando pero evitan la activación del receptor. La activación del receptor (es decir, señalización) puede determinarse mediante técnicas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica. También se incluyen anticuerpos específicos de receptor tanto para evitar la unión del ligando como para evitar la activación del receptor. Asimismo, se incluyen anticuerpos neutralizantes que se une el ligando y evitan la unión del ligando al receptor, así como anticuerpos que unen el ligando, evitando de ese modo la activación del receptor, pero no evitan que el ligando se una al receptor. Se incluyen además anticuerpos que activan el receptor. Estos anticuerpos pueden actuar como agonistas para o bien todas o bien menos de todas las actividades biológicas afectadas por la activación de receptores mediada por ligando. Los anticuerpos pueden especificarse como agonistas o antagonistas para actividades biológicas que comprenden actividades específicas dadas a conocer en el presente documento. Puede prepararse los agonistas de anticuerpos anteriores usando métodos conocidos en la técnica; véanse por ejemplo, el documento WO 96/40281; la patente estadounidense 5.811.097; Deng, B. *et al.* (1998) Blood 92 (6):1981-1988; Chen, Z. *et al.* (1998) Cancer Res. 58(16):3668-3678; Harrop, J.A. *et al.* (1998) J. Immunol. 161(4): 1786-1794; Zhu, Z. *et al.* (1998) Cancer Res. 58(15):3209-3214; Yoon, D.Y. *et al.* (1998) J. Immunol. 160(7):3170-3179; Prat, M. *et al.* (1998) J. Cell. Sci. 111(Pt2):237-247; Pitard, V. *et al.* (1997) J. Immunol. Methods 205(2):177-190; Liautard, J. *et al.* (1997) Cytokine 9(4):233-241; Carlson, N.G. *et al.* (1997) J. Biol. Chem. 272(17):11295-11301; Taryman, R.E. *et al.* (1995) Neuron 14(4):755-762; Muller, Y.A. *et al.* (1998) Structure 6(9):1153-1167; Bartunek, P. *et al.* (1996) Cytokine 8(1): 14-20.

Proteínas de fusión

Puede usarse cualquier polipéptido de CRCGCL para generar proteínas de fusión. Por ejemplo, el polipéptido de CRCGCL, cuando se fusiona a una segunda proteína, puede usarse como etiqueta antigénica. Pueden usarse anticuerpos generados contra el polipéptido de CRCGCL para detectar indirectamente la segunda proteína mediante la unión al CRCGCL. Además, debido a que las proteínas secretadas seleccionan como diana ubicaciones celulares basándose en señales de tráfico, pueden usarse los polipéptidos de CRCGCL como molécula de direccionamiento una vez fusionada a otras proteínas.

Ejemplos de dominios que pueden fusionarse a polipéptidos de CRCGCL incluyen no sólo secuencias señal heterólogas, sino también regiones funcionales heterólogas. La fusión no necesita necesariamente ser directa, sino que puede producirse a través de secuencias ligadoras.

Además, las proteínas de fusión también pueden modificarse por ingeniería genética para mejorar las características del polipéptido de CRCGCL. Por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N-terminal del polipéptido de CRCGCL para mejorar la estabilidad y persistencia durante la purificación de la célula huésped o posterior manejo y almacenamiento. Además, pueden añadirse restos peptídicos al polipéptido de CRCGCL para facilitar la purificación. Tales regiones pueden eliminarse antes de la preparación final del polipéptido de CRCGCL. La adición de los restos peptídicos para facilitar el manejo de polipéptidos son técnicas familiares y de rutina en la técnica.

Además, pueden combinarse polipéptidos de CRCGCL, incluyendo fragmentos, y específicamente epítopos, con partes del dominio constante de inmunoglobulinas (IgG), dando como resultado polipéptidos quiméricos. Estas proteínas de fusión facilitan la purificación y muestran un aumento de la semivida *in vivo*. Un ejemplo notificado describe proteínas quiméricas que consisten en los primeros dos dominios del polipéptido CD4 humano y diversos dominios de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas de mamíferos (documento EP A 394.827; Traunecker *et al.*, Nature 331:84-86 (1988)). Las proteínas de fusión que tienen estructuras diméricas unidas por disulfuros (debido a la IgG) también pueden ser más eficaces en la unión y neutralización de otras moléculas, que la proteína secretada monomérica o fragmento de proteína solo (Fountoulakis *et al.*, J. Biochem. 270:3958-3964 (1995)).

De manera similar, el documento EP-A-O 464 533 (equivalente canadiense 2045869) da a conocer proteínas de fusión que comprenden diversas partes de la región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es beneficiosa en la terapia y el diagnóstico, y por tanto puede dar como resultado, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento EP-A 0232 262). Alternativamente, se desearía la delección de la parte Fc tras haberse expresado, detectado y purificado la proteína de fusión. Por ejemplo, la parte Fc puede dificultar la terapia y el diagnóstico si se usa la proteína de fusión como antígeno para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, se han fusionado proteínas humanas, tales como hIL-5, con partes Fc para el fin de ensayos de selección de alto rendimiento para identificar antagonistas de hIL-5 (véanse, D. Bennett *et al.*, J. Molecular Recognition 8:52-58 (1995); K. Johanson *et al.*, J. Biol. Chem. 270:9459-9471 (1995)).

Además, pueden fusionarse los polipéptidos de CRCGCL a secuencias marcadoras, tales como un péptido que facilita la purificación de CRCGCL. En realizaciones preferidas, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Tal como se describe en Gentz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otra etiqueta de péptido útil para la purificación, la etiqueta "HA", corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina del virus de la gripe (Wilson *et al.*, Cell 37: 767 (1984)).

Por tanto, cualquiera de las fusiones anteriores puede modificarse por ingeniería genética usando los polinucleótidos o los polipéptidos de CRCGCL.

Vectores, células huésped y producción de proteínas

La presente invención también se refiere a vectores que contienen el polinucleótido de CRCGCL, a células huésped y a la producción de polipéptidos mediante técnicas recombinantes. El vector puede ser, por ejemplo, un vector de fago, de plásmido, viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o de replicación defectuosa. En este último caso, la propagación viral generalmente se producirá sólo en células huésped de complementación.

Los polinucleótidos de CRCGCL pueden unirse a un vector que contiene un marcador seleccionable para su propagación en un huésped. Generalmente, se introduce un vector de plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, este puede empaquetarse *in vitro* usando una línea celular de empaquetamiento apropiada y luego transducirse en las células huésped.

El inserto de polinucleótido de CRCGCL debe estar operativamente unido a un promotor apropiado, tal como el promotor PL de fago lambda, los promotores lac, trp, phoA y tac de *E. coli*, los promotores tempranos y tardíos de SV40 y promotores de LTR retrovirales, para nombrar unos pocos. El experto conocerá otros promotores adecuados. Las construcciones de expresión contendrán además sitios para la iniciación, la terminación de la transcripción y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos expresados por las construcciones preferiblemente incluirá un codón de iniciación de la traducción en el inicio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) ubicado apropiadamente al final del polipéptido que va a traducirse.

Tal como se indica, los vectores de expresión preferiblemente incluirán al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, resistencia a G418 o neomicina para el cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivar en *E. coli* y otras bacterias. Ejemplos representativos de huéspedes apropiados incluyen, pero sin limitarse a, células bacterianas, tales como *E. coli*, células de *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levaduras; célula de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como células CHO, COS, 293 y de melanoma de Bowes; y células vegetales. En la técnica se conocen medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped anteriormente descritas.

Entre los vectores preferidos para su uso en bacterias se incluyen pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles de QIAGEN, Inc.; vectores pBluescript, vectores Phagescript, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles de Stratagene Cloning Systems, Inc.; y ptre99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles de Pharmacia Biotech, Inc. Entre los vectores eucariotas preferidos están pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia. Otros vectores adecuados resultarán evidentes para el experto.

La introducción de la construcción en la célula huésped puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology (1986). Se contempla específicamente que los polipéptidos de CRCGCL pueden, de hecho, expresarse por una célula huésped que carece de un vector recombinante.

Pueden recuperarse y purificarse polipéptidos de CRCGCL a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromato-

grafía de afinidad, cromatografía con hidroxilapatita y cromatografía con lectinas. Lo más preferiblemente, se emplea cromatografía de líquidos de alta resolución (“HPLC”) para la purificación.

También pueden recuperarse polipéptidos de CRCGCL, y preferiblemente la forma secretada, a partir de: productos purificados de fuentes naturales, incluyendo líquidos corporales, tejidos y células, ya estén directamente aislados o cultivados; productos de procedimientos de síntesis química; y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un huésped procariota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levaduras, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de CRCGCL pueden estar glicosilados o pueden no estar glicosilados. Además, los polipéptidos de CRCGCL también incluyen un residuo de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de procesos mediados por el huésped. Por tanto, se sabe bien en la técnica que la metionina N-terminal codificada por el codón de iniciación de la traducción generalmente se elimina con alta eficacia de cualquier proteína tras la traducción en todas las células eucariotas. Mientras que la metionina N-terminal en la mayoría de proteínas también se elimina eficazmente en la mayoría de procariotas, para algunas proteínas, este proceso de eliminación procariota es ineficaz, dependiendo de la naturaleza del aminoácido al cual se une de manera covalente la metionina N-terminal.

Además de abarcar células huésped que contienen las construcciones de vector tratados en el presente documento, la invención también abarca células huésped primarias, secundarias e inmortalizadas de origen de vertebrados, particularmente de origen de mamíferos, que se han modificado por ingeniería genética para delecionar o sustituir material genético endógeno (por ejemplo, secuencia que codifica para CRCGCL), y/o para incluir material genético (por ejemplo, secuencias de polinucleótido heterólogas) que está operativamente asociado con polinucleótidos de CRCGCL de la invención, y que activa, altera y/o amplifica polinucleótidos de CRCGCL endógenos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas conocidas en la técnica para asociar operativamente regiones de control heterólogas (por ejemplo, promotor y/o potenciador) y secuencias de polinucleótido de CRCGCL endógenas mediante recombinación homóloga (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.641.670, expedida el 24 de junio de 1997; publicación internacional n.º WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; publicación internacional n.º WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Koller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra *et al.*, Nature 342:435-438 (1989).

Además, los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse químicamente usando técnicas conocidas en la técnica (por ejemplo, véanse Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W.H. Freeman & Co., N.Y., y Hunkapiller, M., *et al.*, 1984, Nature 310:105-111). Por ejemplo, puede sintetizarse un péptido que corresponde a un fragmento de los polipéptidos de CRCGCL de la invención mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Además, si se desea, pueden introducirse aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos como sustitución o adición en la secuencia de polinucleótido de CRCGCL. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero sin limitarse a, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -aminoisobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Aib, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, b-alanina, fluoro-aminoácidos, aminoácidos de diseño tales como b-metil-aminoácidos, Ca-metil-aminoácidos, Na-metil-aminoácidos, y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (dextrorrotatorio) o L (levorrotatorio).

La invención abarca polipéptidos de CRCGCL que se modifican diferencialmente durante o tras la traducción, por ejemplo, mediante glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/de bloqueo conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Cualquier modificación química numerosa puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo pero sin limitarse a, escisión química específica mediante bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8, NaBH₄; acetilación, formilación, oxidación, reducción; síntesis metabólica en presencia de tunicamicina; etc.

Modificaciones postransduccionales adicionales abarcadas por la invención incluyen, por ejemplo, cadenas de hidratos de carbono unidas a N-unidas u O-unidas, procesamiento de los extremos N-terminal o C-terminal), unión de restos químicos a la estructura principal de aminoácido, modificaciones químicas de cadenas de hidratos de carbono N-unidas u O-unidas, y adición o delección de un residuo de metionina N-terminal como resultado de la expresión en células huésped procariotas. Los polipéptidos también pueden modificarse con un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente, isotópico o de afinidad para permitir la detección y aislamiento de la proteína.

También se proporcionan mediante la invención derivados químicamente modificados de CRCGCL que pueden proporcionar ventajas adicionales tales como aumento de la solubilidad, estabilidad y del tiempo de circulación del polipéptido, o disminución de la inmunogenicidad (véase la patente estadounidense n.º 4.179.337). Los restos químicos para la derivatización pueden seleccionarse de polímeros solubles en agua tales como polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico) y similares. Los polipéptidos pueden modificarse en posiciones al azar dentro de la molécula, o en posiciones predeterminadas dentro de la molécula y pueden incluir uno, dos, tres o más restos químicos unidos.

El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificado o no ramificado. Para el polietilenglicol, el peso molecular preferido es de entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100 kDa (indicando el término “aproximadamente” que en preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular declarado) para facilitar su manejo y fabricación. Pueden usarse otros tamaños, dependiendo del

perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, los efectos, si existe alguno, sobre la actividad biológica, la facilidad de manejo, el grado o la falta de antigenicidad y otros efectos conocidos del polietilenglicol para una proteína o análogo terapéutico).

5 Las moléculas de polietilenglicol (u otros restos químicos) deben unirse a la proteína con la consideración de los efectos sobre dominios funcionales o antigénicos de la proteína. Existe varios métodos de unión disponibles para los expertos en la técnica, por ejemplo, el documento EP 0 401 384, (acoplamiento de PEG a G-CSF), véase también Malik *et al.*, Exp. Hematol. 20:1028-1035 (1992) (que notifica la pegilación de GM-CSF usando cloruro de tresilo). Por ejemplo, el polietilenglicol puede unirse covalentemente a través de residuos de aminoácido por medio de un
10 grupo reactivo, tal como, un grupo amino o carboxilo libre. Grupos reactivos son aquellos a los que puede unirse una molécula de polietilenglicol activada. Los residuos de aminoácido que tienen un grupo amino libre pueden incluir residuos de lisina y los residuos de aminoácido N-terminales; aquellos que tienen un grupo carboxilo libre pueden incluir residuos de ácido aspártico, residuos de ácido glutámico y el residuo de aminoácido C-terminal. También pueden usarse grupos sulfhidrilo como grupo reactivo para unir las moléculas de polietilenglicol. Se prefiere para fines
15 terapéuticos la unión en un grupo amino, tal como la unión en el extremo N-terminal o el grupo lisina.

Pueden desearse específicamente proteínas químicamente modificadas en el extremo N-terminal. Usando polietilenglicol como ilustración de la presente composición, puede seleccionarse de una variedad de moléculas de polietilenglicol (por peso molecular, ramificación, etc.), la proporción de moléculas de polietilenglicol con respecto a
20 moléculas de proteína (o péptido) en la mezcla de reacción, el tipo de reacción de pegilación que va a realizarse, y el método de obtención de la proteína pegilada de manera N-terminal. El método de obtención de la preparación pegilada de manera N-terminal (es decir, separando este resto de otros restos monopegilados si es necesario) puede ser mediante purificación del material pegilado de manera N-terminal a partir de una población de moléculas de proteína pegiladas. Pueden conseguirse proteínas selectivas químicamente modificadas en la modificación en el extremo N-
25 terminal mediante alquilación reductora que se aprovecha de la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (lisina frente al extremo N-terminal) disponibles para derivatización en una proteína particular. En las condiciones de reacción apropiadas, se logra una derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N-terminal con un polímero que contiene grupo carbonilo.

30 Los polipéptidos de CRCGCL de la invención pueden estar en monómeros o multímeros (es decir, dímeros, trímeros, tetrameros y multímeros superiores). Por consiguiente, la presente invención se refiere a monómeros y multímeros de los polipéptidos de CRCGCL de la invención, a su preparación y a composiciones (preferiblemente, composiciones farmacéuticas) que los contienen. En realizaciones específicas, los polipéptidos de la invención son monómeros, dímeros, trímeros o tetrameros. En realizaciones adicionales, los multímeros de la invención son al menos dímeros, al
35 menos trímeros o al menos tetrameros.

Los multímeros abarcados por la invención pueden ser homómeros o heterómeros. Tal como se usa en el presente documento, el término homómero se refiere a un multímero que contiene sólo polipéptidos de CRCGCL de la invención (incluyendo fragmentos, variantes, variantes de corte y empalme de CRCGCL, y proteínas de fusión, tal como se describe en el presente documento). Estos homómeros pueden contener polipéptidos de CRCGCL que tienen
40 secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes. En una realización específica, un homómero de la invención es un multímero que contiene sólo polipéptidos de CRCGCL que tienen una secuencia de aminoácidos idéntica. En otra realización específica, un homómero de la invención es un multímero que contiene polipéptidos de CRCGCL que tienen diferentes secuencias de aminoácidos. En realizaciones específicas, el multímero de la invención es un homodímero
45 (por ejemplo, que contiene polipéptidos de CRCGCL que tienen secuencias de aminoácidos idénticas o diferentes) o un homotrímero (por ejemplo, que contiene polipéptidos de CRCGCL que tienen secuencias de aminoácidos idénticas y/o diferentes). En realizaciones adicionales, el multímero homomérico de la invención es al menos un homodímero, al menos un homotrímero, o al menos un homotetramero.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término heterómero se refiere a un multímero que contiene uno o más polipéptidos heterólogos (es decir, polipéptidos de diferentes proteínas) además de los polipéptidos de CRCGCL de la invención. En una realización específica, el multímero de la invención es un heterodímero, un heterotrímero o un heterotetramero. En realizaciones adicionales, el multímero homomérico de la invención es al menos un homodímero,
55 al menos un homotrímero o al menos un homotetramero.

Los multímeros de la invención pueden ser el resultado de asociaciones hidrófobas, hidrófilas, iónicas y/o covalentes y/o pueden estar unidos indirectamente, mediante, por ejemplo, la formación de liposomas. Por tanto, en una realización, se forman multímeros de la invención, tales como, por ejemplo, homodímeros o homotrímeros, cuando
60 los polipéptidos de la invención se ponen en contacto entre sí en disolución. En otra realización, se forman heteromultímeros de la invención, tales como, por ejemplo, heterotrímeros o heterotetrameros, cuando los polipéptidos de la invención ponen en contacto anticuerpos con los polipéptidos de la invención (incluyendo anticuerpos frente a la secuencia de polipéptido heterólogo en una proteína de fusión de la invención) en disolución. En otras realizaciones, se forman multímeros de la invención mediante asociaciones covalentes con y/o entre los polipéptidos de CRCGCL de la invención. Tales asociaciones covalentes pueden implicar uno o más residuos de aminoácido contenidos en la
65 secuencia de polipéptido (por ejemplo, la mencionada en SEQ ID NO:2, o contenida en el polipéptido codificado por el clon HTAEK53). En un caso, las asociaciones covalentes son reticulaciones entre residuos de cisteína ubicados dentro de las secuencias de polipéptido que interactúan en el polipéptido nativo (es decir, que se produce de manera natural). En otro caso, las asociaciones covalentes son la consecuencia de manipulación química o recombinante.

Alternativamente, tales asociaciones covalentes pueden implicar uno o más residuos de aminoácido contenidos en la secuencia de polipéptido heteróloga en una proteína de fusión de CRCGCL. En un ejemplo, las asociaciones covalentes son entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión de la invención (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.478.925). En un ejemplo específico, las asociaciones covalentes son entre la secuencia heteróloga contenida en una proteína de fusión CRCGCL-Fc de la invención (tal como se describe en el presente documento). En otro ejemplo específico, las asociaciones covalentes de proteínas de fusión de la invención son entre la secuencia de polipéptido heteróloga de otro miembro de ligando/receptor de la familia de TNF que puede formar multímeros covalentemente asociados, tal como, por ejemplo, osteoprotegerina (véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 98/49305).

Los multímeros de la invención pueden generarse usando técnicas químicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos que se desea que estén contenidos en los multímeros de la invención pueden reticularse químicamente usando moléculas ligadoras y técnicas de optimización de la longitud de moléculas ligadoras conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.478.925). Adicionalmente, pueden generarse multímeros de la invención usando técnicas conocidas en la técnica para formar una o más reticulaciones entre moléculas entre los residuos de cisteína ubicados dentro de la secuencia de los polipéptidos que se desea que estén contenidos en el multímero (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.478.925). Además, los polipéptidos de la invención pueden modificarse rutinariamente mediante la adición de cisteína o biotina al extremo C-terminal o N-terminal del polipéptido y pueden aplicarse técnicas conocidas en la técnica para generar multímeros que contienen uno o más de estos polipéptidos modificados (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.478.925). Adicionalmente, pueden aplicarse técnicas conocidas en la técnica para generar liposomas que contienen los componentes de polipéptido que se desea que estén contenidos en el multímero de la invención (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.478.925).

Alternativamente, pueden generarse multímeros de la invención usando técnicas de ingeniería genética conocidas en la técnica. En una realización, se producen polipéptidos contenidos en multímeros de la invención de manera recombinante usando tecnología de proteínas de fusión descrita en el presente documento o conocida de otro modo en la técnica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.478.925). En una realización específica, se generan polinucleótidos que codifican para un homodímero de la invención ligando una secuencia de polinucleótido que codifica para un polipéptido de la invención a una secuencia que codifica para un polipéptido ligador y luego además a un polinucleótido sintético que codifica para el producto traducido del polipéptido en la orientación inversa desde el extremo C-terminal original hasta el N-terminal (que carece de la secuencia líder) (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.478.925). En otra realización, se aplican técnicas recombinante descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica para generar polipéptidos recombinantes de la invención que contienen un dominio transmembrana (o péptido señal o hidrófobo) y que pueden incorporarse mediante técnicas de reconstitución de membranas en liposomas (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.478.925).

Usos de los polinucleótidos de CRCGCL

Los polinucleótidos de CRCGCL identificados en el presente documento pueden usarse de numerosas maneras como reactivos. La siguiente descripción debe considerarse a modo de ejemplo y utiliza técnicas conocidas.

Existe una necesidad continua para identificar nuevos marcadores cromosómicos, dado que pocos reactivos que marcan cromosomas, basados en datos de secuencias reales (polimorfismos repetidos), están disponibles en la actualidad. Usando un panel de híbridos de radiación, el CRCGCL se mapea en la región pseudoautosómica (PAR) de los cromosomas sexuales, que se ubica en tanto X (Xp22.3) como en Y (Yp13.3). De manera interesante, otros dos receptores de citocina se mapean en esta región (IL3Ra, y GMCSFRa); (véase, Kremer *et al.* "A Cytokine Receptor Gene Cluster in the X-Y pseudoautosomal region?" Blood 82(1) 22-28 (1993)). Por tanto, pueden usarse polinucleótidos de CRCGCL en análisis de ligamiento como un marcador para la región pseudoautosómica en los cromosomas X e Y.

En resumen, las secuencias pueden mapearse en cromosomas preparando cebadores de PCR (preferiblemente 15-25 pb) de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1. Los cebadores pueden seleccionarse usando análisis informático de modo que los cebadores no abarquen más de un exón pronosticado en el ADN genómico. Entonces, estos cebadores se usan para la selección por PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Sólo los híbridos que contienen el gen de CRCGCL humano correspondiente a la SEQ ID NO: 1 producirá un fragmento amplificado.

De manera similar, híbridos somáticos proporcionan un método rápido de mapeo por PCR de los polinucleótidos en cromosomas particulares. Pueden asignarse tres o más clones al día usando un termociclador individual. Además, la sublocalización de los polinucleótidos de CRCGCL puede lograrse con paneles de fragmentos de cromosomas específicos. Otras estrategias de mapeo génico que pueden usarse incluyen hibridación *in situ*, preselección con cromosomas marcados separados por citometría de flujo, y preselección mediante hibridación para construir bibliotecas de ADN específicas de cromosoma.

La ubicación cromosómica específica de los polinucleótidos de CRCGCL también puede lograrse usando hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de una extensión de cromosomas en metafase. Esta técnica usa polinucleótidos de tan sólo 500 ó 600 bases; sin embargo, se prefieren polinucleótidos de 2,000-4,000 pb. Para una revisión de esta técnica, véase Verma *et al.*, "Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques", Pergamon Press, Nueva York (1988).

Para el mapeo del cromosoma, pueden usarse los polinucleótidos de CRCGCL individualmente (para marcar un solo cromosoma o un solo sitio en este cromosoma) o en paneles (para marcar sitios múltiples y/o cromosomas múltiples). Los polinucleótidos preferidos corresponden a las regiones no codificantes de los ADNc porque es más probable que las secuencias codificantes estén conservadas dentro de familias de genes, aumentando así la posibilidad de hibridación cruzada durante el mapeo cromosómico.

Una vez que se ha mapeado un polinucleótido en una ubicación cromosómica específica, puede usarse la posición física del polinucleótido en análisis de ligamiento. El análisis de ligamiento establece herencia conjunta entre una ubicación cromosómica y la presentación de una enfermedad particular (se encuentran datos sobre el mapeo de enfermedades, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en línea a través de la biblioteca médica Welch de la Universidad Johns Hopkins)). Suponiendo una resolución de mapeo de 1 megabase y un gen por 20 kb, un ADNc ubicado con precisión en una región cromosómica asociada con la enfermedad podría ser uno de 50-500 posibles genes causantes.

Por tanto, una vez que se establece la herencia conjunta, pueden examinarse las diferencias en el polinucleótido de CRCGCL y el gen correspondiente entre individuos afectados y no afectados. En primer lugar, se examinan las alteraciones estructurales visibles en los cromosomas, tales como deleciones o translocaciones, en las extensiones de cromosomas o mediante PCR. Si no existe ninguna alteración estructural, se determina la presencia de mutaciones puntuales. Las mutaciones observadas en algunos o todos los individuos afectados, pero no en individuos normales, indica que la mutación puede provocar la enfermedad. Sin embargo, se requiere la secuenciación completa del polipéptido de CRCGCL y el gen correspondiente de varios individuos normales para distinguir la mutación de un polimorfismo. Si se identifica un nuevo polimorfismo, este polipéptido polimórfico puede usarse para análisis de ligamiento adicional.

Además, puede evaluarse el aumento o la disminución de la expresión del gen en individuos afectados en comparación con individuos no afectados usando polinucleótidos de CRCGCL. Cualquiera de estas alteraciones (expresión alterada, redistribución cromosómica, o mutación) puede usarse como marcador de diagnóstico o pronóstico.

Además de lo anterior, puede usarse un polinucleótido de CRCGCL para controlar la expresión génica mediante formación de triple hélice o de ADN o ARN antisentido. Ambos métodos se basan en la unión del polinucleótido a ADN o ARN. Para estas técnicas, los polinucleótidos preferidos tienen habitualmente de 20 a 40 bases de longitud y son complementarios a o bien la región del gen implicado en la transcripción (triple hélice, véanse Lee *et al.*, Nucl. Acids Res. 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, Science 241:456 (1988); y Dervan *et al.*, Science 251:1360 (1991)) o bien al propio ARNm (antisentido, Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxy-nucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Ratón, FL (1988)). La formación de triple hélice da como resultado de manera óptima un corte de la transcripción de ARN a partir de ADN, mientras que la hibridación de ARN antisentido bloquea la traducción de una molécula de ARNm para dar un polipéptido. Ambas técnicas son eficaces en sistemas modelo, y la información dada a conocer en el presente documento puede usarse para diseñar polinucleótidos antisentido o de triple hélice en un esfuerzo por tratar la enfermedad.

Los polinucleótidos de CRCGCL también son útiles en la terapia génica. Un objetivo de la terapia génica es insertar un gen normal en un organismo que tiene un gen defectuoso, en un esfuerzo por corregir el defecto genético. CRCGCL ofrece un medio de selección como diana de tales defectos genéticos de una manera altamente precisa. Otro objetivo es insertar un nuevo gen que no estaba presente en el genoma huésped, produciendo de ese modo un nuevo rasgo en la célula huésped.

Los polinucleótidos de CRCGCL también son útiles para identificar individuos a partir de muestras biológicas diminutas. El ejército de los Estados Unidos, por ejemplo, está considerando el uso de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) para la identificación de su personal. En esta técnica, el ADN genómico de un individuo se digiere con una o más enzimas de restricción, y se analiza con sondas en una transferencia de tipo Southern dando bandas únicas para identificar al personal. Este método no presenta las limitaciones actuales de las "placas de identidad" que pueden perderse, cambiarse o robarse, haciendo difícil la identificación positiva. Los polinucleótidos de CRCGCL pueden usarse como marcadores de ADN adicionales para RFLP.

Los polinucleótidos de CRCGCL también pueden usarse como alternativa al RFLP, determinando la secuencia de ADN real base por base de partes seleccionadas del genoma de un individuo. Estas secuencias pueden usarse para preparar cebadores de PCR para amplificar y aislar tales ADN seleccionados, que entonces pueden secuenciarse. Usando esta técnica, pueden identificarse individuos porque cada individuo tendrá un conjunto único de secuencias de ADN. Una vez que se establece una base de datos de ID única para un individuo, puede realizarse la identificación positiva de ese individuo, vivo o muerto, a partir de muestras de tejido extremadamente pequeñas.

La biología forense también se beneficia de usar técnicas de identificación basadas en ADN tal como se da a conocer en el presente documento. Las secuencias de ADN tomadas de muestras biológicas muy pequeñas tales como tejidos, por ejemplo, cabello o piel, o líquidos corporales, por ejemplo, sangre, saliva, semen, etc., pueden amplificarse usando PCR. En una técnica de la técnica anterior, se usan secuencias génicas amplificadas a partir de loci polimórficos, tal como gen HLA de clase II de DQa, en biología forense para identificar individuos (Erlich, H., PCR Technology, Freeman and Co. (1992)). Una vez amplificados estos loci polimórficos específicos, se digieren con una o más enzimas de restricción, produciendo un conjunto de bandas de identificación en una transferencia de tipo

ES 2 357 020 T3

Southern analizada con sondas de ADN correspondiente al gen HLA de clase II de DQa. De manera similar, pueden usarse polinucleótidos de CRCGCL como marcadores polimórficos para fines forenses.

También existe una necesidad de reactivos que puedan identificar la fuente de un tejido particular. Tal necesidad surge, por ejemplo, en medicina forense cuando se presentan con tejido de origen desconocido. Los reactivos apropiados pueden comprender, por ejemplo, sondas o cebadores de ADN específicas para un tejido particular preparado a partir de secuencias de CRCGCL. Los paneles de tales reactivos pueden identificar tejido por especie y/o por tipo de órgano. De una manera similar, estos reactivos pueden usarse para examinar cultivos tisulares para detectar contaminación.

Dado que el CRCGCL se encuentra expresado en una línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa), células T activadas, y una línea celular de carcinoma de pulmón (A549), mientras que también se expresa una variante mas corta en el ganglio linfático y en un menor grado en el bazo, los polinucleótidos de CRCGCL son útiles como sondas de hibridación para la identificación diferencial del/de los tejido(s) o tipo(s) de célula(s) presente(s) en una muestra biológica. De manera similar, los polipéptidos y anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de CRCGCL son útiles para proporcionar sondas inmunológicas para la identificación diferencial del/de los tejido(s) o tipo(s) de célula(s). Además, para varios trastornos de los tejidos o células anteriores, particularmente del sistema inmunitario, pueden determinarse niveles significativamente superiores o inferiores de expresión génica de CRCGCL en determinados tejidos (por ejemplo, tejidos cancerosos y heridos) o líquidos corporales (por ejemplo, suero, plasma, orina, líquido sinovial o líquido cefalorraquídeo) tomados de un individuo que tiene un trastorno de este tipo, en relación con un nivel de expresión génica de CRCGCL "patrón", es decir, el nivel de expresión de CRCGCL en el tejido sano de un individuo que no tiene el trastorno del sistema inmunitario.

Por tanto, la descripción proporciona un método de diagnóstico de un trastorno, que implica: (a) someter a ensayo el nivel de expresión génica de CRCGCL en células o líquido corporal de un individuo; (b) comparar el nivel de expresión génica de CRCGCL con un nivel de expresión génica de CRCGCL patrón, mediante lo cual un aumento o una disminución en el nivel de expresión génica de CRCGCL sometido a ensayo en comparación con el nivel de expresión patrón es indicativo de trastorno en el sistema inmunitario.

Como mínimo, los polinucleótidos de CRCGCL pueden usarse como marcadores de peso molecular en geles de tipo Southern, como sondas de diagnóstico para determinar la presencia de un ARNm específico en un tipo de célula particular, como una sonda para "extraer" secuencias conocidas en el proceso del descubrimiento de polinucleótidos novedosos, para seleccionar y preparar oligómeros para la unión a un "chip génico" u otro soporte, para generar anticuerpos anti-ADN usando técnicas de inmunización con ADN, y como un antígeno para provocar una respuesta inmunitaria.

Usos de polipéptidos de CRCGCL

Los polipéptidos de CRCGCL pueden usarse de diversas maneras. La siguiente descripción debe considerarse a modo de ejemplo y utiliza técnicas conocidas.

Los polipéptidos de CRCGCL pueden usarse para someter a ensayo niveles de proteínas en una muestra biológica usando técnicas basadas en anticuerpos. Por ejemplo, puede estudiarse la expresión de proteínas en tejidos con métodos inmunohistológicos clásicos (Jalkanen, M., *et al.*, J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen, M., *et al.*, J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)). Otros métodos basados en anticuerpos útiles para detectar la expresión génica de proteínas incluyen inmunoensayos, tales como el ensayo de inmuoadsorción ligado a enzimas (ELISA) y el radioinmunoensayo (RIA). En la técnica se conocen marcadores para ensayos con anticuerpos adecuados e incluyen marcadores enzimáticos, tales como, glucosa oxidasa, y radioisótopos, tales como yodo (^{125}I ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In), y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), y marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

Además de someter a ensayo niveles de proteínas secretadas en una muestra biológica, las proteínas también pueden detectarse *in vivo* mediante la obtención de imágenes. Etiquetas o marcadores de anticuerpos para la obtención de imágenes *in vivo* de proteínas incluyen aquellos que pueden detectarse mediante radiografía de rayos X, RMN o ESR. Para la radiografía de rayos X, los marcadores incluyen radioisótopos tales como bario o cesio, que emiten radiación detectable pero no son abiertamente perjudiciales para el sujeto. Marcadores adecuados para RMN y ESR incluyen aquellos con un espín característico detectable, tales como deuterio, que pueden incorporarse en el anticuerpo mediante el marcaje de nutrientes para detectar el hibridoma relevante.

Se introduce (por ejemplo, por vía parenteral, por vía subcutánea, o por vía intraperitoneal) en el mamífero un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico de proteína que se ha marcado con un resto para la obtención de imágenes detectable apropiado, tal como un radioisótopo (por ejemplo, ^{131}I , ^{112}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$), una sustancia radiopaca, o un material detectable mediante resonancia magnética nuclear. Se entenderá en la técnica que el tamaño del sujeto y el sistema de obtención de imágenes usado determinarán la cantidad del resto sometido a obtención de imágenes necesaria para producir imágenes de diagnóstico. En el caso de un resto de radioisótopo, para un sujeto humano, la cantidad de radioactividad inyectada normalmente oscilará desde aproximadamente 5 hasta 20 milicurios de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Entonces, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo marcado se acumulará preferencialmente en la ubicación de células que contienen la proteína específica. La obtención de imágenes de tumores *in vivo* se describe en

S.W. Burchiel *et al.*, "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments" Capítulo 13 en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel y B. A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982).

5 Por tanto, la descripción proporciona un método de diagnóstico de un trastorno, que implica (a) someter a ensayo la expresión de polipéptido de CRCGCL en células o líquido corporal en un individuo; (b) comparar el nivel de expresión génica con un nivel de expresión génica patrón, mediante lo cual un aumento o disminución en el nivel de expresión génica de polipéptido de CRCGCL sometido a ensayo en comparación con el nivel de expresión patrón es indicativo de un trastorno.

10 Además, pueden usarse polipéptidos de CRCGCL para tratar una enfermedad. Por ejemplo, puede administrarse a los pacientes polipéptidos de CRCGCL en un esfuerzo por sustituir la ausencia o disminución de los niveles del polipéptido de CRCGCL (por ejemplo, insulina), para complementar la ausencia o disminución de los niveles de un polipéptido diferente (por ejemplo, hemoglobina S por hemoglobina B), para inhibir la actividad de un polipéptido (por ejemplo, un oncogén), para activar la actividad de un polipéptido (por ejemplo, mediante la unión a un receptor), para reducir la actividad de un receptor unido a membrana compitiendo con el mismo por el ligando libre (por ejemplo, receptores de TNF solubles usados en la reducción de la inflamación), o para provocar una respuesta deseada (por ejemplo, crecimiento de vasos sanguíneos).

20 De manera similar, también pueden usarse anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de CRCGCL para tratar una enfermedad. Por ejemplo, la administración de un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de CRCGCL puede unir y reducir la sobreproducción del polipéptido. De manera similar, la administración de un anticuerpo puede activar el polipéptido, tal como mediante la unión a un polipéptido unido a una membrana (receptor).

25 Como mínimo, pueden usarse los polipéptidos de CRCGCL como marcadores de peso molecular en geles de SDS-PAGE o en columnas de filtración en gel de tamiz molecular usando métodos bien conocidos para los expertos en la técnica. También pueden usarse polipéptidos de CRCGCL para generar anticuerpos, que a su vez se usan para medir la expresión de proteínas de una célula recombinante, como una manera de evaluar la transformación de la célula huésped. Además, pueden usarse los polipéptidos de CRCGCL para someter a prueba las siguientes actividades biológicas.

Métodos de terapia génica

35 Otro aspecto de la presente descripción es para los métodos de terapia génica para su uso en el tratamiento de trastornos, enfermedades y estados. Los métodos de terapia génica hacen referencia a la introducción de secuencias de ácido nucleico (ADN, ARN y ADN o ARN antisentido) en un animal para lograr la expresión del polipéptido de CRCGCL de la presente invención. Este método requiere un polinucleótido que codifica para un polipéptido de CRCGCL operativamente unido a un promotor y cualquier otro elemento genético necesario para la expresión del polipéptido por el tejido diana. Tal terapia génica y técnicas de administración de conocen en la técnica, véase, por ejemplo, el documento WO90/11092.

45 Por tanto, por ejemplo, células obtenidas de un paciente pueden modificarse por ingeniería con un polinucleótido (ADN o ARN) que comprenden un promotor operativamente unido a un polinucleótido de CRCGCL *ex vivo*, proporcionándose luego las células modificadas por ingeniería a un paciente que va a tratarse con el polipéptido. Tales métodos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, véanse Belledegrun, A., *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 85: 207-216 (1993); Ferrantini, M. *et al.*, Cancer Research 53: 1107-1112 (1993); Ferrantini, M. *et al.*, J. Immunology 153: 4604-4615 (1994); Kaido, T., *et al.*, Int. J. Cancer 60: 221-229 (1995); Ogura, H., *et al.*, Cancer Research 50: 5102-5106 (1990); Santodonato, L., *et al.*, Human Gene Therapy 7:1-10 (1996); Santodonato, L., *et al.*, Gene Therapy 4:1246-1255 (1997); y Zhang, J.-F. *et al.*, Cancer Gene Therapy 3: 31-38 (1996)). En una realización, las células que se modifican por ingeniería son células arteriales. Las células arteriales pueden reintroducirse en el paciente mediante inyección directa a la arteria, los tejidos que rodean la arteria, o mediante la inyección con catéter.

55 Tal como se discute en más detalle a continuación, las construcciones de polinucleótido de CRCGCL pueden administrarse mediante cualquier método que administra materiales inyectables a las células de un animal, tal como, inyección en el espacio intersticial de tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, y similares). Las construcciones de polinucleótido de CRCGCL pueden administrarse en un portador líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

60 En una realización, se administra el polinucleótido de CRCGCL como un polinucleótido desnudo. La expresión polinucleótido, ADN o ARN "desnudo" se refiere a secuencias que están libres de cualquier vehículo de administración que actúa para asistir, promover o facilitar la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, Lipofectin o agentes de precipitación y similares. Sin embargo, los polinucleótidos de CRCGCL también pueden administrarse en formulaciones de liposomas y pueden prepararse formulaciones de Lipofectin y similares mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses n.ºs 5.593.972, 5.589.466 y 5.580.859.

Las construcciones de vectores de polinucleótido de CRCGCL usados en el método de terapia génica son preferiblemente construcciones que no se integrarán en el genoma del huésped ni contendrán secuencias que permitan

ES 2 357 020 T3

la replicación. Vectores apropiados incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles de Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles de Pharmacia; y pEF1/V5, pcDNA3.1, y pRc/CMV2 disponibles de Invitrogen. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto.

5 Puede usarse cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la técnica para activar la expresión de ADN de CRCGCL. Promotores adecuados incluyen promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral; o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor de virus sincitial respiratorio (VSR); promotores inducibles, tales como el promotor de MMT, el promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoAI; promotores de globinas humanas; promotores de timidina cinasas virales, tales como el promotor de timidina cinasa del herpes simple; LTR retrovirales; el promotor de b-actina; y promotores de hormonas de crecimiento humanas. El promotor también puede ser el promotor nativo para CRCGCL.

15 A diferencia de otras técnicas de terapia génica, una ventaja principal de la introducción de secuencias de ácido nucleico desnudas en células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. Estudios han demostrado que pueden introducirse en células secuencias de ADN que no se replican para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante periodos de hasta seis meses.

20 La construcción de polinucleótido de CRCGCL puede administrarse al espacio intersticial de tejidos dentro de un animal, incluyendo tejido de músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfático, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula y conjuntivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende la matriz de mucopolisacárido, fluida, intercelular, entre las fibras reticulares de tejidos de órganos, fibras elásticas en las paredes de vasos o cámaras, fibras de colágeno de tejidos fibrosos, o la misma matriz dentro de tejido conjuntivo que envuelve a células musculares o en las lagunas del hueso. De manera similar es el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el líquido linfático de los canales linfáticos. Se prefiere la administración al espacio intersticial del tejido muscular por las razones tratadas a continuación. Pueden administrarse convenientemente mediante inyección en los tejidos que comprenden estas células. Preferiblemente se administran a, y se expresan en, células que no se dividen que están diferenciadas, aunque la administración y la expresión puede lograrse en células no diferenciadas o diferenciadas de manera menos completa, tales como, por ejemplo, células madre de sangre o fibroblastos de la piel. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad para captar y expresar polinucleótidos.

35 Para la inyección de secuencias de ácido desnudas, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN estará en el intervalo de desde aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferiblemente, la dosificación será de desde aproximadamente 0,005 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg y más preferiblemente desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg. Evidentemente, tal como apreciará el experto habitual, la dosificación variará según el sitio de inyección del tejido. La dosificación apropiada y eficaz de la secuencia de ácido nucleico puede determinarse fácilmente por los expertos habituales en la técnica y puede depender del estado que está tratándose y la vía de administración.

40 Se prevé como una vía de administración, la vía parenteral de inyección en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también pueden usarse otras vías parenterales, tales como, inhalación de una formulación en aerosol particularmente para la administración a los pulmones o tejidos bronquiales, garganta o membranas mucosas de la nariz. Además, pueden usarse construcciones de ADN de CRCGCL desnudos para administrar a las arterias durante angioplastia con el catéter usado en el procedimiento.

50 Los polinucleótidos desnudos pueden administrarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluyen, pero sin limitarse a, inyección con aguja directa en el sitio de la administración, inyección intravenosa, administración tópica, infusión con catéter, y las denominadas "pistolas génicas". Estos métodos de suministro se conocen en la técnica.

55 Tal como se demuestra en los ejemplos, las secuencias de ácido nucleico de CRCGCL desnudas pueden administrarse *in vivo* lo que da como resultado la expresión satisfactoria del polipéptido de CRCGCL en las arterias femorales de conejos.

Las construcciones también pueden administrarse con vehículos de administración tales como secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, Lipofectin, agentes de precipitación, etc. Tales métodos de suministro se conocen en la técnica.

60 En determinadas realizaciones, las construcciones de polinucleótido de CRCGCL se complejan en una preparación de liposoma. Las preparaciones de liposomas para su uso en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Sin embargo, se prefieren particularmente liposomas catiónicos porque puede formarse un complejo de carga ajustada entre el liposoma catiónico y el ácido nucleico polianiónico. Se ha mostrado que los liposomas catiónicos median la administración intracelular de ADN de plásmido (Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416); ARNm (Malone *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:6077-6081); y factores de transcripción purificados (Debs *et al.*, J. Biol. Chem. (1990) 265:10189-10192), en forma de función.

Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, liposomas de N[1-2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) son particularmente útiles y están disponibles con la marca comercial Lipofectin, de GIBCO BRL, Grand Island, N.Y. (véase, también, Felgner *et al.*, Proc. Natl Acad. Sci. USA (1987) 84:7413-7416). Otros liposomas comercialmente disponibles incluyen Transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer).

5 Pueden prepararse otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles usando técnicas bien conocidas en la técnica; véase, por ejemplo la publicación PCT n.º WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilammonio)propano). La preparación de liposomas de DOTMA se explica en la bibliografía, véase por ejemplo, P. Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417. Pueden
10 usarse métodos similares para preparar liposomas a partir de otros materiales de lípidos catiónicos.

De manera similar, pueden conseguirse fácilmente liposomas aniónicos y neutros, tales como de Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.), o pueden prepararse fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Tales materiales incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol
15 (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con los materiales de partida DOTMA y DOTAP en razones apropiadas. Métodos para preparar liposomas usando estos materiales se conocen bien en la técnica.

Por ejemplo, pueden usarse dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) comerciales en diversas combinaciones para preparar liposomas convencionales, con o sin la adición de colesterol. Por tanto, por ejemplo, pueden prepararse vesículas de DOPG/DOPC secando 50 mg de cada uno de DOPG y DOPC bajo una corriente de gas nitrógeno en un vial de sonicación. Se coloca la muestra en una bomba de vacío durante la noche y se hidrata el día siguiente con agua desionizada. Entonces, se sonica la muestra durante 2 horas en un vial tapado, usando un sonicador modelo 350 de Heat Systems equipado con una sonda de cubeta invertida (de tipo baño) en el parámetro máximo mientras que se hace circular el baño a 15EC. Alternativa-
20 mente, pueden prepararse vesículas cargadas negativamente sin sonicación para producir vesículas multilamelares o mediante extrusión a través de membranas Nucleopore para producir vesículas unilamelares de tamaño diferenciado. Se conocen otros métodos y están disponibles para los expertos en la técnica.

Los liposomas pueden comprender vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequeñas (SUV), o vesículas unilamelares grandes (LUV), prefiriéndose las SUV. Se preparan los diversos complejos de liposoma-ácido nucleico usando métodos bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Straubinger *et al.*, Methods of Immunology (1983), 101:512-527. Por ejemplo, las MLV que contienen ácido nucleico pueden prepararse depositando una película delgada de fosfolípido en las paredes de un tubo de vidrio y posteriormente hidratando con una disolución del material que va a encapsularse. Las SUV se preparan mediante sonicación extendida de las MLV para producir una población homogénea de liposomas unilamelares. Se añade el material que va a atraparse a una suspensión de MLV preformadas y entonces se sonican. Cuando se usan liposomas que contienen lípidos catiónicos, se resuspende la película de lípido seca en una disolución apropiada tal como agua estéril o una disolución tampón isotónica tal como Tris/NaCl 10 mM, se sonica, y entonces se mezclan directamente los liposomas preformados con el ADN. El liposoma y ADN forman un complejo muy estable debido a la unión de los liposomas cargados positivamente al ADN catiónico. Las SUV encuentran uso con fragmentos de ácido nucleico pequeños. Las LUV se preparan mediante varios métodos, bien conocidos en la técnica. Los métodos comúnmente usados incluyen quelación con Ca²⁺-EDTA (Papahadjopoulos *et al.*, Biochim. Biophys. Acta (1975) 394:483; Wilson *et al.*, Cell (1979) 17:77); inyección de éter (Deamer, D. y Bangham, A., Biochim. Biophys. Acta (1976) 443:629; Ostro *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. (1977) 76:836; Fraley *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:3348); diálisis con detergentes (Enoch, H. y Strittmatter, P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:1145); y evaporación de fase inversa (REV) (Fraley *et al.*, J. Biol. Chem. (1980) 255:10431; Szoka, F. y Papahadjopoulos, D., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:145; Schaefer-Ridder *et al.*, Science (1982) 215:166).

50 Generalmente, la razón de ADN con respecto a liposomas será de desde aproximadamente 10:1 hasta aproximadamente 1:10. Preferiblemente, la razón será de desde aproximadamente 5:1 hasta aproximadamente 1:5. Más preferiblemente, la razón será de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 1:3. Todavía más preferiblemente, la razón será de aproximadamente 1:1.

55 La patente estadounidense n.º 5.676.954 notifica sobre la inyección de material genético, complejo con portadores de liposomas catiónicos, en ratones. Las patentes estadounidenses n.ºs 4.897.355, 4.946.787, 5.049.386, 5.459.127, 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055, y la publicación internacional n.º WO 94/9469 proporcionan lípidos catiónicos para su uso en la transfección de ADN en células y mamíferos. Las patentes estadounidenses n.ºs 5.589.466, 5.693.22, 5.580.859, 5.703.055, y la publicación internacional n.º WO 94/9469 proporcionan métodos para administrar complejos de ADN-lípidos catiónico a mamíferos.
60

Las células pueden modificarse por ingeniería, *ex vivo* o *in vivo*, usando una partícula retroviral que contiene ARN que comprende una secuencia que codifica para CRCGCL. Los retrovirus de los que pueden derivarse los vectores de plásmido retrovirales incluyen, pero no se limitan a, virus de leucemia murina de Moloney, virus de necrosis de bazo, virus de sarcoma de Rous, virus de sarcoma de Harvey, virus de leucosis aviar, virus de leucemia de simio gibón, virus de inmunodeficiencia humana, virus de sarcoma mieloproliferativo, y virus de tumor de mama.
65

El vector de plásmido retroviral se emplea para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Ejemplos de células de empaquetamiento que pueden transfectarse incluyen, pero no se limitan a, las líneas celulares PE501, PA317, R-2, R-AM, PA 12, T19-14X, VT-19-17-H2, RCRE, RCRIP, GP+E-86, GP+envAm12, y DAN tal como se describen en Miller, *Human Gene Therapy* 1:5-14 (1990). El vector puede transducir las células de empaquetamiento mediante medios conocidos en la técnica. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, electroporación, el uso de liposomas, y precipitación con CaPO₄. En una alternativa, el vector de plásmido retroviral puede encapsularse en un liposoma, o acoplarse a un lípido, y luego administrarse a un huésped.

La línea celular productora genera partículas de vector retroviral infecciosas que incluyen polinucleótido que codifica para CRCGCL. Tales partículas de vector retroviral pueden entonces emplearse para transducir células eucariotas, o bien *in vitro* o bien *in vivo*. Las células eucariotas transducidas expresarán CRCGCL.

Las células pueden modificarse por ingeniería, *ex vivo* o *in vivo*, con polinucleótido de CRCGCL contenido en un vector de adenovirus. El adenovirus pueden manipularse tal que este codifica para y expresa CRCGCL, y al mismo tiempo se inactiva en cuanto a su capacidad para replicar en un ciclo de vida viral lítico normal. La expresión en adenovirus se logra sin la integración del ADN viral en el cromosoma de la célula huésped, mitigando así preocupaciones sobre la mutagénesis de inserción. Además, se han usado adenovirus como vacunas entéricas vivas durante muchos años con un perfil de seguridad excelente (Schwartz, A. R. *et al.* (1974) *Am. Rev. Respir. Dis.* 109:233-238). Finalmente, la transferencia génica mediada por adenovirus se ha demostrado en varios casos incluyendo la transferencia de alfa-1-antitripsina y CFTR a los pulmones de ratas del algodón (Rosenfeld, M. A. *et al.* (1991) *Science* 252:431-434; Rosenfeld *et al.*, (1992) *Cell* 68:143-155). Además, estudios exhaustivos para intentar establecer adenovirus como un agente causante del cáncer en seres humanos fueron negativos de modo uniforme (Green, M. *et al.* (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:6606).

Vectores adenovirales adecuados útiles en la presente invención se describen, por ejemplo, en Kozarsky y Wilson, *Curr. Opin. Genet. Devel.* 3:499-503 (1993); Rosenfeld *et al.*, *Cell* 68:143-155 (1992); Engelhardt *et al.*, *Human Genet. Ther.* 4:759-769 (1993); Yang *et al.*, *Nature Genet.* 7:362-369 (1994); Wilson *et al.*, *Nature* 365:691-692 (1993); y la patente estadounidense n.º 5.652.224. Por ejemplo, el vector de adenovirus Ad2 es útil y puede hacerse crecer en células 293 humanas. Estas células contienen la región E1 de adenovirus y expresan constitutivamente E1a y E1b, que complementa los adenovirus defectuosos proporcionando los productos de los genes delecionados del vector. Además de Ad2, también son útiles en la presente invención otras variedades de adenovirus (por ejemplo, Ad3, Ad5, y Ad7).

Preferiblemente, los adenovirus usados en la presente invención son de deficientes para la replicación. Los adenovirus deficientes para la replicación requieren la ayuda de un virus auxiliar y/o línea celular de empaquetamiento para formar partículas infecciosas. El virus resultante puede infectar células y puede expresar un polinucleótido de interés que está operativamente unido a un promotor, por ejemplo, el promotor HARP, pero no puede replicarse en la mayoría de las células. Los adenovirus deficientes para la replicación pueden delecionarse en uno o más de todo o una parte de los siguientes genes: E1a, E1b, E3, E4, E2a, o de L1 a L5.

En otras realizaciones determinadas, las células se modifican por ingeniería, *ex vivo* o *in vivo*, usando un virus ade-noasociado (AAV). Los AAV son virus defectuosos que se producen de manera natural que requieren virus auxiliares para producir partículas infecciosas (Muzyczka, N., *Curr. Topics in Microbiol. Immunol.* 158:97 (1992)). También es uno de los pocos virus que pueden integrar su ADN en células que no se dividen. Los vectores que contienen tan sólo 300 pares de bases de AAV, pueden empaquetarse y pueden integrarse, pero el espacio para el ADN exógeno está limitado a aproximadamente 4,5 kb. Los métodos para producir y usar tales AAV se conocen en la técnica; véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.139.941, 5.173.414, 5.354.678, 5.436.146, 5.474.935, 5.478.745, y 5.589.377.

Por ejemplo, un vector de AAV apropiado para su uso en la presente invención incluirá todas las secuencias necesarias para la replicación del ADN, encapsidación, e integración en la célula huésped. La construcción de polinucleótido de CRCGCL se inserta en el vector de AAV usando métodos de clonación convencionales, tales como los encontrados en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1989). Entonces, se transfecta el vector de AAV recombinante en células de empaquetamiento que se infectan con un virus auxiliar, usando cualquier técnica convencional, incluyendo lipofección, electroporación, precipitación con fosfato de calcio, etc. Virus auxiliares apropiados incluyen adenovirus, citomegalovirus, virus vaccinia, o virus del herpes. Una vez que se transfectan e infectan las células de empaquetamiento, producirán partículas virales de AAV infecciosas que contienen la construcción de polinucleótido de CRCGCL. Entonces se usan estas partículas virales para transducir células eucariotas, o bien *ex vivo* o bien *in vivo*. Las células transducidas contendrán la construcción de polinucleótido de CRCGCL integrada en su genoma, y expresarán CRCGCL.

Otro método de terapia génica implica regiones de control heterólogas de asociación operativa y secuencias de polinucleótido endógenas (por ejemplo, que codifican para CRCGCL) mediante recombinación homóloga (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.641.670, expedida el 24 de junio de 1997; la publicación internacional n.º WO 96/29411, publicada el 26 de septiembre de 1996; la publicación internacional n.º WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Koller *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935 (1989); y Zijlstra *et al.*, *Nature* 342:435-438 (1989). Este método implica la activación de un gen que está presente en las células diana, pero que no se expresa normalmente en las células, o se expresa a un nivel inferior al deseado.

ES 2 357 020 T3

Se preparan construcciones de polinucleótido, usando técnicas convencionales conocidas en la técnica, que contienen el promotor con secuencias de direccionamiento que flanquean al promotor. En el presente documento se describen promotores adecuados. La secuencia de direccionamiento es lo suficientemente complementaria a una secuencia endógena para permitir la recombinación homóloga del promotor-secuencia de direccionamiento con la secuencia endógena. La secuencia de direccionamiento estará lo suficientemente cerca del extremo 5' de la secuencia de polinucleótido endógena deseada de CRCGCL de modo que el promotor estará operativamente unido a la secuencia endógena tras la recombinación homóloga.

El promotor y las secuencias de direccionamiento pueden amplificarse usando PCR. Preferiblemente, el promotor amplificado contiene sitios de enzima de restricción diferenciados en los extremos 5' y 3'. Preferiblemente, el extremo 3' de la primera secuencia de direccionamiento contiene el mismo sitio de enzima de restricción que el extremo 5' del promotor amplificado y el extremo 5' de la segunda secuencia de direccionamiento contiene el mismo sitio de restricción que el extremo 3' del promotor amplificado. Se digieren el promotor amplificado y las secuencias de direccionamiento y se ligan juntos.

La construcción promotor-secuencia de direccionamiento se suministra a las células, o bien como polinucleótido desnudo, o bien junto con agentes que facilitan la transfección, tales como liposomas, secuencias virales, partículas virales, virus completos, lipofección, agentes de precipitación, etc., descritos en más detalle anteriormente. El promotor P-secuencia de direccionamiento puede administrarse mediante cualquier método, incluyendo inyección con aguja directa, inyección intravenosa, administración tópica, infusión con catéter, aceleradores de partículas, etc. Los métodos se describen en más detalle a continuación.

La construcción promotor-secuencia de direccionamiento se capta en las células. La recombinación homóloga entre la construcción y la secuencia endógena tienen lugar, de tal manera que una secuencia de CRCGCL endógena se coloca bajo el control del promotor. Entonces el promotor acciona la expresión de la secuencia de CRCGCL endógena.

Los polinucleótidos que codifican para CRCGCL pueden administrarse junto con otros polinucleótidos que codifican para otras proteínas angiogénicas. Las proteínas angiogénicas incluyen, pero no se limitan a, factores de crecimiento de fibroblastos ácidos y básicos, VEGF-1, factor de crecimiento epidérmico alfa y beta, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de necrosis tumoral alfa, factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento de tipo insulina, factor estimulante de colonias, factor estimulante de colonias de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos, y óxido nítrico sintasa.

El polinucleótido que codifica para CRCGCL puede contener una secuencia señal secretora que facilita la secreción de la proteína. Normalmente, la secuencia señal se sitúa en la región codificante del polinucleótido que va a expresarse hacia o en el extremo 5' de la región codificante. La secuencia señal puede ser homóloga o heteróloga con respecto al polinucleótido de interés y puede ser homóloga o heteróloga a las células que van a transfectarse. Adicionalmente, la secuencia señal puede sintetizarse químicamente usando métodos conocidos en la técnica.

Puede usarse cualquier modo de administración de cualquiera de las construcciones de polinucleótidos anteriormente descritos siempre que el modo dé como resultado la expresión de una o más moléculas en una cantidad suficiente para proporcionar un efecto terapéutico. Esto incluye inyección con aguja directa, inyección sistémica, infusión con catéter, inyectores biofísicos, aceleradores de partículas (es decir, "pistolas génicas"), agentes de absorción lenta de esponja de espuma de gel, otros materiales de agentes de absorción lenta comercialmente disponibles, bombas osmóticas (por ejemplo, minibombas Alza), formulaciones farmacéuticas orales o sólidas de tipo supositorio (comprimido o píldora), y aplicaciones de decantación o tópicas durante la cirugía. Por ejemplo, inyección directa de plásmido precipitado con fosfato de calcio desnudo en hígado de rata y bazo de rata o un plásmido recubierto con proteína en la vena porta ha dado como resultado la expresión génica del gen foráneo en los hígados de rata (Kaneda *et al.*, Science 243:375 (1989)).

Un método de administración local es mediante inyección directa. Se administra una molécula recombinante de la presente invención que puede complejarse con un vehículo de administración mediante inyección directa en, o de manera local dentro de la zona de, las arterias. La administración de una composición de manera local dentro de la zona de las arterias se refiere a inyectar la composición a centímetros y preferiblemente, a milímetros de las arterias.

Otro método de administración local es poner en contacto una construcción de polinucleótido de la presente invención en o alrededor de una herida quirúrgica. Por ejemplo, puede someterse a cirugía a un paciente y puede recubrirse la construcción de polinucleótido sobre la superficie de tejido dentro de la herida o puede inyectarse la construcción en zonas de tejido dentro de la herida.

Las composiciones terapéuticas útiles en la administración sistémica, incluyen moléculas recombinantes de la presente invención complejadas con un vehículo de administración dirigido. Vehículos de administración adecuados para su uso con la administración sistémica comprenden liposomas que comprenden ligandos para dirigir el vehículo a un sitio particular.

Métodos de administración sistémica incluyen administración con inyección intravenosa, con aerosol, oral y percutánea (tópico). Las inyecciones intravenosas pueden realizarse usando métodos convencionales en la técnica. También

puede realizarse la administración con aerosol usando métodos convencionales en la técnica (véase, por ejemplo, Stribling *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189: 11277-11281, 1992). La administración oral puede realizarse complejando una construcción de polinucleótido de la presente invención a un portador que puede soportar la degradación mediante enzimas digestivas en el intestino de un animal. Ejemplos de tales portadores incluyen comprimidos o cápsulas de plástico, tales como los conocidos en la técnica. La administración tópica puede realizarse mezclando una construcción de polinucleótido de la presente invención con un reactivo lipófilo (por ejemplo, DMSO) que puede pasar a la piel.

La determinación de una cantidad eficaz de la sustancia que va a administrarse puede depender de varios factores que incluyen, por ejemplo, la estructura química y actividad biológica del sustrato, la edad y el peso del animal, el estado preciso que requiere el tratamiento y su gravedad, y la vía de administración. La frecuencia de los tratamientos depende de varios factores, tales como la cantidad de construcciones de polinucleótido administrada por dosis, así como la salud y la historia del sujeto. El médico o veterinario encargado determinarán la cantidad precisa, el número de dosis y el momento de las dosis.

Las composiciones terapéuticas de la presente invención pueden usarse para la administración a cualquier animal, preferiblemente a mamíferos y aves. Mamíferos preferidos incluyen seres humanos, perros, gatos, ratones, ratas, conejos, ovejas, ganado, caballos y cerdos, siendo particularmente preferidos los seres humanos.

20 *Actividades biológicas de CRCGCL*

Los polinucleótidos y polipéptidos de CRCGCL pueden usarse en ensayos para someter a prueba para detectar una o más actividades biológicas. Si los polinucleótidos y polipéptidos de CRCGCL no presentan la actividad en un ensayo particular, es probable que el CRCGCL pueda implicarse en las enfermedades asociadas con la actividad biológica. Por tanto, el CRCGCL podría usarse para tratar la enfermedad asociada.

Actividad inmunitaria

Los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL pueden ser útiles en el tratamiento de deficiencias o trastornos del sistema inmunitario, activando o inhibiendo la proliferación, diferenciación, o movilización (quimiotaxis) de células inmunitarias. Las células inmunitarias se desarrollan mediante un proceso denominado hematopoyesis, que produce células mieloides (plaquetas, glóbulos rojos, neutrófilos y macrófagos) y linfoides (linfocitos B y linfocitos) a partir de células madre pluripotentes. La etiología de estas deficiencias o trastornos inmunitarios puede ser genética, somática, tal como cáncer o algunos trastornos autoinmunitarios, adquirida (por ejemplo, mediante quimioterapia o toxinas), o infecciosa. Además, pueden usarse polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL como marcador o detector de una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario particular.

De manera interesante, CRCGCL se mapea en las regiones pseudoautosómicas en los cromosomas X e Y. Es probable que las mutaciones en CRCGCL también puedan conducir a trastornos inmunitarios, especialmente aquellos que implican células T activadas. Además, las mutaciones en CRCGCL pueden estar implicadas en enfermedades autoinmunitarias, especialmente enfermedades autoinmunitarias ligadas al cromosoma X.

Los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL pueden ser útiles en el tratamiento o la detección de deficiencias o trastornos de las células hematopoyéticas. Los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL pueden usarse para aumentar la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas, incluyendo las células madre pluripotentes, en un esfuerzo para tratar aquellos trastornos asociados con una disminución en determinados (o muchos) tipos de células hematopoyéticas. Ejemplos de síndromes de deficiencia inmunológica incluyen, pero no se limitan a: trastornos de proteínas sanguíneas (por ejemplo agammaglobulinemia, disgammaglobulinemia), ataxia, telangiectasia, inmunodeficiencia variable común, síndrome de DiGeorge, infección por VIH, infección por VLTH-VLB, síndrome de deficiencia de adhesión de leucocitos, linfopenia, disfunción bactericida de fagocitos, inmunodeficiencia combinada grave (SCID), trastorno de Wiskott-Aldrich, anemia, trombocitopenia, o hemoglobinuria.

Además, los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL también pueden usarse para modular la actividad hemostática (la detención de la hemorragia) o trombolítica (formación de coágulos). Por ejemplo, aumentando de la actividad hemostática o trombolítica, pueden usarse polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL para tratar trastornos de la coagulación sanguínea (por ejemplo, afibrinogenemia, deficiencias de factores), trastornos de plaquetas sanguíneas (por ejemplo trombocitopenia), o heridas que resultan de traumatismo, cirugía, u otras causas. Alternativamente, los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL que pueden disminuir la actividad hemostática o trombolítica, pueden usarse para inhibir o disolver la coagulación, importante en el tratamiento de ataques al corazón (infartos), accidentes cerebrovasculares, o cicatrices.

Los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL también puede ser útiles en el tratamiento o la detección de trastornos autoinmunitarios. Muchos trastornos autoinmunitarios resultan del reconocimiento inapropiado de lo propio como material foráneo por las células inmunitarias. Este reconocimiento inapropiado da como resultado una respuesta inmunitaria que conduce a la destrucción del tejido del huésped. Por tanto, la administración de polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL que puede inhibir una respuesta inmunitaria, particularmente la proliferación, diferenciación, o quimiotaxis de células T, puede ser una terapia eficaz en la prevención de trastornos autoinmunitarios.

Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios que pueden tratarse o detectarse con CRCGCL incluyen, pero no se limitan a: enfermedad de Addison, anemia hemolítica, síndrome antifosfolípido, artritis reumatoide, dermatitis, encefalomiелitis alérgica, glomerulonefritis, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, esclerosis múltiple, miastenia grave, neuritis, oftalmia, penfigoide ampollar, penfigoide, poliendocrinopatías, púrpura, enfermedad de Reiter, síndrome de Stiff-Man, tiroiditis autoinmunitaria, lupus eritematoso sistémico, inflamación pulmonar autoinmunitaria, síndrome de Guillain-Barre, diabetes mellitus dependiente de insulina, y enfermedad ocular inflamatoria autoinmunitaria.

De manera similar, también pueden tratarse reacciones y estados alérgicos, tales como asma (particularmente asma alérgico) u otros problemas respiratorios, con polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL. Además, el CRCGCL puede usarse para tratar anafilaxis, hipersensibilidad a una molécula antigénica, o incompatibilidad de grupo sanguíneo.

Los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL también pueden usarse para tratar y/o prevenir el rechazo de órganos o enfermedad de injerto contra huésped (GVHD). El rechazo de órganos se produce por la destrucción por las células inmunitarias del huésped del tejido transplantado mediante una respuesta inmunitaria. De manera similar, una respuesta inmunitaria también está implicada en GVHD, pero, en este caso, células inmunitarias trasplantadas foráneas destruyen los tejidos del huésped. La administración de polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL que inhibe una respuesta inmunitaria, particularmente la proliferación, diferenciación, o quimiotaxis de células T, puede ser una terapia eficaz en la prevención del rechazo de órganos o GVHD.

De manera similar, también pueden usarse los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL para modular la inflamación. Por ejemplo, los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL pueden inhibir la proliferación y diferenciación de células implicadas en una respuesta inflamatoria. Estas moléculas pueden usarse para tratar estados inflamatorios, tanto estados crónicos como agudos, incluyendo la inflamación asociada con infección (por ejemplo, choque septicémico, septicemia, o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)), lesión de isquemia-reperfusión, letalidad por endotoxinas, artritis, rechazo hiperagudo mediado por el complemento, nefritis, lesión de pulmón inducida por citocinas o quimiocinas, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, o resultante de la sobreproducción de citocinas (por ejemplo, TNF o IL-1).

Trastornos hiperproliferativos

Los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL pueden usarse para tratar o detectar trastornos hiperproliferativos, incluyendo neoplasmas. Los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL pueden inhibir la proliferación del trastorno mediante interacciones directas o indirectas. Alternativamente, los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL pueden hacer proliferar otras células que pueden inhibir el trastorno hiperproliferativo.

Por ejemplo, pueden tratarse trastornos hiperproliferativos mediante el aumento de una respuesta inmunitaria, particularmente aumento de las cualidades antigénicas del trastorno hiperproliferativo o mediante la proliferación, diferenciación, o movilización de células T. Esta respuesta inmunitaria puede aumentarse o bien potenciando una respuesta inmunitaria existente, o bien iniciando una nueva respuesta inmunitaria. Alternativamente, la disminución de una respuesta inmunitaria también puede ser un método de tratamiento de trastornos hiperproliferativos, tales como un agente quimioterápico.

Ejemplos de trastornos hiperproliferativos que pueden tratarse o detectarse mediante polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL incluyen, pero no se limitan a, neoplasmas ubicados en el: abdomen, hueso, mama, sistema digestivo, hígado, páncreas, peritoneo, glándulas endocrinas (adrenal, paratiroidea, pituitaria, testículos, ovario, timo, tiroides), ojo, cabeza y cuello, sistema nervioso (central y periférico), sistema linfático, pelvis, piel, tejido blando, bazo, tórax y tracto urogenital.

De manera similar, también pueden tratarse o detectarse otros trastornos hiperproliferativos mediante polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL. Ejemplos de tales trastornos hiperproliferativos incluyen, pero no se limitan a: hipergammaglobulinemia, trastornos linfoproliferativos, paraproteinemias, púrpura, sarcoidosis, síndrome de Sezary, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad de Gaucher, histiocitosis, y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, ubicada en un sistema de órgano indicado anteriormente.

Enfermedad infecciosa

Pueden usarse polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL para tratar o detectar agentes infecciosos. Por ejemplo, pueden tratarse enfermedades infecciosas aumentando la respuesta inmunitaria, particularmente aumentando la proliferación y diferenciación de células B y/o T. La respuesta inmunitaria puede aumentarse o bien potenciando una respuesta inmunitaria existente, o bien iniciando una nueva respuesta inmunitaria. Alternativamente, los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL también pueden inhibir directamente el agente infeccioso, sin provocar necesariamente una respuesta inmunitaria.

Los virus son un ejemplo de un agente infeccioso que puede provocar enfermedad o síntomas que pueden tratarse o detectarse con polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL. Ejemplos de virus, incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias de virus de ADN y ARN: arbovirus, adenovirus, arnavirus, arterivirus, birnavirus, bunyavirus, calicivirus, circovirus, coronavirus, flavivirus, hepadnavirus (hepatitis), herpesvirus (tal como, citomegalovirus, herpes

simple, herpes zoster), mononegavirus (por ejemplo, paramixovirus, morbillivirus, rhabdovirus), ortomixovirus (por ejemplo, influenza), papovavirus, parvovirus, picornavirus, poxvirus (tal como viruela o vaccinia), reovirus (por ejemplo, rotavirus), retrovirus (VLTH-I, VLTH-II, lentivirus), y togavirus (por ejemplo, rubivirus). Virus que se encuentran dentro de estas familias pueden provocar una variedad de enfermedades o síntomas, que incluyen, pero no se limitan a: artritis, bronquiolitis, encefalitis, infecciones oculares (por ejemplo, conjuntivitis, queratitis), síndrome de fatiga crónica, hepatitis (A, B, C, E, activa crónica, delta), meningitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, SIDA), neumonía, linfoma de Burkitt, varicela, fiebre hemorrágica, sarampión, paperas, parainfluenza, rabia, resfriado común, polio, leucemia, rubéola, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (por ejemplo, enfermedad de Kaposi, verrugas) y viremia. Pueden usarse polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL para tratar o detectar cualquiera de estos síntomas o enfermedades.

De manera similar, agentes bacterianos o fúngicos que pueden provocar enfermedad o síntomas y que pueden tratarse o detectarse con polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias de bacterias gram-negativas y gram-positivas y hongos: *Actinomycetales* (por ejemplo, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*), aspergilosis, *Bacillaceae* (por ejemplo, ántrax, clostridio), *Bacteroidaceae*, blastomycosis, *Bordetella*, *Borrelia*, brucelosis, candidiasis, *Campylobacter*, coccidioidomycosis, criptococosis, dermatomycosis, *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Yersinia*), *Erysipelothrix*, *Helicobacter*, legionelosis, leptospirosis, *Listeria*, *Mycoplasma*tales, *Neisseriaceae* (por ejemplo, *Acinetobacter*, *Gonorrhea*, meningocócicas), infecciones por *Pasteurellaceae* (por ejemplo, *Actinobacillus*, *Haemophilus*, *Pasteurella*), *Pseudomonas*, *Rickettsiaceae*, *Chlamydiaceae*, sífilis, y estafilocócicas. Estas familias bacterianas o fúngicas pueden provocar las siguientes enfermedades o síntomas, que incluyen, pero no se limitan a: bacteriemia, endocarditis, infecciones oculares (conjuntivitis, tuberculosis, uveítis), gingivitis, infecciones oportunistas (por ejemplo, infecciones relacionadas con el SIDA), paroniquia, infecciones relacionadas con prótesis, enfermedad de Reiter, infecciones de las vías respiratorias, tales como tos ferina o empiema, septicemia, enfermedad de Lyme, enfermedad por arañazo de gato, disentería, fiebre paratifoidea, intoxicación alimentaria, tifoidea, neumonía, gonorrea, meningitis, clamidia, sífilis, difteria, lepra, paratuberculosis, tuberculosis, lupus, botulismo, gangrena, tétano, impétigo, fiebre reumática, escarlatina, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel (por ejemplo, celulitis, dermatomycosis), toxemia, infecciones del tracto urinario, infecciones de heridas. Pueden usarse polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL para tratar o detectar cualquiera de estos síntomas o enfermedades.

Además, agentes parasitarios que provocan enfermedad o síntomas que pueden tratarse o detectarse con polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL incluyen, pero no se limitan a, las siguientes familias: amebiasis, babesiosis, coccidiosis, criptosporidiosis, dientamoebiasis, durina, ectoparásitas, giardiasis, helmintiasis, leishmaniasis, teileriasis, toxoplasmosis, tripanosomiasis y tricomonas. Estos parásitos pueden provocar una variedad de enfermedades o síntomas, que incluyen, pero no se limitan a: sarna, trombiculiasis, infecciones del ojo, enfermedad intestinal (por ejemplo, disentería, giardiasis), enfermedad del hígado, enfermedad del pulmón, infecciones oportunistas (por ejemplo, relacionadas con el SIDA), malaria, complicaciones del embarazo, y toxoplasmosis. Pueden usarse polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL para tratar o detectar cualquiera de estos síntomas o enfermedades.

Preferiblemente, el tratamiento usando los polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL puede ser o bien administrando una cantidad eficaz de polipéptido de CRCGCL al paciente, o bien extrayendo células del paciente, suministrando a las células polinucleótido de CRCGCL, y devolviendo las células modificadas por ingeniería al paciente (terapia *ex vivo*). Además, pueden usarse el polipéptido o polinucleótido de CRCGCL como un antígeno en una vacuna para dar lugar a una respuesta inmunitaria contra enfermedades infecciosas.

Regeneración

Pueden usarse polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL para diferenciar, proliferar y atraer células, lo que conduce a la regeneración de tejidos (véase, *Science* 276:59-87 (1997)). La regeneración de tejidos puede usarse para reparar, sustituir o proteger tejido dañado por defectos congénitos, traumatismo (heridas, quemaduras, incisiones, o úlceras), edad, enfermedad (por ejemplo osteoporosis, osteoartritis, enfermedad periodontal, insuficiencia hepática), cirugía, incluyendo cirugía plástica estética, fibrosis, lesión tras reperusión, o lesión por citocinas sistémicas.

Los tejidos que pueden regenerarse usando la presente invención incluyen órganos (por ejemplo, páncreas, hígado, intestino, riñón, piel, endotelio), músculo (liso, esquelético o cardíaco), vasculatura (incluyendo vascular y linfática), tejido nervioso, hematopoyético, y esquelético (hueso, cartílago, tendón y ligamento). Preferiblemente, la regeneración se produce sin cicatrización o con disminución de la cicatrización. La regeneración también puede incluir angiogénesis.

Además, los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL pueden aumentar la regeneración de tejidos difíciles de cicatrizar. Por ejemplo, el aumento de la regeneración de tendón/ligamento acelerará el tiempo de recuperación tras la lesión. Los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL de la presente invención también pueden usarse de manera profiláctica en un esfuerzo por evitar la lesión. Enfermedades específicas que pueden tratarse incluyen tendinitis, síndrome del túnel carpiano, y otros defectos del ligamento o tendón. Un ejemplo adicional de la regeneración tisular de las heridas que no cicatrizan incluye úlceras de presión, úlceras asociadas con insuficiencia vascular, heridas quirúrgicas y traumáticas.

De manera similar, también puede regenerarse el tejido nervioso y cerebral usando los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL para proliferar y diferenciar células nerviosas. Enfermedades que pueden tratarse usando este

método incluyen enfermedades del sistema nervioso central y periférico, neuropatías, o trastornos mecánicos y traumáticos (por ejemplo, trastornos de la médula espinal, traumatismo craneal, enfermedad cerebrovascular, y accidente cerebrovascular). Específicamente, pueden tratarse todas las enfermedades asociadas con lesiones de nervios periféricos, neuropatía periférica (por ejemplo, resultante de quimioterapia u otras terapias médicas), neuropatías localizadas, y enfermedades del sistema nervioso central (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, y síndrome de Shy-Drager), usando los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL.

Quimiotaxis

Los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL pueden tener actividad quimiotáctica. Una molécula quimiotáctica atrae o moviliza células (por ejemplo, monocitos, fibroblastos, neutrófilos, células T, mastocitos, eosinófilos, células epiteliales y/o endoteliales), a un sitio particular en el organismo, tal como la inflamación, infección, o sitio de hiperproliferación. Las células movilizadas pueden entonces rechazar y/o curar el traumatismo o la anomalía particular.

Los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL pueden aumentar la actividad quimiotáctica de células particulares. Entonces, estas moléculas quimiotácticas pueden usarse para tratar inflamación, infección, trastornos hiperproliferativos, o cualquier trastorno del sistema inmunitario aumentando el número de células dirigidas a para una ubicación particular en el organismo. Por ejemplo, las moléculas quimiotácticas pueden usarse para tratar heridas y otros traumatismos en los tejidos atrayendo células inmunitarias a la ubicación lesionada. Como una molécula quimiotáctica, el CRCGCL también pueden atraer fibroblastos, que pueden usarse para tratar heridas.

También se prevé que los polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL puedan inhibir la actividad quimiotáctica. Estas moléculas también pueden usarse para tratar trastornos. Por tanto, pueden usarse polinucleótidos o polipéptidos de CRCGCL como un inhibidor de la quimiotaxis.

Actividad de unión

Pueden usarse polipéptidos de CRCGCL para seleccionar moléculas que se unen a CRCGCL o para seleccionar moléculas a las que se une CRCGCL. La unión de CRCGCL y la molécula puede activar (agonista), aumentar, inhibir (antagonista), o disminuir la actividad del CRCGCL o la molécula unida. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos, oligonucleótidos, proteínas (por ejemplo, receptores), o moléculas pequeñas.

Preferiblemente, la molécula está estrechamente relacionado con el ligando natural de CRCGCL, por ejemplo, un fragmento del ligando, o un sustrato natural, un ligando, o un agente mimético estructural o funcional (véase, Coligan *et al.*, Current Protocols in Immunology 1 (2): Capítulo 5 (1991)). De manera similar, la molécula puede estar estrechamente relacionada con el receptor natural al que se une CRCGCL, o al menos, un fragmento del receptor que puede unirse a CRCGCL (por ejemplo, sitio activo). En cualquier caso, la molécula puede diseñarse de manera racional usando técnicas conocidas.

Preferiblemente, la selección de estas moléculas implica producir células apropiadas que expresan CRCGCL, o bien como una proteína secretada o bien en la membrana celular. Las células preferidas incluyen células de mamíferos, levadura, *Drosophila*, o *E. coli*. Entonces, preferiblemente se ponen en contacto las células que expresan CRCGCL (o membrana celular que contiene el polipéptido expresado) con un compuesto de prueba que posiblemente contiene la molécula para observar la unión, estimulación, o inhibición de la actividad o bien de CRCGCL o bien de la molécula.

El ensayo puede simplemente someter a prueba la unión de un compuesto candidato a CRCGCL, en el que se detecta la unión mediante un marcador, o en un ensayo que implica la competición con un competidor marcado. Además, el ensayo puede someter a prueba si el compuesto candidato da como resultado una señal generada por la unión a CRCGCL.

Alternativamente, el ensayo puede llevarse a cabo usando preparaciones libres de células, polipéptido/molécula fijados en un soporte sólido, bibliotecas químicas, o mezclas de productos naturales. El ensayo también puede simplemente comprender las etapas de mezclar un compuesto candidato con una disolución que contiene CRCGCL, medir la unión o actividad de CRCGCL/molécula, y comparar la unión o actividad de CRCGCL/molécula con un patrón.

Preferiblemente, un ensayo de ELISA puede medir el nivel o la actividad de CRCGCL en una muestra (por ejemplo, muestra biológica) usando un anticuerpo monoclonal o policlonal. El anticuerpo puede medir el nivel o la actividad de CRCGCL o bien uniéndose, directa o indirectamente, a CRCGCL o bien compitiendo con CRCGCL por un sustrato.

Todos estos ensayos anteriores pueden usarse como marcadores de diagnóstico o pronóstico. Las moléculas descubiertas usando estos ensayos pueden usarse para tratar una enfermedad o para provocar un resultado particular en un paciente (por ejemplo, crecimiento de vasos sanguíneos) activando o inhibiendo el CRCGCL/molécula. Además, los ensayos pueden descubrir agentes que pueden inhibir o potenciar la producción de CRCGCL a partir de células o tejidos manipulados adecuadamente.

Por tanto, la descripción incluye un método de identificación de compuestos que se unen a CRCGCL que comprenden las etapas de: (a) incubar un compuesto candidato de unión con CRCGCL; y (b) determinar si se ha producido la

unión. Además, la invención incluye un método de identificación de agonistas/antagonistas que comprende las etapas de: (a) incubar un compuesto candidato con CRCGCL, (b) someter a ensayo una actividad biológica, y (b) determinar si se ha alterado una actividad biológica de CRCGCL.

5 *Antisentido y ribozima (antagonistas)*

En realizaciones específicas, un ácido nucleico antisentido o ribozima según la presente invención puede unirse a ácidos nucleicos correspondientes a las secuencias contenidas en SEQ ID NO: 1, y/o a secuencias de nucleótidos contenidas en el clon depositado 209641 ó 209691 e inhibir así la producción del polipéptido. En una realización, se genera la secuencia antisentido internamente por el organismo, en otra realización, se administra la secuencia antisentido separadamente (véase, por ejemplo, O'Connor, J., *Neurochem.* 56:560 (1991). *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Ratón, FL (1988)). Puede usarse tecnología antisentido para controlar la expresión génica a través de ARN o ADN antisentido, o a través de la formación de triple hélice. Técnicas antisentido se tratan por ejemplo, en Okano, J., *Neurochem.* 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, Boca Ratón, FL (1988). Se trata la formación de triple hélice en, por ejemplo, Lee *et al.*, *Nucleic Acids Research* 6:3073 (1979); Cooney *et al.*, *Science* 241:456 (1988); y Dervan *et al.*, *Science* 251:1300 (1991). Los métodos se basan en la unión de un polinucleótido a un ARN o ADN complementario.

Por ejemplo, puede usarse la parte codificante en 5' de un polinucleótido que codifica para el polipéptido maduro de la presente invención para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de desde aproximadamente 10 hasta 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para ser complementario a una región del gen implicada en la transcripción previniendo de ese modo la transcripción y la producción del receptor. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido receptor.

En una realización, el ácido nucleico antisentido de CRCGCL de la invención se produce intracelularmente mediante transcripción de una secuencia exógena. Por ejemplo, se transcribe un vector o una parte del mismo, produciendo un ácido nucleico antisentido (ARN) de la invención. Un vector de este tipo contendrá una secuencia que codifica para el ácido nucleico antisentido de CRCGCL. Un vector de este tipo puede permanecer episomal o pasar a integrarse cromosómicamente, siempre que pueda transcribirse para producir el ARN antisentido deseado. Pueden construirse tales vectores mediante métodos de tecnología de ADN recombinante convencionales en la técnica. Los vectores pueden ser plásmidos, virales, u otros conocidos en la técnica, usados para replicación y expresión en células de vertebrados. La expresión de la secuencia que codifica para CRCGCL, o fragmentos de la misma, puede ser mediante cualquier promotor que se conoce en la técnica que actúa en células de vertebrados, preferiblemente humanas. Tales promotores pueden ser inducibles o constitutivos. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a, la región del promotor temprano de SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature* 29:304-310 (1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto *et al.*, *Cell* 22:787-797 (1980), el promotor de timidina del herpes (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445 (1981), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster, *et al.*, *Nature* 296:39-42 (1982)), etc.

Los ácidos nucleicos antisentido de la invención comprenden una secuencia complementaria a al menos una parte de un transcrito de ARN de un gen de CRCGCL. Sin embargo, aunque se prefiere la complementariedad absoluta, no se requiere. Una secuencia "complementaria a al menos una parte de un ARN", a la que se hace referencia en el presente documento, significa una secuencia que tiene complementariedad suficiente para que pueda hibridarse con el ARN, formando un dúplex estable; en el caso de ácidos nucleicos antisentido de CRCGCL bicatenarios, puede someterse a prueba así una cadena simple del ADN dúplex, o puede someterse a ensayo la formación del triplex. La capacidad de hibridar dependerá de tanto el grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico antisentido. Generalmente, cuanto más largo es el ácido nucleico de hibridación, más apareamientos erróneos de bases con un ARN de CRCGCL puede contener y todavía formar un dúplex estable (o triplex según sea el caso). Un experto en la técnica puede determinar un grado tolerable de apareamiento erróneo mediante el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

Oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del mensaje, por ejemplo, la secuencia no traducida en 5' hasta e incluyendo el codón de iniciación AUG, deben funcionar los más eficazmente en la inhibición de la traducción. Sin embargo, se ha mostrado que secuencias complementarias a las secuencias no traducidas en 3' de los ARNm también son eficaces en la inhibición de la traducción de los ARNm; véase generalmente, Wagner, R., 1994, *Nature* 372:333-335. Por tanto, pueden usarse oligonucleótidos complementarios a las regiones no codificantes, no traducidas, o bien en 5' o bien en 3' de CRCGCL mostradas en las figuras 1A-1B en un enfoque antisentido para inhibir la traducción de ARNm de CRCGCL endógeno. Los oligonucleótidos complementarios a la región no traducida en 5' del ARNm deben incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos antisentido complementarios a regiones codificantes de ARNm son inhibidores menos eficaces de la traducción pero pueden usarse según la invención. Ya sea diseñado para hibridarse con la región en 5', 3' o codificante de ARNm de CRCGCL, los ácidos nucleicos antisentido deben ser de al menos seis nucleótidos de longitud, y son preferiblemente oligonucleótidos que oscilan desde 6 hasta aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos, al menos 17 nucleótidos, al menos 25 nucleótidos o al menos 50 nucleótidos.

Los polinucleótidos de la invención pueden ser ADN o ARN o mezclas químicas o derivados o versiones modificadas de los mismos, monocatenarios o bicatenarios. Puede modificarse el oligonucleótido en el resto de base, resto

de azúcar, o estructura principal fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos adjuntos tales como péptidos (por ejemplo, para seleccionar como diana receptores de células huésped *in vivo*), o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre *et al.*, 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; publicación PCT n.º WO88/09810, publicada el 15 de diciembre de 1988) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, publicación PCT n.º WO89/10134, publicada el 25 de abril de 1988), agentes de escisión activados por hibridación (véase, por ejemplo, Krol *et al.*, 1988, BioTechniques 6:958-976) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549). Para este fin, puede conjugarse el oligonucleótido con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de reticulación activado por hibridación, agente de transporte, agente de escisión activado por hibridación, etc.

El oligonucleótido antisentido puede comprender al menos un resto de base modificada que se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo beta-D-manosilqueosina, 5-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w, y 2,6-diaminopurina.

El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa.

En aún otra realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos una estructura principal de fosfato modificada seleccionada del grupo que incluye, pero no se limita a, un fosforotioato, un fosforoditioato, un fosforamidotioato, un fosforamidato, un fosforodiamidato, un metilfosfonato, un fosfotriéster alquílico, y un formacetal o análogo del mismo.

En aún otra realización, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido a-anomérico. Un oligonucleótido a-anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en los que, al contrario que las unidades b habituales, las cadenas transcurren paralelas entre sí (Gautier *et al.*, 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641). El oligonucleótido es un 2-O-metilribonucleótido (Inoue *et al.*, 1987, Nucl. Acids Res. 15:6131-6148), o un análogo ARN-ADN quimérico (Inoue *et al.*, 1987, FEBS Lett. 215:327-330).

Pueden sintetizarse polinucleótidos de la invención mediante métodos convencionales conocidos en la técnica, por ejemplo mediante el uso de un sintetizador de ADN automático (tal como están disponibles comercialmente en Biosearch, Applied Biosystems, etc.). Como ejemplos, pueden sintetizarse oligonucleótidos de fosforotioato mediante el método de Stein *et al.* (1988, Nucl. Acids Res. 16:3209), pueden prepararse oligonucleótidos de metilfosfonato mediante el uso de soportes de polímero de vidrio con poros controlados (Sarin *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:7448-7451), etc.

Aunque pueden usarse nucleótidos antisentido complementarios a la secuencia de la región codificante de CRCG-CL, los más preferidos son los complementarios a la región no traducida transcrita.

La invención también incluye ARN catalítico, o una ribozima (véase, por ejemplo, la publicación internacional PCT WO 90/11364, publicada el 4 de octubre de 1990; Sarver *et al.*, Science 247:1222-1225 (1990)). Aunque pueden usarse ribozimas que escinden ARNm en secuencias de reconocimiento específico de sitio para destruir los ARNm de CRCGCL, se prefiere el uso de ribozimas con cabeza de martillo. Las ribozimas con cabeza de martillo escinden los ARNm en ubicaciones dictadas por regiones de flanqueo que forman pares de bases complementarios con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana tenga la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas con cabeza de martillo se conoce bien en la técnica y se describe más completamente en Haseloff y Gerlach, Nature 334:585-591 (1988). Existen numerosos sitios posibles de escisión de la ribozima de cabeza de martillo dentro de la secuencia de nucleótidos de CRCGCL (figuras 1A-1B). Preferiblemente, se modifica por ingeniería la ribozima de modo que el sitio de reconocimiento de escisión se ubica cerca del extremo 5' del ARNm de CRCGCL; es decir, para aumentar la eficacia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcional.

Tal como en el enfoque antisentido, las ribozimas de la invención pueden estar compuestas por oligonucleótidos modificados (por ejemplo para mejorar la estabilidad, selección como diana, etc.) y deben administrarse a células que expresan CRCGCL *in vivo*. Pueden introducirse construcciones de ADN que codifican para la ribozima en la célula de la misma manera tal como se describió anteriormente para la introducción de ADN codificante antisentido. Un método preferido de administración implica usar una construcción de ADN "que codifica para" la ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, tal como, por ejemplo, promotor de pol III o pol II, de modo que las células transfectadas producirán cantidades suficientes de la ribozima para destruir mensajes de CRCGCL endógenos e inhibir la traducción. Dado que las ribozimas a diferencia de moléculas antisentido, son catalíticas, se requiere una concentración intracelular inferior para su eficacia.

Otras actividades

Los polipéptidos o polinucleótidos también de CRCGCL pueden aumentar o disminuir la diferenciación o proliferación de células madre embrionarias, además de, tal como se trató anteriormente, linaje hematopoyético.

También pueden usarse polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL para modular características de mamíferos, tales como altura, peso, color de cabello, color de ojos, piel, porcentaje de tejido adiposo, pigmentación, tamaño, y forma corporal (por ejemplo, cirugía estética). De manera similar, pueden usarse polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL para modular el metabolismo de mamíferos que afecta al catabolismo, anabolismo, procesamiento, utilización, y almacenamiento de energía.

Pueden usarse polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL para cambiar el estado mental o estado físico de un mamífero o influyendo sobre biorritmos, ritmo cardíaco, depresión (incluyendo trastornos depresivos), tendencia a la violencia, tolerancia al dolor, capacidades reproductivas (preferiblemente mediante actividad de tipo ovina o inhibina), niveles hormonales o endocrinos, apetito, libido, memoria, estrés, u otras cualidades cognitivas.

También pueden usarse polipéptidos o polinucleótidos de CRCGCL como un aditivo o conservante alimenticio, tal como para aumentar o disminuir las capacidades de almacenamiento, contenido en grasa, lípidos, proteínas, hidratos de carbono, vitaminas, minerales, cofactores u otros componentes nutricionales.

Habiendo descrito de manera general la invención, la misma se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que sean limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de clon de ADNc de CRCGCL a partir de la muestra depositada

Se inserta el ADNc de CRCGCL en el sitio de clonación múltiple EcoRI/XhoI de Uni-ZAP XR (Stratagene). Uni-ZAP XR contiene un gen de resistencia a ampicilina y puede transformarse en la cepa DH10B de *E. coli*, disponible en Life Technologies. (Véase, por ejemplo, Gruber, C. E., *et al.*, *Focus* 15:59-(1993)).

Pueden usarse dos enfoques para aislar CRCGCL a partir de la muestra depositada. En primer lugar, se transforma el clon depositado en un huésped adecuado (tal como XL-1 Blue (Stratagene)) usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como las proporcionadas por el proveedor de vectores o en publicaciones o patentes relacionadas. Se siembran los transformantes sobre placas con agar al 1,5% (que contienen el agente de selección apropiado, por ejemplo, ampicilina) a una densidad de aproximadamente 150 transformantes (colonias) por placa. Entonces se usa una sola colonia para generar ADN usando técnicas de aislamiento de ácido nucleico bien conocidas por los expertos en la técnica. (Por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Alternativamente, se sintetizan dos cebadores de 17-20 nucleótidos derivados de ambos extremos de la SEQ ID NO: 1 (es decir, dentro de la región de SEQ ID NO: 1 unidos por el NT en 5' y el NT en 3' del clon) y se usan para amplificar el ADNc de CRCGCL usando el plásmido de ADNc depositado como molde. Se lleva a cabo la reacción en cadena de la polimerasa en condiciones de rutina, por ejemplo, en 25 ul de mezcla de reacción con 0,5 ug del molde de ADNc anterior. Una mezcla de reacción conveniente es MgCl₂ 1,5-5 mM, gelatina al 0,01% (p/v), 20 uM cada uno de dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 25 pmol de cada cebador y 0,25 unidades de Taq polimerasa. Se realizan treinta y cinco ciclos de PCR (desnaturalización a 94°C durante 1 min.; apareamiento a 55°C durante 1 min.; elongación a 72°C durante 1 min.) con un termociclador automatizado Perkin-Elmer Cetus. Se analiza el producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa y se escinde y se purifica la banda de ADN con peso molecular esperado. Se verifica que el producto de PCR es la secuencia seleccionada subclonando y secuenciando el producto de ADN.

Varios métodos están disponibles para la identificación de las partes no codificantes en 5' o 3' del gen de CRCGCL que pueden no estar presentes en el clon depositado. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, análisis con sondas con filtro, enriquecimiento del clon usando sondas específicas, y protocolos similares o idénticos a protocolos "RACE" en 5' y 3' que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, un método similar RACE en 5' está disponible para generar el extremo 5' ausente de un transcrito de longitud completa deseado. (Fromont-Racine *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21 (7):1683-1684 (1993)).

En resumen, un oligonucleótido de ARN específico se liga a los extremos 5' de una población de ARN que supuestamente contiene transcritos de ARN de gen de longitud completa. Un primer conjunto que contiene cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y cebador específico para una secuencia conocida del gen de CRCGCL de interés se usa para amplificar por PCR la parte en 5' del gen de longitud completa de CRCGCL. Entonces puede secuenciarse este producto amplificado y usarse para generar el gen de longitud completa.

Este método anterior se inicia con ARN total aislado a partir de la fuente deseada, aunque puede usarse poli-A+ ARN. Entonces puede tratarse la preparación de ARN con fosfatasa si es necesario para eliminar grupos fosfato en 5'

ES 2 357 020 T3

en ARN degradado o dañado que pueden interferir con la etapa de ARN ligasa posterior. Entonces debe inactivarse la fosfatasa y tratarse el ARN con pirofosfatasa ácida de tabaco con el fin de eliminar la estructura de la caperuza presente en los extremos 5' de los ARN mensajeros. Esta reacción deja un grupo fosfato 5' en el extremo 5' del ARN escindido de la caperuza que entonces puede ligarse a un oligonucleótido de ARN usando ARN ligasa T4.

5

Esta preparación de ARN modificado se usa como un molde para la síntesis de la primera cadena de ADNc usando un oligonucleótido específico de gen. Se usa la reacción de síntesis de la primera cadena como un molde para amplificación por PCR del extremo 5' deseado usando un cebador específico para el oligonucleótido de ARN ligado y un cebador específico para la secuencia conocida del gen de interés. Entonces se secuencian el producto resultante y se analiza para confirmar que la secuencia de extremo 5' pertenece al gen de CRGCL.

10

Ejemplo 2

Aislamiento de clones genómicos de CRGCL

15

Se examina una biblioteca P1 genómica humana (Genomic Systems, Inc.) mediante PCR usando cebadores seleccionados para seleccionar la secuencia de ADNc correspondiente a SEQ ID NO: 1, según el método descrito en el ejemplo 1. (Véase también, Sambrook).

20 Ejemplo 3

Distribución tisular de polipéptidos de CRGCL

Se determina la distribución tisular de la expresión de ARNm de CRGCL usando protocolos para análisis de transferencia de tipo Northern, descritos, entre otros, por Sambrook *et al.* Por ejemplo, se marca una sonda de CRGCL producida por el método descrito en el ejemplo 1 con P³² usando el sistema de marcaje de ADN RediprimeTM (Amersham Life Science), según las instrucciones del fabricante. Tras el marcaje, se purifica la sonda usando una columna CHROMA SPIN-100TM (Clontech Laboratories, Inc.), según el número de protocolo del fabricante PT 1200-1. Entonces se usa la sonda marcada purificada para examinar diversos tejidos humanos para determinar la expresión de ARNm.

30

Se examinan transferencias de tipo Northern de múltiples tejidos (MTN) que contienen diversos tejidos humanos (H) o tejidos de sistema inmunitario humano (IM) (Clontech) con la sonda marcada usando disolución de hibridación ExpressHybTM (Clontech) según el número de protocolo del fabricante PT 1190-1. Tras la hibridación y el lavado, las transferencias se montan y se exponen a película a -70°C durante la noche, y se revelan las películas según procedimientos convencionales.

35

Ejemplo 4

Mapeo cromosómico de CRGCL

Se diseña un conjunto de cebadores oligonucleotídicos se diseña según la secuencia en el extremo 5' de SEQ ID NO: 1. Preferiblemente, este cebador abarca aproximadamente 100 nucleótidos. Entonces se usa este conjunto de cebadores en una reacción en cadena de la polimerasa en el siguiente conjunto de condiciones: 30 segundos, 95°C; 1 minuto, 56°C; 1 minuto, 70°C. Este ciclo se repite 32 veces seguido por un ciclo de 5 minutos a 70°C. Se usa ADN de humano, ratón, y hámster como molde además de un panel de híbridos de células somáticas que contiene cromosomas individuales o fragmentos cromosómicos (Bios, Inc). Las reacciones se analizan o bien en geles de poliacrilamida al 8% o bien en geles de agarosa al 3,5%. Se determina el mapeo del cromosoma mediante la presencia de un fragmento de PCR de aproximadamente 100 pb en el híbrido de células somáticas particular.

50

Ejemplo 5

Expresión bacteriana de CRGCL

Se amplifica el polinucleótido de CRGCL que codifica para un polipéptido de CRGCL de la invención usando cebadores oligonucleotídicos para PCR correspondientes para los extremos 5' y 3' de la secuencia de ADN, tal como se explica resumidamente en el ejemplo 1, para sintetizar fragmentos de inserción. Preferiblemente, los cebadores usados para amplificar el inserto de ADNc deben contener sitios de restricción, tales como BamHI y XbaI, en el extremo 5' de los cebadores con el fin de clonar el producto amplificado en el vector de expresión. Por ejemplo, BamHI y XbaI corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión bacteriano pQE-9 (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). Este vector de plásmido codifica para resistencia a antibióticos (Amp^r), un origen de replicación bacteriano (ori), un promotor/operador que puede regularse por IPTG (P/O), un sitio de unión a ribosoma (RBS), una etiqueta de 6-histidina (6-His), y sitios de clonación de enzimas de restricción.

60

Específicamente, para clonar la proteína de CRGCL en un vector bacteriano, el cebador 5' tiene la secuencia 5' gttaggccatgggaggagcagcagaagga 3' (SEQ ID NO: 14) que contiene el sitio de restricción Nco I seguido por una serie de nucleótidos de la secuencia codificante aminoterminal de la secuencia de CRGCL en SEQ ID NO: 1. Un experto en la técnica apreciaría, evidentemente, que el punto en la secuencia que codifica para la proteína en el que

65

ES 2 357 020 T3

comienza el cebador 5' puede variarse para amplificar un segmento de ADN que codifica para cualquier parte deseada de la proteína completa de CRCGCL más corta o más larga que la parte descrita anteriormente. El cebador 3' tiene la secuencia 5' ggtaaagatctcaacgccagtaggagcggtc 3' (SEQ ID NO: 15) que contiene el sitio de restricción BglIII seguido por una serie de nucleótidos complementarios al extremo 3' de la secuencia codificante de la secuencia de ADN de CRCGCL de SEQ ID NO: 1.

Se digiere el vector pQE-9 con BamHI y XbaI y se liga el fragmento amplificado en el vector pQE-9 manteniendo el marco de lectura iniciado en el RBS bacteriano. Entonces se usa la mezcla de ligamiento para transformar la cepa M15/rep4 de *E. coli* (Qiagen, Inc.) que contiene copias múltiples del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y también confiere resistencia a kanamicina (Kan^r). Se identifican los transformantes por su capacidad para crecer sobre placas de LB y se seleccionan las colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. Se aísla el ADN de plásmido y se confirma mediante análisis de restricción.

Se hacen crecer clones que contienen las construcciones deseadas durante la noche (O/N) en cultivo líquido en medios de LB complementados tanto con Amp (100 ug/ml) como con Kan (25 ug/ml). Se usa el cultivo O/N para inocular un cultivo grande a una razón de 1:100 a 1:250. Se hacen crecer las células a una densidad óptica 600 (D.O.⁶⁰⁰) de entre 0,4 y 0,6. Después se añade IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM. IPTG se induce inactivando el represor lacI, aclarando el P/O lo que conduce a expresión génica aumentada.

Se hacen crecer las células durante unas 3 a 4 horas más. Después se recogen las células mediante centrifugación (20 min. a 6000Xg). Se solubiliza el sedimento celular en el agente caotrópico guanidina HCl 6 Molar agitando durante 3-4 horas a 4°C. Se elimina el residuo celular mediante centrifugación, y se carga el sobrenadante que contiene el polipéptido sobre una columna de resina de afinidad de níquel-ácido nitrilo-tri-acético ("Ni-NTA") (disponible de QIAGEN, Inc., citado anteriormente). Las proteínas con una etiqueta de 6 x His se unen a la resina Ni-NTA con alta afinidad y pueden purificarse en un procedimiento sencillo de una etapa (para detalles véase: The QIAexpressionist (1995) QIAGEN, Inc., citado anteriormente).

En resumen, se carga el sobrenadante sobre la columna en guanidina HCl 6 M, pH 8, primero se lava la columna con 10 volúmenes de guanidina HCl 6 M, pH 8, después se lava con 10 volúmenes de guanidina HCl 6 M, pH 6, y finalmente se eluye el polipéptido con guanidina-HCl 6 M, pH 5.

Entonces se renaturaliza la proteína de CRCGCL purificada dializándola contra solución salina tamponada con fosfato (PBS) o acetato de Na 50 mM, tampón a pH 6 más NaCl 200 mM. Alternativamente, puede replegarse satisfactoriamente la proteína de CRCGCL mientras está inmovilizada en la columna de Ni-NTA. Las condiciones recomendadas son las siguientes: renaturalizar usando un gradiente de urea 6 M-1 M lineal en NaCl 500 mM, glicerol al 20%, Tris/HCl 20 mM, pH 7,4, que contiene inhibidores de proteasas. La renaturalización debe realizarse durante un período de 1,5 horas o más. Tras la renaturalización se eluyen las proteínas mediante adición de imidazol 250 mM. Se elimina imidazol mediante una etapa dializante final contra PBS o acetato de sodio 50 mM, tampón a pH 6 más NaCl 200 mM. Se almacena la proteína de CRCGCL purificada a 4°C o se congela a -80°C.

Además del vector de expresión anterior, la presente invención incluye además un vector de expresión que comprende elementos operadores y promotores de fagos operativamente unidos a un polinucleótido de CRCGCL, denominado pHE4a (número de registro de ATCC 209645, depositado el 25 de febrero de 1998). Este vector contiene: 1) un gen de neomicinofosfotransferasa como marcador de selección, 2) un origen de replicación de *E. coli*, 3) una secuencia promotora de fago T5, 4) dos secuencias operadoras lac, 5) una secuencia Shine-Delgarno, y 6) el gen represor de operón de lactosa (lacIq). El origen de replicación (oriC) se deriva de pUC19 (LTI, Gaithersburg, MD). La secuencia promotora y las secuencias operadoras se preparan sintéticamente.

Puede insertarse ADN en el pHEa restringiendo el vector con NdeI y XbaI, BamHI, XhoI, o Asp718, corriendo el producto restringido en un gel, y aislando el fragmento más grande (el fragmento más grande debe ser de aproximadamente 310 pares de bases). Se genera el inserto de ADN según el protocolo de PCR descrito en el ejemplo 1, usando cebadores para PCR que tienen sitios de restricción para NdeI (cebador 5') y XbaI, BamHI, XhoI, o Asp718 (cebador 3'). Se purifica en gel el inserto obtenido por PCR y se restringe con enzimas compatibles. Se ligan el inserto y el vector según protocolos convencionales.

El vector modificado por ingeniería podrá sustituirse fácilmente en el protocolo anterior para expresar la proteína en un sistema bacteriano. Más preferiblemente, también puede usarse el vector de expresión bacteriano, pQE60, para expresar CRCGCL.

Ejemplo 6

Purificación de polipéptido de CRCGCL a partir de un cuerpo de inclusión

Puede usarse el siguiente método alternativo para purificar polipéptido de CRCGCL expresado en *E. coli* cuando está presente en forma de cuerpos de inclusión. A menos que se especifique lo contrario, todas las siguientes etapas se llevan a cabo a 4-10°C.

ES 2 357 020 T3

Tras la finalización de la fase de producción de la fermentación de *E. coli*, se enfría el cultivo celular hasta 4-10°C y se recogen las células mediante centrifugación continua a 15.000 rpm (Heraeus Sepatech). Basándose en el rendimiento esperado de proteína por unidad de peso de pasta celular y la cantidad de proteína purificada requerida, se suspende una cantidad apropiada de pasta celular, en peso, en una disolución tampón que contiene Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4. Se dispersan las células en una suspensión homogénea usando una mezcladora de alta cizalladura.

Entonces se lisan las células pasando la disolución a través de un microfluidizador (Microfluidics, Corp. o APV Gaulin, Inc.) dos veces a 4000-6000 psi. Después se mezcla el homogenizado con disolución de NaCl hasta una concentración final de NaCl 0,5 M, seguido por centrifugación a 7000 xg durante 15 min. Se lava de nuevo el sedimento resultante usando NaCl 0,5 M, Tris 100 mM, EDTA 50 mM, pH 7,4.

Se solubilizan los cuerpos de inclusión lavados resultantes con clorhidrato de guanidina (GuHCl) 1,5 M durante 2-4 horas. Tras centrifugación a 7000 xg durante 15 min., se descarta el sedimento y se incuba el sobrenadante que contiene polipéptido a 4°C durante la noche para permitir extracción de GuHCl adicional.

Tras la centrifugación a alta velocidad (30.000 xg) para eliminar partículas insolubles, se repliega la proteína solubilizada de GuHCl mezclando rápidamente el extracto de GuHCl con 20 volúmenes de tampón que contiene sodio 50 mM, pH 4,5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM mediante agitación vigorosa. La disolución de proteína diluida replegada se mantiene a 4°C sin mezclar durante 12 horas antes de las etapas de purificación adicionales.

Para clarificar la disolución de polipéptido replegado, se emplea una unidad de filtración tangencial preparada anteriormente equipada con filtro de membrana de 0,16 µm con área de superficie apropiada (por ejemplo, Filtron), equilibrada con acetato de sodio 40 mM, pH 6,0. Se carga la muestra filtrada sobre una resina de intercambio catiónico (por ejemplo, Poros HS-50, Perseptive Biosystems). Se lava la columna con acetato de sodio 40 mM, pH 6,0 y se eluye con NaCl 250 mM, 500 mM, 1000 mM y 1500 mM en el mismo tampón, de una manera gradual. Se monitoriza continuamente la absorbancia a 280 nm del efluente. Se recogen fracciones y se analizan adicionalmente mediante SDS-PAGE.

Entonces se combinan las fracciones que contienen el polipéptido de CRCGCL y se mezclan con 4 volúmenes de agua. Después se carga la muestra diluida sobre un conjunto preparado anteriormente de columnas en tándem de resinas de intercambio de aniones fuertes (Poros HQ-50, Perseptive Biosystems) y aniones débiles (Poros CM-20, Perseptive Biosystems). Se equilibran las columnas con acetato de sodio 40 mM, pH 6,0. Se lavan ambas columnas con acetato de sodio 40 mM, pH 6,0, NaCl 200 mM. Entonces se eluye la columna CM-20 usando un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna que oscila desde NaCl 0,2 M, acetato de sodio 50 mM, pH 6,0 hasta NaCl 1,0 M, acetato de sodio 50 mM, pH 6,5. Se recogen fracciones con monitorización A₂₈₀ constante del efluente. Entonces se combinan las fracciones que contienen el polipéptido (determinado, por ejemplo, mediante SDS-PAGE al 16%).

El polipéptido de CRCGCL resultante debe presentar más del 95% de pureza tras las etapas de replegamiento y purificación anteriores. No deben observarse bandas principales contaminantes en gel de SDS-PAGE al 16% teñido con azul de Commassie cuando se carga 5 µg de proteína purificada. También puede someterse a prueba la proteína de CRCGCL purificada para determinar la contaminación por endotoxina/LPS, y normalmente el contenido en LPS es menor que 0,1 ng/ml según ensayos LAL.

Ejemplo 7

Clonación y expresión de CRCGCL en un sistema de expresión de baculovirus

En este ejemplo, se usa el vector lanzadera de plásmido pA2 para insertar polinucleótido de CRCGCL en un baculovirus para expresar CRCGCL. Este vector de expresión contiene el promotor de polihedrina fuerte del virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcMNPV) seguido por sitios de restricción convenientes tales como BamHI, Xba I y Asp718. Se usa el sitio de poliadenilación del virus del simio 40 ("SV40") para una poliadenilación eficaz. Para la selección fácil de virus recombinante, el plásmido contiene el gen de beta-galactosidasa de *E. coli* bajo el control de un promotor de *Drosophila* débil en la misma orientación, seguido por la señal de poliadenilación del gen de polihedrina. Se flanquean los genes insertados en ambos lados mediante secuencias virales para recombinación homóloga mediada por células con ADN viral de tipo natural para generar un virus viable que expresa el polinucleótido de CRCGCL clonado.

Pueden usarse muchos otros vectores de baculovirus en lugar del vector anterior, tal como pAc373, pVL941, y pAcIM1, como apreciará fácilmente un experto en la técnica, siempre que la construcción proporcione señales ubicadas apropiadamente para la transcripción, traducción, secreción y similares, incluyendo un péptido de señal y un AUG en marco tal como se requiere. Tales vectores se describen, por ejemplo, en Luckow *et al.*, *Virology* 170:31-39 (1989).

Específicamente, la secuencia de ADNc de CRCGCL contenida en el clon depositado, incluyendo el codón de iniciación de AUG y cualquier secuencia líder asociada de manera natural, se amplifica usando el protocolo de PCR descrito en el ejemplo 1. Si se usa la secuencia señal que se produce de manera natural para producir la proteína secretada, el vector pA2 no necesita un segundo péptido de señal. Alternativamente, puede modificarse el vector (pA2 GP) para incluir una secuencia líder de baculovirus, usando los métodos convencionales descritos en Summers *et al.*,

ES 2 357 020 T3

“A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Process”, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555 (1987).

Más específicamente, la secuencia de ADNc que codifica para la proteína de CRCGCL de longitud completa en el clon depositado, incluyendo el codón de iniciación de AUG y la secuencia líder asociada de manera natural mostrada en SEQ ID NO: 1, se amplifica usando cebadores oligonucleotídicos para PCR correspondientes a las secuencias 5' y 3' del gen. El cebador 5' tiene la secuencia 5' ccggttagatctgccatcatggccttggggcaaggagg 3' (SEQ ID NO: 16) que contiene el sitio de enzima de restricción BglII, una señal eficaz para la iniciación de traducción en células eucariotas (Kozak, M., *J. Mol. Biol.* 196:947-950 (1987)), seguido por varios nucleótidos de la secuencia de la proteína de CRCGCL completa mostrada en las figuras 1A-1B, que comienzan con el codón de iniciación de AUG. El cebador 3' tiene la secuencia 5' ccggttctagatcacaaggccacgtaggagcggtc 3' (SEQ ID NO: 17) que contiene el sitio de restricción XbaI seguido por una serie de nucleótidos complementarios con la secuencia no codificante 3' en las figuras 1A-1B.

Se aísla el fragmento amplificado a partir de un gel de agarosa al 1% usando un kit comercialmente disponible (“GeneClean”, BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). Entonces se digiere el fragmento con enzimas de restricción apropiadas y se purifica de nuevo en un gel de agarosa al 1%.

Se digiere el plásmido con las enzimas de restricción correspondientes y opcionalmente, puede desfosforilarse usando fosfatasa intestinal de ternero, usando procedimientos de rutina conocidos en la técnica. Después se aísla el ADN a partir de un gel de agarosa al 1% usando un kit comercialmente disponible (“GeneClean” BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.).

Se ligan el fragmento y el plásmido desfosforilado junto con ADN ligasa T4. Se transforman HB101 de *E. coli* u otros huéspedes *E. coli* adecuados tales como células XL-1 Blue (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA) con la mezcla de ligamiento y se extienden sobre placas de cultivo. Se identifican bacterias que contienen el plásmido digiriendo ADN de colonias individuales y analizando el producto de digestión mediante electroforesis en gel. Se confirma la secuencia del fragmento clonado mediante secuenciación de ADN.

Se transfectan conjuntamente cinco ug de un plásmido que contiene el polinucleótido con 1,0 ug de un ADN de baculovirus linealizado comercialmente disponible (“ADN de baculovirus BaculoGold™”, Pharmingen, San Diego, CA), usando el método de lipofección descrito por Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417 (1987). Se mezclan un ug de ADN de virus BaculoGold™ y 5 ug del plásmido en un pocillo estéril de una placa de microtitulación que contiene 50 ul de medio de Grace libre de suero (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). Después, se añaden 10 ul de Lipofectin más 90 ul de medio de Grace, se mezclan y se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente. Entonces se añade gota a gota la mezcla de transfección a células de insectos Sf9 (ATCC CRL 1711) sembradas en una placa de cultivo tisular de 35 mm con 1 ml de medio de Grace sin suero. Después se incuba la placa durante 5 horas a 27°C. Entonces se elimina la disolución de transfección de la placa y se añade 1 ml de medio para insectos de Grace complementado con suero de ternero fetal al 10%. Después se continúa el cultivo a 27°C durante cuatro días.

Tras cuatro días se recoge el sobrenadante y se realiza un ensayo de placa, tal como se describe por Summers y Smith, *citado anteriormente*. Se usa un gel de agarosa con “Blue Gal” (Life Technologies Inc., Gaithersburg) para permitir la fácil identificación y aislamiento de clones que expresan gal, que produce placas teñidas de azul. (También puede encontrarse una descripción detallada de un “ensayo de placa” de este tipo en la guía del usuario para cultivo de células de insectos y baculovirología distribuida por Life Technologies Inc., Gaithersburg, página 9-10). Tras la incubación apropiada, se cogen las placas teñidas de azul con la punta de una micropipeta (por ejemplo, Eppendorf). Entonces se resuspende el agar que contiene los virus recombinantes en un tubo de microcentrífuga que contiene 200 ul de medio de Grace y se usa la suspensión que contiene el baculovirus recombinante para infectar células Sf9 sembradas en placas de 35 mm. Cuatro días después se recogen los sobrenadantes de estas placas de cultivo y después se almacenan a 4°C.

Para verificar la expresión del polipéptido, se hacen crecer células Sf9 en medio de Grace complementado con FBS al 10% inactivado por calor. Se infectan las células con el baculovirus recombinante que contiene el polinucleótido a una multiplicidad de infección (“MOI”) de aproximadamente 2. Si se desean proteínas radiomarcadas, 6 horas después se retira el medio y se reemplaza con medio SF900 II menos metionina y cisteína (disponible en Life Technologies Inc., Rockville, MD). Tras 42 horas, se añaden 5 uCi de ³⁵S-metionina y 5 uCi de ³⁵S-cisteína (disponible en Amersham). Se incuban adicionalmente las células durante 16 horas y después se recogen mediante centrifugación. Se analizan las proteínas en el sobrenadante así como las proteínas intracelulares mediante SDS-PAGE seguido por autorradiografía (si está radiomarcada).

Puede usarse la microsecuenciación de la secuencia de aminoácidos del extremo amino-terminal de proteína purificada para determinar la secuencia amino-terminal de la proteína de CRCGCL producida.

Ejemplo 8

65 *Expresión de CRCGCL en células de mamíferos*

Puede expresarse el polipéptido de CRCGCL en una célula de mamífero. Un vector de expresión de mamífero típico contiene un elemento promotor, que media la iniciación de transcripción de ARNm, una secuencia que codifica

para la proteína, y señales requeridas para la finalización de la transcripción y poliadenilación del transcrito. Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios dadores y aceptores para corte y empalme de ARN. Se logra la transcripción altamente eficaz con los promotores tempranos y tardíos de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo, VSR, VLTH-I, VIH-I y el promotor temprano de los citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden usarse elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humano).

Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Farmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2DHFR (ATCC 37146), pBC12MI (ATCC 67109), pCMVSPORT 2.0, y pCMVSPORT 3.0. Las células huésped de mamíferos que pueden usarse incluyen células Hela, 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

Alternativamente, puede expresarse polipéptido de CRCGCL en líneas celulares estables que contienen el polinucleótido de CRCGCL integrado en un cromosoma. La transfección conjunta con un marcador que puede seleccionarse tal como DHFR, gpt, neomicina, higromicina permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas.

También puede amplificarse el gen de CRCGCL transfectado para expresar grandes cantidades de la proteína codificada. El marcador de DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil en el desarrollo de líneas celulares que llevan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. (Véase, por ejemplo, Alt, F. W., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); Hamlin, J. L. y Ma, C., *Biochem. et Biophys. Acta*, 1097:107-143 (1990); Page, M. J. y Sydenham, M. A., *Biotechnology* 9:64-68 (1991)). Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy *et al.*, *Biochem J.* 227:277-279 (1991); Bebbington *et al.*, *Bio/Technology* 10:169-175 (1992)). Usando estos marcadores, se hacen crecer las células de mamífero en medio selectivo y se seleccionan las células con la resistencia más alta. Estas líneas celulares contienen el/los gen(es) amplificado(s) integrado(s) en un cromosoma. A menudo se usan células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO para la producción de proteínas.

Los derivados del plásmido pSV2-DHFR (n.º de registro de ATCC 37146), los vectores de expresión pC4 (n.º de registro de ATCC 209646) y pC6 (n.º de registro de ATCC 209647) contienen el promotor fuerte (LTR) del virus de sarcoma de Rous (Cullen *et al.*, *Molecular and Cell Biology*, 438-447 (Marzo, 1985)) más un fragmento del potenciador de CMV (Boshart *et al.*, *Célula* 41:521-530 (1985)). Los sitios múltiples de clonación, por ejemplo, con los sitios de escisión de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación de CRCGCL. Los vectores también contienen el intrón 3', la señal de poliadenilación y de terminación del gen de preproinsulina de la rata, y el gen de DHFR del ratón bajo control del promotor temprano de SV40.

Específicamente, el plásmido pC4, por ejemplo, se digiere con enzimas de restricción apropiadas y después se desfosforilan usando fosfatos intestinales de ternero mediante procedimientos conocidos en la técnica. Entonces se aísla el vector a partir de un gel de agarosa al 1%. También se prefiere el vector pcDNA3 (Life Technologies).

Se amplifica el polinucleótido de CRCGCL según el protocolo explicado resumidamente en el ejemplo 1. Si se usa la secuencia señal que se produce de manera natural para producir la proteína secretada, el vector no necesita un segundo péptido de señal. Alternativamente, si no se usa la secuencia señal que se produce de manera natural, puede modificarse el vector para incluir una secuencia señal heteróloga. (Véase, por ejemplo, el documento WO 96/34891).

Entonces se digiere el fragmento amplificado con la misma enzima de restricción y se purifica en un gel de agarosa al 1%. Entonces se ligan el fragmento aislado y el vector desfosforilado con ADN ligasa T4. Después se transforman células HB101 de *E. coli* o XL-1 Blue y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en plásmido pC4 usando, por ejemplo, análisis de enzimas de restricción.

Se usan células de ovario de hámster chino que carecen de un gen de DHFR activo para la transfección. Se transfectan conjuntamente cinco μg del plásmido pC4 de expresión con 0,5 μg del plásmido pSVneo usando Lipofectin (Felgner *et al.*, *citado anteriormente*). El plásmido pSV2-neo contiene un marcador que puede seleccionarse dominante, el gen *neo* de Tn5 que codifica para una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos incluyendo G418. Se siembran las células en alfa menos MEM complementado con G418 1 mg/ml. Tras 2 días, se tripsinizan y se siembran las células en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en alfa menos MEM complementado con 10, 25 ó 50 ng/ml de metotrexato más G418 1 mg/ml. Tras aproximadamente 10-14 días se tripsinizan clones sencillos y después se siembran en placas petri de 6 pocillos o matraces de 10 ml usando concentraciones diferentes de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Entonces se transfieren los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato a nuevas placas de 6 pocillos que contienen concentraciones incluso superiores de metotrexato (1 μM , 2 μM , 5 μM , 10 mM, 20 mM). Se repite el mismo procedimiento hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100 - 200 μM . Se analiza la expresión de CRCGCL, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia de tipo Western o mediante análisis por HPLC de fase inversa.

Ejemplo 9

Construcción de mutantes con delección N-terminal y/o C-terminal

5 Puede usarse el siguiente enfoque general para clonar un mutante de delección de CRCGCL con delección N-terminal o C-terminal. Generalmente, se derivan dos cebadores oligonucleotídicos de aproximadamente 15-25 nucleótidos de las posiciones en 5' y 3' deseadas de un polinucleótido de SEQ ID NO: 1. Se determinan las posiciones en 5' y 3' de los cebadores basándose en el fragmento de polinucleótido de CRCGCL deseado. Se añaden un codón de iniciación y codón de terminación a los cebadores 5' y 3' respectivamente, si es necesario, para expresar el fragmento de polipéptido de CRCGCL codificado por el fragmento de polinucleótido. Los fragmentos de polinucleótido de CRCGCL preferidos son los que codifican para los mutantes con delección N-terminal y C-terminal dados a conocer anteriormente en la sección "Fragmentos de polinucleótido y polipéptido" de la memoria descriptiva.

15 También pueden añadirse nucleótidos adicionales que contienen sitios de restricción para facilitar la clonación del fragmento de polinucleótido de CRCGCL en un vector deseado a las secuencias de cebadores 5' y 3'. Se amplifica el fragmento de polinucleótido de CRCGCL a partir de ADN genómico o a partir del clon de ADNc depositado usando los cebadores oligonucleotídicos para PCR apropiados y condiciones tratadas en el presente documento o conocidas en la técnica. Los fragmentos de polipéptido de CRCGCL codificados por los fragmentos de polinucleótido de CRCGCL de la presente invención pueden expresarse y purificarse de la misma manera general como los polipéptidos de longitud completa, aunque pueden ser necesarias modificaciones de rutina debido a las diferencias en propiedades químicas y físicas entre un fragmento particular y polipéptido de longitud completa.

25 Como un medio de mostrar a modo de ejemplo pero no de limitar la presente invención, el polinucleótido que codifica para el fragmento I-35 a F-276 de polipéptido de CRCGCL se amplifica y se clona tal como sigue: se genera un cebador 5' que comprende un sitio de enzima de restricción seguido por un codón de iniciación en marco con la secuencia de polinucleótido que codifica para la parte N-terminal del fragmento de polipéptido que comienza con I-35. Se genera un cebador 3' complementario que comprende un sitio de enzima de restricción seguido por un codón de terminación en marco con la secuencia de polinucleótido que codifica para la parte C-terminal del fragmento de polipéptido de CRCGCL que termina con F-276.

30 Se digieren el fragmento de polinucleótido amplificado y el vector de expresión con enzimas de restricción que reconocen los sitios en los cebadores. Entonces se ligan los polinucleótidos digeridos juntos. Se inserta el fragmento de polinucleótido de CRCGCL en el vector de expresión restringido, preferiblemente de una manera que coloca la región codificante de fragmento de polipéptido de CRCGCL en sentido 3' del promotor. Se transforma la mezcla de ligamiento en células de *E. coli* competentes usando procedimientos convencionales y tal como se describe en los ejemplos en el presente documento. Se aísla ADN de plásmido a partir de colonias resistentes y se confirma la identidad del ADN clonado mediante análisis de restricción, PCR y secuenciación de ADN.

Ejemplo 10

Fusiones de proteína de CRCGCL

45 Los polipéptidos de CRCGCL se fusionan preferiblemente a otras proteínas. Pueden usarse estas proteínas de fusión para una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, la fusión de polipéptidos de CRCGCL con etiqueta de His, etiqueta de HA, proteína A, dominios de IgG, y proteína de unión a maltosa facilita la purificación. (Véase el ejemplo 5; véase también el documento EP A 394,827; Trauneker, *et al.*, Nature 331:84-86 (1988)). De manera similar, la fusión con IgG-1, IgG-3, y albúmina aumenta el tiempo de semivida *in vivo*. Las señales de ubicación nucleares fusionadas con polipéptidos de CRCGCL pueden dirigir la proteína a una ubicación subcelular específica, mientras heterodímeros u homodímeros covalentes pueden aumentar o disminuir la actividad de una proteína de fusión. Las proteínas de fusión también pueden crear moléculas quiméricas que tienen más de una función. Finalmente, las proteínas de fusión pueden aumentar la solubilidad y/o estabilidad de la proteína fusionada en comparación con la proteína no fusionada. Todos los tipos de proteínas de fusión descritos anteriormente pueden prepararse modificando el siguiente protocolo, que explica resumidamente la fusión de un polipéptido con una molécula de IgG, o el protocolo descrito en el ejemplo 5.

55 En resumen, puede amplificarse por PCR la parte Fc humana de la molécula de IgG, usando cebadores que abarcan los extremos 5' y 3' de la secuencia descrita a continuación. Estos cebadores también deben tener sitios de enzimas de restricción convenientes que facilitarían la clonación en un vector de expresión, preferiblemente un vector de expresión de mamífero.

60 Por ejemplo, si se usa pC4 (n.º de registro 209646), puede ligarse la parte Fc humana en el sitio de clonación BamHI. Obsérvese que debe destruirse el sitio BamHI en 3'. Después, el vector que contiene la parte Fc humana se restringe de nuevo con BamHI, linealizando el vector, y se liga polinucleótido de CRCGCL, aislado mediante el protocolo de PCR descrito en el ejemplo 1, en este sitio BamHI.

65 Alternativamente, también puede fusionarse un polipéptido de CRCGCL soluble, tal como aminoácidos los Met 1 a Lys 231, con la parte Fc. Por ejemplo, puede usarse un cebador 5': 5' CCGGTTAGATCTGCCATCATGGGGCGGCTG GTTCTG 3' (SEQ ID NO: 28), que tiene un sitio de restricción Bgl II y un cebador 3': 5' GGCCGGTCTAGATTTG

ES 2 357 020 T3

GACAGCTTTGGTTTG 3' (SEQ ID NO: 29) para someter a PCR los aminoácidos Met 1 a Lys 231. Puede fusionarse con Fc el producto amplificado para producir una proteína de fusión Fc, tal como se expuso anteriormente, y ligarse al vector pC4.

5 En cualquier caso, obsérvese que se clona el polinucleótido sin un codón de terminación, de lo contrario no se producirá una proteína de fusión. Además, si se usa la secuencia señal que se produce de manera natural para producir la proteína secretada, pC4 no necesita un segundo péptido de señal. Alternativamente, si no se usa la secuencia señal que se produce de manera natural, puede modificarse el vector para incluir una secuencia señal heteróloga. (Véase, por ejemplo, el documento WO 96/34891).

10 También pueden insertarse las fusiones de Fc descritas anteriormente en el vector pA2 para expresarse en sistemas de baculovirus, tal como se expone en el ejemplo 7, usando técnicas conocidas en la técnica y descritas en el presente documento.

15 *Región Fc de IgG humana*

GGGATCCGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATTTCGAG
GGTGACACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACTCCTGA
20 GGTACACATGCGTGGTGGTGGACGTAAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTC

AGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
25 AGCCCTCCCAACCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT
ACACCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCAC
GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT
30 GGAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAG
AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCGACGGCCGCGACTCTAGAGGAT (SEQ ID NO:4)

Ejemplo 11

35 *Producción de un anticuerpo*

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de métodos. (Véase, Current Protocols, Capítulo 2). Como un ejemplo de tales métodos, se administran células que expresan CRCGCL a un animal para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales. En un método preferido, se prepara una preparación de proteína de CRCGCL y se purifica para hacer que esté sustancialmente libre de contaminantes naturales. Entonces se introduce tal preparación en un animal con el fin de producir antisueros policlonales de mayor actividad específica.

45 En el método más preferido, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos monoclonales (o fragmentos de unión a proteína de los mismos). Pueden prepararse tales anticuerpos monoclonales usando tecnología del hibridoma. (Köhler *et al.*, Nature 256:495 (1975); Köhler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6:511 (1976); Köhler *et al.*, Eur. J. Immunol. 6:292 (1976); Hammerling *et al.*, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., pp. 563-681 (1981)). En general, tales procedimientos implican inmunizar un animal (preferiblemente un ratón) con polipéptido de CRCGCL o, más preferiblemente, con una célula que expresa polipéptido de CRCGCL secretado. Pueden cultivarse tales células en cualquier medio de cultivo tisular adecuado; sin embargo, es preferible cultivar células en medio de Eagle modificado por Earle complementado con suero bovino fetal al 10% (inactivado a aproximadamente 56°C), y complementado con aproximadamente 10 g/l de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 1.000 U/ml de penicilina, y aproximadamente 100 ug/ml de estreptomina.

55 Se extraen los esplenocitos de tales ratones y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Puede emplearse cualquier línea celular de mieloma adecuada según la presente invención; sin embargo, es preferible emplear la línea celular de mieloma original (SP2O), disponible en la ATCC. Tras la fusión, se mantienen selectivamente las células de hibridoma resultantes en medio HAT, y después se clonan mediante dilución limitativa tal como se describe por Wands *et al.* (Gastroenterology 80:225-232 (1981)). Entonces se someten a ensayo las células de hibridoma obtenidas mediante tal selección para identificar clones que secretan anticuerpos que pueden unirse al polipéptido de CRCGCL.

65 Alternativamente, pueden producirse anticuerpos adicionales que pueden unirse a polipéptido de CRCGCL en un procedimiento de dos etapas usando anticuerpos anti-idiotípicos. Un método de este tipo hace uso del hecho de que los anticuerpos son a su vez antígenos, y por tanto, es posible obtener un anticuerpo que se une a un segundo anticuerpo. Según este método, se usan anticuerpos específicos de proteínas para inmunizar un animal, preferiblemente un ratón. Entonces se usan los esplenocitos de un animal de este tipo para producir células de hibridoma, y se examinan las

ES 2 357 020 T3

células de hibridoma para identificar clones que producen un anticuerpo cuya capacidad para unirse al anticuerpo específico de proteína de CRCGCL puede bloquearse por CRCGCL. Tales anticuerpos comprenden anticuerpos anti-idiotípicos para el anticuerpo específico de proteína de CRCGCL y pueden usarse para inmunizar un animal para inducir formación de anticuerpos específicos de proteína de CRCGCL adicionales.

Se apreciará que pueden usarse Fab y F(ab')₂ y otros fragmentos de los anticuerpos de la presente invención según los métodos dados a conocer en el presente documento. Normalmente, tales fragmentos se producen mediante escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Alternativamente, pueden producirse fragmentos secretados de unión a proteínas de CRCGCL mediante la aplicación de tecnología de ADN recombinante o mediante química sintética.

Para el uso *in vivo* de anticuerpos en seres humanos, puede ser preferible usar anticuerpos monoclonales quiméricos "humanizados". Pueden producirse tales anticuerpos usando construcciones genéticas derivadas de células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos. (Véase, para revisión, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi *et al.*, BioTechniques 4:214 (1986); Cabilly *et al.*, patente estadounidense n.º 4.816.567; Taniguchi *et al.*, documento EP 171496; Morrison *et al.*, documento EP 173494; Neuberger *et al.*, documento WO 8601533; Robinson *et al.*, documento WO 8702671; Boulianne *et al.*, Nature 312:643 (1984); Neuberger *et al.*, Nature 314:268 (1985)).

Ejemplo 12

Producción de proteína de CRCGCL para ensayos de selección de alto rendimiento

El siguiente protocolo produce un sobrenadante que contiene polipéptido de CRCGCL que va a someterse a prueba. Entonces puede usarse este sobrenadante en los ensayos de selección descritos en los ejemplos 14-21.

En primer lugar, se diluye disolución madre (1 mg/ml en PBS) de poli-D-lisina (644 587 Boehringer-Mannheim) 1:20 en PBS (sin calcio o magnesio 17-516F Biowhittaker) para obtener una disolución de trabajo de 50 ug/ml. Se añaden 200 ul de esta disolución a cada pocillo (placas de 24 pocillos) y se incuba a TA durante 20 minutos. Debe asegurarse de distribuir la disolución sobre cada pocillo (observación: puede usarse una pipeta de 12 canales con puntas cada dos canales). Se aspira la disolución de poli-D-lisina y se aclara con 1 ml de PBS (solución salina tamponada con fosfato). La PBS debe permanecer en el pocillo hasta justo antes de sembrar en placas las células y las placas pueden recubrirse con poli-lisina por adelantado durante hasta dos semanas.

Se siembran células 293T (no se llevan las células más allá de P+20) a 2×10^5 células/pocillo en 0,5 ml de DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) (con 4,5 G/L de glucosa y L-glutamina (12-604F Biowhittaker))/FBS al 10% inactivado por calor (14-503F Biowhittaker)/1x Penstrep (17-602E Biowhittaker). Se dejan crecer las células durante la noche.

Al siguiente día, se mezclan juntos en un baño de disolución estéril: 300 ul de Lipofectamine (18324-012 Gibco/BRL) y 5 ml de Optimem I (31985070 GibcoBRL)/placa de 96 pocillos. Con una pipeta multicanal de pequeño volumen, se toman alícuotas de aproximadamente 2 ug de un vector de expresión que contiene un inserto de polinucleótido, producido mediante los métodos descritos en los ejemplos 8-10, en una placa de fondo redondo de 96 pocillos marcada de manera apropiada. Con una pipeta multicanal, se añaden 50 ul de la mezcla de Lipofectamine/Optimem I a cada pocillo. Se mueve arriba y abajo con la pipeta suavemente para mezclar. Se incuba a TA durante 15-45 minutos. Tras aproximadamente 20 minutos, se usa una pipeta multicanal para añadir 150 ul de Optimem I a cada pocillo. Como un control, debe transfectarse una placa de ADN de vector que carece de un inserto con cada conjunto de transfecciones.

Preferiblemente, debe realizarse la transfección realizando conjuntamente las siguientes tareas. Mediante la realización conjunta, el tiempo de manipulación se reduce a la mitad, y las células no pasan demasiado tiempo en PBS. En primer lugar, una persona A aspira los medios de cuatro placas de 24 pocillos de células, y después una persona B aclara cada pocillo con 0,5-1 ml de PBS. Entonces la persona A aspira el aclarado de PBS, y la persona B, usando una pipeta de 12 canales con puntas cada dos canales, añade los 200 ul de complejo ADN/Lipofectamine/Optimem I primero a los pocillos impares, después a los pocillos pares, a cada fila en las placas de 24 pocillos. Se incuba a 37°C durante 6 horas.

Mientras se incuban las células, se preparan medios apropiados, o bien BSA al 1% en DMEM con 1x penstrep, o bien medios HGS CHO-5 (116,6 mg/L de CaCl₂ (anhid); 0,00130 mg/L de CuSO₄·5H₂O; 0,050 mg/L de Fe(NO₃)₃·9H₂O; 0,417 mg/L de FeSO₄·7H₂O; 311,80 mg/L de KCl; 28,64 mg/L de MgCl₂; 48,84 mg/L de MgSO₄; 6995,50 mg/L de NaCl; 2400,0 mg/L de NaHCO₃; 62,50 mg/L de NaH₂PO₄·H₂O; 71,02 mg/L de Na₂HPO₄; 0,4320 mg/L de ZnSO₄·7H₂O; 0,002 mg/L de ácido araquidónico; 1,022 mg/L de colesterol; 0,070 mg/L de DL-alfa-tocoferol-acetato; 0,0520 mg/L de ácido linoleico; 0,010 mg/L de ácido linolénico; 0,010 mg/L de ácido mirístico; 0,010 mg/L de ácido oleico; 0,010 mg/L de ácido palmítico; 0,010 mg/L de ácido palmítico; 100 mg/L de Pluronic F-68; 0,010 mg/L de ácido esteárico; 2,20 mg/L de Tween 80; 4551 mg/L de D-Glucosa; 130,85 mg/ml de L-alanina; 147,50 mg/ml de L-arginina-HCl; 7,50 mg/ml de L-asparagina-H₂O; 6,65 mg/ml de ácido L-aspártico; 29,56 mg/ml de L-cistina-2HCl-H₂O; 31,29 mg/ml de L-cistina-2HCl; 7,35 mg/ml de ácido L-glutámico; 365,0 mg/ml de L-glutamina; 18,75 mg/ml de glicina; 52,48 mg/ml de L-histidina-HCl-H₂O; 106,97 mg/ml de L-isoleucina; 111,45 mg/ml de L-

ES 2 357 020 T3

leucina; 163,75 mg/ml de L-lisina HCl; 32,34 mg/ml de L-metionina; 68,48 mg/ml de L-fenilalanina; 40,0 mg/ml de L-prolina; 26,25 mg/ml de L-serina; 101,05 mg/ml de L-treonina; 19,22 mg/ml de L-triptófano; 91,79 mg/ml de L-tirosina-2Na-2H₂O; y 99,65 mg/ml de L-valina; 0,0035 mg/L de biotina; 3,24 mg/L de D-Ca pantotenato; 11,78 mg/L de cloruro de colina; 4,65 mg/L de ácido fólico; 15,60 mg/L de i-inositol; 3,02 mg/L de niacinamida; 3,00 mg/L de piridoxal HCl; 0,031 mg/L de piridoxina HCl; 0,319 mg/L de riboflavina; 3,17 mg/L de tiamina HCl; 0,365 mg/L de timidina; 0,680 mg/L de vitamina B₁₂; 25 mM de tampón HEPES; 2,39 mg/L de Na hipoxantina; 0,105 mg/L de ácido lipoico; 0,081 mg/L de putrescina de sodio-2HCl; 55,0 mg/L de piruvato de sodio; 0,0067 mg/L de selenita de sodio; 20 uM de etanolamina; 0,122 mg/L de citrato férrico; 41,70 mg/L de metil-B-ciclodextrina complejada con ácido linoleico; 33,33 mg/L de metil-B-ciclodextrina complejada con ácido oleico; 10 mg/L de metil-B-ciclodextrina complejada con acetato de retinilo. Se ajusta la osmolaridad a 327 mOsm, con 2 mM de glutamina y 1x penstrep. (100 gm de BSA (81-068-3 Bayer) disueltos en 1 L de DMEM para obtener una disolución madre de BSA al 10%). Se filtran los medios y se recogen 50 ul para ensayo de endotoxina en poliestireno cónico de 15 ml.

Se finaliza la reacción de transfección, preferiblemente de manera conjunta, al final del período de incubación. La persona A aspira los medios de transfección, mientras la persona B añade 1,5 ml de medios apropiados a cada pocillo. Se incuba a 37°C durante 45 ó 72 horas dependiendo de los medios usados: BSA al 1% durante 45 horas o CHO-5 durante 72 horas.

En el día cuatro, usando una pipeta multicanal de 300 ul, se toman alícuotas de 600 ul en una placa con pocillo profundo de 1 ml y el sobrenadante restante en un pocillo profundo de 2 ml. Entonces pueden usarse los sobrenadantes de cada pocillo en los ensayos descritos en los ejemplos 14-21.

Se entiende específicamente que cuando se obtiene actividad en cualquiera de los ensayos descritos a continuación usando un sobrenadante, la actividad se origina o bien directamente del polipéptido de CRCGCL (por ejemplo, como una proteína secretada) o bien induciendo CRCGCL la expresión de otras proteínas, que después se secretan en el sobrenadante. Por tanto, la invención proporciona además un método para identificar la proteína en el sobrenadante caracterizado por una actividad en un ensayo particular.

Ejemplo 13

Construcción de la construcción indicadora de GAS

Una ruta de transducción de señales implicada en la diferenciación y proliferación de células se denomina la ruta Jak-STAT. Las proteínas activadas en la ruta Jak-STAT se unen a elementos "GAS" de sitio de activación gamma o un elemento de respuesta sensible a interferón ("ISRE"), ubicados en el promotor de muchos genes. La unión de una proteína a estos elementos altera la expresión del gen asociado.

Se reconocen elementos GAS e ISRE por una clase de factores de transcripción denominados transductores de señales y activadores de transcripción, o "STAT". Hay seis miembros de la familia STAT. Stat1 y Stat3 están presentes en muchos tipos celulares, como Stat2 (como respuesta a IFN-alfa está extendido). Stat4 es más restringido y no está en muchos tipos celulares aunque se ha encontrado en células T auxiliares de clase 1 tras el tratamiento con IL-12. Stat5 se denominó originariamente factor de crecimiento mamario, pero se ha encontrado en concentraciones superiores en otras células incluyendo células mieloides. Puede activarse en células en cultivo tisular por muchas citocinas.

Los STAT se activan para translocar desde el citoplasma al núcleo con fosforilación de tirosinas por un conjunto de cinasas conocidas como la familia Janus Cinasa ("Jak"). Jak representa una familia definida de tirosinas cinasas solubles e incluyen Tyk2, Jak1, Jak2 y Jak3. Estas cinasas muestran similitud de secuencia significativa y son generalmente inactivas catalíticamente en células en reposo.

Las Jak se activan mediante una amplia gama de receptores resumidos en la tabla a continuación. (Adaptada de la revisión de Schidler y Darnell, Ann. Rev. Biochem. 64:621-51 (1995)). Una familia de receptores de citocinas, que pueden activar las Jak, se divide en dos grupos: (a) la clase 1 incluye receptores para IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, Epo, PRL, GH, G-CSF, GM-CSF, LIF, CNTF y trombopoyetina; y (b) la clase 2 incluye IFN-a, IFN-g e IL-10. Los receptores de clase 1 comparten un motivo de cisteína conservado (un conjunto de cuatro cisteínas conservadas y un triptófano) y un motivo WSXWS (una región proximal de membrana que codifica para Trp-Ser-Xxx-Trp-Ser (SEQ ID NO:5)).

Por tanto, con la unión de un ligando a un receptor, se activan las Jak, que a su vez activan los STAT, que entonces se translocan y se unen a elementos GAS. Este procedimiento completo está englobado en la ruta de transducción de señales Jak-STAT.

Por tanto, la activación de la ruta Jak-STAT, reflejada por la unión del elemento GAS o ISRE, puede usarse para indicar proteínas implicadas en la proliferación y diferenciación de células. Por ejemplo, se sabe que factores de crecimiento y citocinas activan la ruta Jak-STAT. (Véase la tabla a continuación). Por tanto, usando elementos GAS unidos a moléculas indicadoras, pueden identificarse activadores de la ruta Jak-STAT.

ES 2 357 020 T3

Hay datos preliminares de que CRGCL interacciona con Jak1.

5	<u>o ISRE</u> <u>Ligando</u>	<u>Jak</u>			<u>STAT</u>	<u>GAS (elementos)</u>
		<u>tyk2</u>	<u>Jak1</u>	<u>Jak2</u>	<u>Jak3</u>	
10	<u>Familia de IFN</u>					
	IFN-a/B	+	+	-	-	1,2,3 ISRE
	IFN-g (IRF 1>Lys6>IFP)		+	+	-	1 GAS
15	IL-10	+	?	?	-	1,3
	<u>Familia de gp 130</u>					
20	IL-6 (Pleiotrópica) (IRF1>Lys6>IFP)	+	+	+	?	1,3 GAS
	IL-11 (Pleiotrópica)	?	+	?	?	1,3
	OnM (Pleiotrópica)	?	+	+	?	1,3
25	LIF (Pleiotrópica)	?	+	+	?	1,3
	CNTF (Pleiotrópica)	-/+	+	+	?	1,3
	G-CSF (Pleiotrópica)	?	+	?	?	1,3
	IL-12 (Pleiotrópica)	+	-	+	+	1,3
30	<u>Familia de g-C</u>					
	IL-2 (linfocitos)	-	+	-	+	1,3,5 GAS
35	IL-4 (linf/mieloide) IFP >>Ly6) (IgH)	-	+	-	+	6 GAS (IRF1 =
	IL-7 (linfocitos)	-	+	-	+	5 GAS
	IL-9 (linfocitos)	-	+	-	+	5 GAS
40	IL-13 (linfocitos)	-	+	?	?	6 GAS
	IL-15	?	+	?	+	5 GAS
	<u>Familia de gp140</u>					
45	IL-3 (mieloide) (IRF1>IFP>>Ly6)	-	-	+	-	5 GAS
	IL-5 (mieloide)	-	-	+	-	5 GAS
	GM-CSF (mieloide)	-	-	+	-	5 GAS
50	<u>Familia de hormona del crecimiento</u>					
	GH	?	-	+	-	5
	PRL	?	+/-	+	-	1,3,5
55	EPO CAS>IRF1=IFP>>Ly6)	?	-	+	-	5 GAS (B-
	<u>Receptor de tirosinas cinasas</u>					
60	EGF	?	+	+	-	1,3 GAS (IRF1)
	PDGF	?	+	+	-	1,3
	CSF-1	?	+	+	-	1,3 GAS (no IRF1)

65

Para construir un elemento promotor que contiene GAS sintético, que se usa en los ensayos biológicos descritos en los ejemplos 14-15, se emplea una estrategia a base de PCR para generar una secuencia promotora GAS-SV40. El

ES 2 357 020 T3

cebador en 5' contiene cuatro copias en tándem del sitio de unión a GAS que se encuentra en el promotor de IRF1 y que se demostró anteriormente que se une a los STAT tras la inducción con una gama de citocinas (Rothman *et al.*, *Immunity* 1:457-468 (1994).), aunque pueden usarse en su lugar otros elementos GAS o ISRE. El cebador en 5' también contiene 18 pb de secuencia complementaria a la secuencia del promotor temprano de SV40 y está flanqueada por un sitio XhoI. La secuencia del cebador en 5' es:

5':GCGCCTCOAGATTTCCCCGAAATCTAGATTTCCCCGAAATGATTTCCCC
GAAATGATTTCCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAG:3' (SEQ ID NO:6)

El cebador en sentido 3' es complementario al promotor de SV40 y está flanqueado por un sitio Hind III: 5':GCGG-CAAGCTTTTTGCAAAGCCTAGGC: 3' (SEQ ID NO:7).

La amplificación por PCR se realiza usando el molde de promotor de SV40 presente en el plásmido B-gal:promotor obtenido de Clontech. El fragmento de PCR resultante se digiere con XhoI/Hind III y se subclona en BLSK2- (Stratagene). La secuenciación con cebadores directo e inverso confirma que el inserto contiene la siguiente secuencia:

5':CTCGAGATTTCCCCGAAATCTAGATTTCCCCGAAATGATTTCCCCGAAAT
GATTTCCCCGAAATATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGC
CCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTC
CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCT
CGGCCTCTGAGCTATTCAGAAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTA
GGCTTTTGCAAAAAGCTT:3' (SEQ ID NO:8)

Con este elemento promotor de GAS unido al promotor de SV40, se modifica por ingeniería genética a continuación un construcción indicador GAS:SEAP2. En el presente documento, la molécula indicadora es una fosfatasa alcalina secretada, o "SEAP". Sin embargo, claramente, puede ser cualquier molécula indicadora en lugar de SEAP, en éste o en cualquiera de los otros ejemplos. Moléculas indicadoras bien conocidas que pueden usarse en lugar de SEAP incluyen cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), luciferasa, fosfatasa alcalina, B-galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), o cualquier proteína detectable por un anticuerpo.

La secuencia anterior confirmó que el elemento promotor GAS-SV40 sintético se subclona en el vector pSEAP-promotor obtenido de Clontech usando HindIII y XhoI, reemplazando eficazmente el promotor de SV40 por el elemento promotor GAS:SV40 amplificado, para crear el vector GAS-SEAP. Sin embargo, este vector no contiene un gen de resistencia a neomicina, y por tanto, no se prefiere para sistemas de expresión de mamíferos.

Por tanto, con el fin de generar líneas celulares estables de mamíferos que expresan el indicador GAS-SEAP, se elimina el casete GAS-SEAP del vector GAS-SEAP usando SalI y NotI, y se inserta en un vector principal que contiene el gen de resistencia a neomicina, tal como pGFP-1 (Clontech), usando estos sitios de restricción en el sitio de clonación múltiple, para crear el vector GAS-SEAP/Neo. Una vez que se transfecta este vector en células de mamíferos, entonces puede usarse este vector como una molécula indicadora para unión a GAS tal como se describe en los ejemplos 14-15.

Pueden prepararse otras construcciones usando la descripción anterior y reemplazando GAS por una secuencia promotora diferente. Por ejemplo, la construcción de moléculas indicadoras que contienen secuencias promotoras NFK-B y EGR se describen en los ejemplos 16 y 17. Sin embargo, pueden sustituirse muchos otros promotores usando los protocolos descritos en estos ejemplos. Por ejemplo, pueden sustituirse promotores de SRE, IL-2, NFAT, u osteocalcina, solos o en combinación (por ejemplo, GAS/NF-KB/EGR, GAS/NF-KB, IL-2/NFAT, o NF-KB/GAS). De manera similar, pueden usarse otras líneas celulares para someter a prueba la actividad de la construcción indicadora, tales como HELA (epitelial), HUVEC (endotelial), Reh (células B), Saos-2 (osteoblasto), HUVAC (aórtica), o cardiomiocito.

Ejemplo 14

Ensayo de selección de alto rendimiento para determinar la actividad de células T

Se usa el siguiente protocolo para evaluar la actividad de células T de CRGCL determinando si sobrenadante de CRGCL prolifera y/o diferencia células T. Se evalúa la actividad de células T usando la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el ejemplo 13. Por tanto, los factores que aumentan la actividad de SEAP indican la capacidad de activar

ES 2 357 020 T3

la ruta de transducción de señales Jak-STAT. La célula T usada en este ensayo es células T Jurkat (n.º de registro de ATCC TIB-152), aunque también pueden usarse células Molt-3 (n.º de registro de ATCC CRL-1552) y células Molt-4 (n.º de registro de ATCC CRL-1582).

5 Las células T Jurkat son células auxiliares CD4+ Th1 linfoblásticas. Con el fin de generar líneas celulares estables, se transfectan aproximadamente 2 millones de células Jurkat con el vector GAS-SEAP/neo usando DMRIE-C (Life Technologies) (procedimiento de transfección descrito a continuación). Se siembran las células transfectadas a una densidad de aproximadamente 20.000 células por pocillo y se seleccionan los transfectantes resistentes a genticina 1 mg/ml. Se expanden las colonias resistentes y después se someten a prueba para evaluar su respuesta a concentraciones crecientes de interferón gamma. Se demuestra la respuesta a la dosis de un clon seleccionado.

15 Específicamente, el siguiente protocolo producirá células suficientes para 75 pocillos que contienen 200 µl de células. Por tanto, o bien se aumenta a escala, o bien se realiza de forma múltiple para generar células suficientes para múltiples placas de 96 pocillos. Se mantienen las células Jurkat en RPMI + suero al 10% con Pen-Strep al 1%. Se combinan 2,5 ml de OPTI-MEM (Life Technologies) con 10 µg de ADN de plásmido en un matraz T25. Se añaden 2,5 ml de OPTI-MEM que contiene 50 µl de DMRIE-C y se incuban a temperatura ambiente durante 15-45 min.

20 Durante el período de incubación, se cuenta la concentración celular, se centrifuga el número requerido de células (10^7 por transfección), y se resuspenden en OPTI-MEM a una concentración final de 10^7 células/ml. Después se añade 1 ml de 1×10^7 células en OPTI-MEM al matraz T25 y se incuban a 37°C durante 6 horas. Tras la incubación, se añaden 10 ml de RPMI + suero al 15%.

25 Se mantienen las líneas indicadoras estables Jurkat:GAS-SEAP en RPMI + suero al 10%, genticina 1 mg/ml y Pen-Strep al 1%. Se tratan estas células con sobrenadantes que contienen polipéptidos de CRCGCL o polipéptidos inducidos por CRCGCL tal como se producen mediante el protocolo descrito en el ejemplo 12.

30 En el día de tratamiento con el sobrenadante, las células deben lavarse y resuspenderse en RPMI + suero al 10% nuevo a una densidad de 500.000 células por ml. El número exacto de células requeridas dependerá del número de sobrenadantes que se seleccionan. Para una placa de 96 pocillos, se requieren aproximadamente 10 millones de células (para 10 placas, 100 millones de células).

35 Se transfieren las células a una cápsula de depósito triangular, con el fin de dispensar las células a una placa de 96 pocillos, usando una pipeta de 12 canales. Usando una pipeta de 12 canales, se transfieren 200 µl de células a cada pocillo (por tanto, añadiendo 100.000 células por pocillo).

40 Después de haberse sembrado todas las placas, se transfieren 50 µl de los sobrenadantes directamente de la placa de 96 pocillos que contiene los sobrenadantes a cada pocillo usando una pipeta de 12 canales. Además, se añade una dosis de interferón gamma exógeno (0,1, 1,0, 10 ng) a los pocillos H9, H10 y H11 para que sirvan como controles positivos adicionales para el ensayo.

45 Se colocan las placas de 96 pocillos que contienen células Jurkat tratadas con sobrenadantes en una incubadora durante 48 h (nota: este tiempo es variable entre 48-72 h). Después se transfieren muestras de 35 µl de cada pocillo a una placa de 96 pocillos opaca usando una pipeta de 12 canales. Las placas opacas deben recubrirse (usando cubiertas de celofán) y almacenarse a -20°C hasta que se realicen ensayos de SEAP según el ejemplo 18. Las placas que contienen las células tratadas restantes se colocan a 4°C y sirven como una fuente de material para repetir el ensayo en un pocillo específico si se desea.

50 Como control positivo, puede usarse interferón gamma 100 unidades/ml que se sabe que activa células T Jurkat. Normalmente, se observa una inducción de más de 30 veces en los pocillos de control positivo.

Ejemplo 15

55 *Ensayo de selección de alto rendimiento para identificar actividad mieloide*

60 Se usa el siguiente protocolo para evaluar la actividad mieloide de CRCGCL determinando si CRCGCL prolifera y/o diferencia células mieloides. Se evalúa la actividad de células mieloides usando la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el ejemplo 13. Por tanto, los factores que aumentan la actividad de SEAP indican la capacidad de activar la ruta de transducción de señales Jak-STAT. La célula mieloide usada en este ensayo es U937, una línea celular premonocito, aunque pueden usarse TNF-1, HL60 o KG1.

65 Para transfectar transitoriamente células U937 con la construcción GAS/SEAP/Neo producida en el ejemplo 13, se usa un método de DEAE-dextrano (Kharbanda *et al.*, 1994, Cell Growth & Differentiation, 5:259-265). En primer lugar, se recogen 2×10^6 células U937 y se lavan con PBS. Habitualmente, se hacen crecer las células U937 en medio RPMI 1640 que contiene suero bovino fetal (FBS) al 10% inactivado por calor complementado con penicilina 100 unidades/ml y estreptomomicina 100 mg/ml.

ES 2 357 020 T3

Después, se suspenden las células en 1 ml de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) que contiene DEAE-dextrano 0,5 mg/ml, 8 ug de ADN de plásmido GAS-SEAP2, NaCl 140 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 375 uM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 675 uM. Se incuban a 37°C durante 45 min.

5 Se lavan las células con medio RPMI 1640 que contiene FBS al 10% y después se resuspenden en 10 ml de medio completo y se incuban a 37°C durante 36 h.

Se obtienen las células estables GAS-SEAP/U937 haciendo crecer las células en G418 400 ug/ml. Se usa el medio libre de G418 para el crecimiento de rutina pero cada uno a dos meses, las células deben hacerse crecer de nuevo en
10 G418 400 ug/ml para un par de pases.

Se someten a prueba estas células recogiendo 1 x 10⁸ células (esto es suficiente para el ensayo en diez placas de 96 pocillos) y se lavan con PBS. Se suspenden las células en 200 ml del medio de crecimiento descrito anteriormente, con una densidad final de 5 x 10⁵ células/ml. Se siembran en placa 200 ul de células por pocillo en la placa de 96
15 pocillos (o 1 x 10⁵ células/pocillo).

Se añaden 50 ul del sobrenadante preparado mediante el protocolo descrito en el ejemplo 12. Se incuban a 37°C durante 48 a 72 h. Como control positivo, puede usarse interferón gamma 100 unidades/ml que se sabe que activa células U937. Normalmente, se observa una inducción de más de 30 veces en los pocillos de control positivo. Ensayo
20 de SEAP del sobrenadante según el protocolo descrito en el ejemplo 18.

Ejemplo 16

25 *Ensayo de selección de alto rendimiento para identificar la actividad neuronal*

Cuando las células experimentan diferenciación y proliferación, se activa un grupo de genes a través de muchas rutas de transducción de señales diferentes. Uno de estos genes, EGR1 (gen de respuesta de crecimiento temprano 1), se induce en diversos tejidos y tipos celulares tras la activación. El promotor de EGR1 es responsable de tal
30 inducción. Usando el promotor de EGR1 unido a moléculas indicadoras, puede evaluarse la activación de células por CRGCL.

Particularmente, se usa el siguiente protocolo para evaluar la actividad neuronal en líneas celulares PC12. Las células PC12 (células de fenocromocitoma de rata) se sabe que proliferan y/o se diferencian mediante la activación con una serie de mitógenos, tales como TPA (acetato de tetradecanoilforbol), NGF (factor de crecimiento nervioso) y EGF (factor de crecimiento epidérmico). Se activa la expresión génica de EGR1 durante este tratamiento. Por tanto, transfectando establemente células PC12 con una construcción que contiene un promotor de EGR unido a indicador de SEAP, puede evaluarse la activación de células PC12 por CRGCL.
35

Puede ensamblarse la construcción indicadora EGR/SEAP mediante el siguiente protocolo. La secuencia promotora de EGR-1 (de -633 a +1)(Sakamoto K *et al.*, Oncogene 6:867-871 (1991)) puede amplificarse por PCR a partir de ADN genómico humano usando los siguientes cebadores:
40

5' GCGCTCGAGGGATGACAGCGATAGAACCCCGG -3' (SEQ ID NO:9)
45

5' GCGAAGCTTCGCGACTCCCCGGATCCGCCTC-3' (SEQ ID NO:10)

Usando el vector GAS:SEAP/Neo producido en el ejemplo 13, entonces puede insertarse el producto amplificado de EGR1 en este vector. Se linealiza el vector GAS:SEAP/Neo usando enzimas de restricción XhoI/HindIII, eliminando el fragmento de relleno GAS/SV40. Se restringe el producto amplificado de EGR1 con estas mismas enzimas. Se liga el vector y el promotor de EGR1.
50

Para preparar placas de 96 pocillos para cultivo celular, se añaden dos ml de una disolución de recubrimiento (dilución 1:30 de colágeno tipo I (Upstate Biotech Inc. N.º de cat. 08-115) en etanol al 30% (esterilizado por filtración))
55 por placa de 10 cm o 50 ml por pocillo de la placa de 96 pocillos, y se deja secar al aire durante 2 h.

Se hacen crecer rutinariamente células PC12 en medio RPMI-1640 (Bio Whittaker) que contiene suero equino al 10% (JRH BIOSCIENCES, n.º de cat. 12449-78P), suero bovino fetal (FBS) al 5% inactivado por calor complementado con penicilina 100 unidades/ml y estreptomomicina 100 ug/ml en una placa de cultivo tisular de 10 cm recubierta previamente. Se realizan de una a cuatro escisiones cada tres a cuatro días. Se eliminan las células de las placas rascando y resuspendiendo con pipeteo hacia arriba y hacia abajo durante más de 15 veces.
60

Se transfecta la construcción EGR/SEAP/Neo en células PC12 usando el protocolo de Lipofectamine descrito en el ejemplo 12. Se obtienen células estables EGR-SEAP/PC12 haciendo crecer las células en G418 300 ug/ml. Se usa el medio libre de G418 para el crecimiento de rutina pero cada uno a dos meses, las células deben hacerse crecer de nuevo en G418 300 ug/ml para un par de pases.
65

ES 2 357 020 T3

Para evaluar la actividad neuronal, se selecciona una placa de 10 cm con células confluentes en aproximadamente el 70 al 80% eliminando el medio antiguo. Se lavan las células una vez con PBS (solución salina tamponada con fosfato). Después se privan las células de nutrientes en medio con baja concentración de suero (RPMI-1640 que contiene suero equino al 1% y FBS al 0,5% con antibióticos) durante la noche.

A la mañana siguiente, se elimina el medio y se lavan las células con PBS. Se rascan las células de la placa, se suspenden bien las células en 2 ml de medio con baja concentración de suero. Se cuenta el número de células y se añade más medio con baja concentración de suero para alcanzar una densidad celular final de 5×10^5 células/ml.

Se añaden 200 μ l de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de 96 pocillos (equivalente a 1×10^5 células/pocillo). Se añaden 50 μ l de sobrenadante producido mediante el ejemplo 12, a 37°C durante 48 a 72 h. Como control positivo, puede usarse un factor de crecimiento que se sabe que activa células PC12 a través de EGR, tal como factor de crecimiento neuronal (NGF) 50 ng/ μ l. Normalmente, se observa una inducción de más de cincuenta veces de SEAP en los pocillos de control positivo. Ensayo de SEAP del sobrenadante según el ejemplo 18.

Ejemplo 17

Ensayo de selección de alto rendimiento para determinar la actividad de células T

NF-KB (factor nuclear KB) es un factor de transcripción activado por una amplia variedad de agentes incluyendo las citocinas inflamatorias IL-1 y TNF, CD30 y CD40, linfotoxina-alfa y linfotoxina-beta, mediante la exposición a LPS o trombina, y mediante la expresión de determinados productos génicos virales. Como factor de transcripción, NF-KB regula la expresión de genes implicados en la activación de células inmunitarias, el control de la apoptosis (NF-KB parece proteger a las células de la apoptosis), el desarrollo de células B y T, las respuestas antivirales y antimicrobianas, y múltiples respuestas a estrés.

En estados no estimulados, se conserva NF-KB en el citoplasma con I-KB (KB inhibidor). Sin embargo, con estimulación, se fosforila y se degrada I-KB, provocando que NF-KB se transporte al núcleo, activando de ese modo la transcripción de genes diana. Los genes diana activados por NF-KB incluyen IL-2, IL-6, GM-CSF, ICAM-1 y CMH de clase I.

Debido a su papel fundamental y capacidad de responder a una gama de estímulos, se usan construcciones indicadoras que utilizan el elemento promotor de NF-KB para seleccionar los sobrenadantes producidos en el ejemplo 12. Los activadores o inhibidores de NF-KB serían útiles en el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, podrían usarse inhibidores de NF-KB para tratar las enfermedades relacionadas con la activación aguda o crónica de NF-KB, tales como artritis reumatoide.

Para construir un vector que contiene el elemento promotor de NF-KB, se emplea una estrategia basada en PCR. El cebador en sentido 5' contiene cuatro copias en tándem del sitio de unión a NF-KB (GGGGACTTTCCC) (SEQ ID NO:11), 18 pb de secuencia complementaria al extremo 5' de la secuencia de promotor temprano de SV40, y está flanqueado por un sitio XhoI:

```
5':GCGGCCTCGAGGGGACTTTCCC GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGA  
CTTTCCA TCTGCCATCTCAATTAG:3' (SEQ ID NO:12)
```

El cebador en sentido 3' es complementario al extremo 3' del promotor de SV40 y está flanqueado por un sitio Hind III: 5':GCGGCAAGCTTTTTGCAAAGCCTAGGC:3' (SEQ ID NO:7)

Se realiza la amplificación por PCR usando el molde de promotor de SV40 presente en el plásmido pB-gal:promotor obtenido de Clontech. Se digiere el fragmento de PCR resultante con XhoI y Hind III y se subclona en BLSK2- (Stratagene). La secuenciación con los cebadores T7 y T3 confirma que el inserto contiene la siguiente secuencia:

```
5':CTCGAGGGGACTTTCCC GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGACTTTCC  
ATCTGCCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCC GCCCTAACTCCGCC  
ATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCTGA  
CTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCCTCGGCCTCTGAGCTA  
TTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCCTAGGCTTTTGCAAAA  
GCTT:3' (SEQ ID NO:13)
```

ES 2 357 020 T3

A continuación, se reemplaza el elemento promotor mínimo de SV40 presente en el plásmido de promotor pSEAP2 (Clontech) con este fragmento NF-KB/SV40 usando XhoI y HindIII. Sin embargo, este vector no contiene un gen de resistencia a neomicina, y por tanto, no se prefiere para sistemas de expresión de mamíferos.

- 5 Con el fin de generar células líneas celulares estables de mamíferos, se elimina el casete NF-KB/SV40/SEAP del vector NF-KB/SEAP anterior usando las enzimas de restricción Sall y NotI, y se inserta en un vector que contiene resistencia a neomicina. Particularmente, se insertó el casete NF-KB/SV40/SEAP en pGFP-1 (Clontech), reemplazando el gen de GFP, tras restricción de pGFP-1 con Sall y NotI.
- 10 Una vez que se crea el vector NF-KB/SV40/SEAP/Neo, se crean y se mantienen células T Jurkat estables según el protocolo descrito en el ejemplo 14. De manera similar, el método para someter a ensayo sobrenadantes con estas células T Jurkat estables también se describe en el ejemplo 14. Como control positivo, se añade TNF alfa exógeno (0,1, 1, 10 ng) a los pocillos H9, H10 y H11, observándose normalmente una activación de 5-10 veces.

15
Ejemplo 18

Ensayo para actividad de SEAP

- 20 Como molécula indicadora para los ensayos descritos en los ejemplos 14-17, se somete a ensayo la actividad de SEAP usando el kit Tropix Phospho-light (cat. BP-400) según el siguiente procedimiento general. El kit Tropix Phospho-light suministra los tampones de dilución, ensayo y reacción usados a continuación.

- 25 Se ceba un dispensador con el tampón de dilución 2,5x y se dispensan 15 ul de tampón de dilución 2,5x en placas Optiplates que contienen 35 ul de un sobrenadante. Se sellan las placas con un sellador de plástico y se incuban a 65°C durante 30 min. Se separan las placas Optiplates para evitar un calentamiento desigual.

- 30 Se enfrían las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se vacía el dispensador y se ceba con el tampón de ensayo. Se añaden 50 ml de tampón de ensayo y se incuba a temperatura ambiente durante 5 min. Se vacía el dispensador y se ceba con el tampón de reacción (véase la tabla a continuación). Se añaden 50 ul de tampón de reacción y se incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos. Puesto que la intensidad de la señal quimioluminiscente depende del tiempo, y lleva aproximadamente 10 minutos leer 5 placas en un luminómetro, deben tratarse 5 placas cada vez e iniciar el segundo conjunto 10 minutos después.

- 35 Se lee la unidad de luz relativa en el luminómetro. Se establece H12 como blanco, y se imprimen los resultados. Un aumento en la quimioluminiscencia indica actividad indicadora.

40
(Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 357 020 T3

Formulación de tampón de reacción

	n.º de placas	Diluyente de tampón de reacción (ml)	CSPD (ml)
5	10	60	3
	11	65	3,25
	12	70	3,5
	13	75	3,75
10	14	80	4
	15	85	4,25
	16	90	4,5
	17	95	4,75
15	18	100	5
	19	105	5,25
	20	110	5,5
	21	115	5,75
20	22	120	6
	23	125	6,25
	24	130	6,5
	25	135	6,75
25	26	140	7
	27	145	7,25
	28	150	7,5
	29	155	7,75
30	30	160	8
	31	165	8,25
	32	170	8,5
	33	175	8,75
35	34	180	9
	35	185	9,25
	36	190	9,5
	37	195	9,75
40	38	200	10
	39	205	10,25
	40	210	10,5
	41	215	10,75
45	42	220	11
	43	225	11,25
	44	230	11,5
	45	235	11,75
50	46	240	12
	47	245	12,25
	48	250	12,5
	49	255	12,75
55	50	260	13

60 Ejemplo 19

Ensayo de selección de alto rendimiento para identificar cambios en la concentración de moléculas pequeñas y la permeabilidad de membrana

65 Se sabe que la unión de un ligando a un receptor altera los niveles intracelulares de moléculas pequeñas, tales como calcio, potasio, sodio, y el pH, así como que altera el potencial de membrana. Pueden medirse estas alteraciones en un ensayo para identificar sobrenadantes que se unen a receptores de una célula particular. Aunque el siguiente protocolo

ES 2 357 020 T3

describe un ensayo para calcio, puede modificarse fácilmente este protocolo para detectar cambios en potasio, sodio, pH, potencial de membrana, o cualquier otra molécula pequeña que pueda detectarse mediante una sonda fluorescente.

5 El siguiente ensayo usa lector de placas de formación de imágenes fluorométricas (“FLIPR”) para medir cambios en moléculas fluorescentes (Molecular Probes) que unen moléculas pequeñas. Claramente, puede usarse cualquier molécula fluorescente que detecta una molécula pequeña en lugar de la molécula fluorescente para calcio, fluo-3, usada en el presente documento.

10 Para células adherentes, se siembran las células a 10,000-20.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos negra Co-star con fondo transparente. Se incuba la placa en una incubadora de CO₂ durante 20 horas. Se lavan las células adherentes dos veces en el lavador Biotek con 200 ul de HBSS (solución salina equilibrada de Hank) dejando 100 ul de tampón tras el lavado final.

15 Se prepara una disolución madre de fluo-3 1 mg/ml en ácido plurónico al 10%-DMSO. Para cargar las células con fluo-3, se añaden 50 ul de fluo-3 12 ug/ml a cada pocillo. Se incuba la placa a 37°C en una incubadora de CO₂ durante 60 min. Se lava la placa cuatro veces en el lavador Biotek con HBSS dejando 100 ul de tampón.

20 Para células no adherentes, se centrifugan las células procedentes de medios de cultivo. Se resuspenden las células a 2-5 x 10⁶ células/ml con HBSS en un tubo cónico de 50 ml. Se añaden 4 ul de disolución de fluo-3 1 mg/ml en ácido plurónico al 10%-DMSO a cada ml de suspensión celular. Entonces se coloca el tubo en un baño de agua a 37°C durante 30-60 min. Se lavan dos veces las células con HBSS, se resuspenden a 1 x 10⁶ células/ml, y se dispensan a una microplaca, 100 ul/pocillo. Se centrifuga la placa a 1000 rpm durante 5 min. Entonces se lava la placa una vez con Denley CellWash con 200 ul, seguido por una etapa de aspiración para un volumen final de 100 ul.

25 Para un ensayo que no es a base de células, cada pocillo contiene una molécula fluorescente, tal como fluo-3. Se añade el sobrenadante al pocillo, y se detecta un cambio en la fluorescencia.

30 Para medir la fluorescencia de calcio intracelular, se establece el FLIPR para los siguientes parámetros: (1) la ganancia del sistema es de 300-800 mW; (2) el tiempo de exposición es de 0,4 segundos; (3) la cámara F/parada es de F/2; (4) la excitación es a 488 nm; (5) la emisión es a 530 nm; y (6) la adición de muestra es de 50 ul. El aumento de emisión a 530 nm indica un acontecimiento de señalización extracelular provocado por la molécula, o bien CRCGCL o una molécula inducida por CRCGCL, que ha dado como resultado un aumento en la concentración de Ca⁺⁺ intracelular.

35 Ejemplo 20

Ensayo de selección de alto rendimiento para identificar la actividad tirosina cinasa

40 Las proteínas tirosinas cinasas (PTK) representan un grupo diverso de cinasas transmembrana y citoplásmicas. Dentro del grupo de proteínas tirosina cinasas receptoras (RPTK) están los receptores para una gama de factores de crecimiento mitogénicos y metabólicos incluyendo las subfamilias de PDGF, FGF, EGF, NGF, HGF y de receptores de insulina. Además, hay una gran familia de RPTK para los que se desconoce el ligando correspondiente. Los ligandos para las RPTK incluyen principalmente pequeñas proteínas secretadas, pero también proteínas de la matriz extracelular y unidas a membrana.

50 La activación de RPTK por ligandos implica dimerización del receptor mediada por el ligando, dando como resultado la transfosforilación de las subunidades del receptor y la activación de las tirosinas cinasas citoplásmicas. Las tirosinas cinasas citoplásmicas incluyen tirosinas cinasas asociadas a receptor de la familia src (por ejemplo, src, yes, lck, lyn, fyn) y proteínas tirosinas cinasas citosólicas y no unidas a receptor, tales como la familia Jak, cuyos miembros median la transducción de señales desencadenada por la superfamilia de receptores de citocinas (por ejemplo, las interleucinas, interferones, GM-CSF y leptina).

55 Debido a la amplia gama de factores conocidos que pueden estimular la actividad tirosina cinasa, identificar si CRCGCL o una molécula inducida por CRCGCL puede activar rutas de transducción de señales de tirosina cinasas es de interés. Por tanto, se diseña el siguiente protocolo para identificar tales moléculas que pueden activar las rutas de transducción de señales de tirosina cinasas.

60 Se siembran células seleccionadas como diana (por ejemplo, queratinocitos primarios) a una densidad de aproximadamente 25.000 células por pocillo en unas placas de selección silenciosas de Loprodyne de 96 pocillos adquiridas de Nalge Nunc (Naperville, IL). Se esterilizan las placas con dos aclarados de 30 minutos con etanol al 100%, se aclaran con agua y se secan durante la noche. Se recubren algunas placas durante 2 h con 100 ml de colágeno de tipo I de calidad para cultivo celular (50 mg/ml), gelatina (al 2%) o polilisina (50 mg/ml), que se adquirieron todos de Sigma Chemicals (St. Louis, MO) o Matrigel al 10% adquirido de Becton Dickinson (Bedford, MA), o suero de ternero, se aclaran con PBS y se almacenan a 4°C. Se somete a ensayo el crecimiento celular en estas placas sembrando 5.000 células/pocillo en medio de crecimiento y mediante la cuantificación indirecta del número de células a través del uso de alamarBlue tal como se describe por el fabricante Alamar Biosciences, Inc. (Sacramento, CA) tras 48 h. Las cubiertas de placas Falcon n.º 3071 de Becton Dickinson (Bedford, MA) se usan para recubrir las placas de selección silenciosas

ES 2 357 020 T3

de Loprodyne. También pueden usarse placas de cultivo celular Microtest III de Falcon en algunos experimentos de proliferación.

Para preparar extractos, se siembran células A431 sobre las membranas de nailon de las placas Loprodyne (20.000/ 5 200 ml/pocillo) y se cultivan durante la noche en medio completo. Las células se inactivan mediante incubación en medio basal libre de suero durante 24 h. Tras un tratamiento de 5-20 minutos con EGF (60 ng/ml) o 50 ul del sobrenadante producido en el ejemplo 12, se retiró el medio y se añaden 100 ml de tampón de extracción ((HEPES 20 mM pH 7,5, NaCl 0,15 M, Triton X-100 al 1%, SDS al 0,1%, Na₃VO₄ 2 mM, Na₄P₂O₇ 2 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas (n.º 1836170) obtenidos de Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) a cada pocillo y se agita la placa 10 en un agitador rotatorio durante 5 minutos a 4°C. Entonces se coloca la placa en un colector de transferencia de vacío y se filtra el extracto a través de los fondos de membrana de 0,45 mm de cada pocillo usando el sistema de vacío interno. Se recogen los extractos en una placa de ensayo/captura de 96 pocillos en el fondo del colector de vacío y se ponen inmediatamente en hielo. Para obtener extractos clarificados mediante centrifugación, el contenido de cada pocillo, tras solubilización con detergente durante 5 minutos, se retira y se centrifuga durante 15 minutos a 4°C a 16.000 x g.

15 Se someten a prueba los extractos filtrados para determinar los niveles de actividad tirosina cinasa. Aunque se conocen muchos métodos para detectar la actividad tirosina cinasa, se describe un método en el presente documento.

Generalmente, se evalúa la actividad tirosina cinasa de un sobrenadante determinando su capacidad de fosforilar un 20 residuo de tirosina en un sustrato específico (un péptido biotilado). Los péptidos biotilados que pueden usarse para este fin incluyen PSK1 (correspondiente a los aminoácidos 6-20 de la cinasa de división celular cdc2-p34) y PSK2 (correspondiente a los aminoácidos 1-17 de la gastrina). Ambos péptidos son sustratos para una gama de tirosinas cinasas y están disponibles en Boehringer Mannheim.

25 Se establece la reacción de tirosina cinasa añadiendo los siguientes componentes en orden. En primer lugar, se añaden 10 ul de péptido biotilado 5 uM, después 10 ul de ATP/Mg₂₊ (ATP 5 mM/MgCl₂ 50 mM), después 10 ul de tampón de ensayo 5x (clorhidrato de imidazol 40 mM, pH 7,3, beta-glicerofosfato 40 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 100 mM, MnCl₂ 5 mM, BSA 0,5 mg/ml), después 5 ul de vanadato de sodio (1 mM), y después 5 ul de agua. Se mezclan los componentes suavemente y se preincuba la mezcla de reacción a 30°C durante 2 min. Se inicia la reacción 30 añadiendo 10 ul de la enzima control o el sobrenadante filtrado.

Entonces se termina la reacción de ensayo de tirosina cinasa añadiendo 10 ul de EDTA 120 mM y se ponen las reacciones en hielo.

35 Se determina la actividad tirosina cinasa transfiriendo una alícuota de 50 ul de mezcla de reacción a un módulo de placa de microtitulación (MTP) e incubando a 37°C durante 20 min. Esto permite que la placa de 96 pocillos recubierta con estreptavidina se asocie con el péptido biotilado. Se lava el módulo de MTP con 300 ul/pocillo de PBS cuatro veces. A continuación se añaden 75 ul de anticuerpo anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa de rábano (anti-P-Tyr-POD (0,5 u/ml)) a cada pocillo y se incuba a 37°C durante una hora. Se lava el pocillo tal como se describió 40 anteriormente.

Después se añaden 100 ul de disolución de sustrato de peroxidasa (Boehringer Mannheim) y se incuba a temperatura ambiente durante al menos 5 min. (hasta 30 min). Se mide la absorbancia de la muestra a 405 nm usando lector de ELISA. Se cuantifica el nivel de actividad peroxidasa unida usando un lector de ELISA y refleja el nivel de actividad 45 tirosina cinasa.

Ejemplo 21

Ensayo de selección de alto rendimiento para identificar la actividad de fosforilación

50 Como posible alternativa y/o complemento para el ensayo de la actividad proteína tirosina cinasa descrita en el ejemplo 20, también puede usarse un ensayo que detecta la activación (fosforilación) de productos intermedios principales de transducción de señales intracelular. Por ejemplo, tal como se describe a continuación, un ensayo particular puede detectar la fosforilación de tirosinas de las cinasas Erk-1 y Erk-2. Sin embargo, la fosforilación de otras moléculas, tales como Raf, JNK, p38 MAP, Map cinasa cinasa (MEK), MEK cinasa, Src, cinasa específica del músculo (MuSK), IRAK, Tec y Janus, así como cualquier otra molécula de fosfoerina, fosfotirosina o fosfotreonina, puede detectarse sustituyendo estas moléculas por Erk-1 o Erk-2 en el siguiente ensayo.

Específicamente, se prepararon placas de ensayo recubriendo los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos 60 con 0,1 ml de proteína G (1 ug/ml) durante 2 h a temperatura ambiente, (TA). Entonces se aclaran las placas con PBS y se bloquean con BSA al 3%/PBS durante 1 h a TA. Después, las placas con proteína G se tratan con 2 anticuerpos monoclonales comerciales (100 ng/pocillo) contra Erk-1 y Erk-2 (1 h a TA) (Santa Cruz Biotechnology). (Para detectar otras moléculas, puede modificarse fácilmente esta etapa sustituyendo un anticuerpo monoclonal que detecta cualquiera de las moléculas descritas anteriormente). Tras 3-5 aclarados con PBS, se almacenan las placas a 4°C hasta 65 su uso.

Se siembran células A431 a 20.000/pocillo en una placa filtrante Loprodyne de 96 pocillos y se cultivan durante la noche en medio de crecimiento. Entonces se privan las células de nutrientes durante 48 h en medio basal (DMEM)

ES 2 357 020 T3

y después se tratan con EGF (6 ng/pocillo) o 50 ul de los sobrenadantes obtenidos en el ejemplo 12 durante 5-20 minutos. Entonces se solubilizan las células y se filtran los extractos directamente en la placa de ensayo.

Tras incubación con el extracto durante 1 h a TA, se aclaran de nuevo los pocillos. Como control positivo, se usa una preparación comercial de MAP cinasa (10 ng/pocillo) en lugar de extracto de A431. Entonces se tratan las placas con un anticuerpo policlonal (de conejo) comercial (1 ug/ml) que reconoce específicamente el epítipo fosforilado de las cinasas Erk-1 y Erk-2 (1 h a TA). Se biotinila este anticuerpo mediante procedimientos convencionales. Entonces se cuantifica el anticuerpo policlonal unido mediante incubaciones sucesivas con europio-estreptavidina y reactivo que potencia la fluorescencia de europio en el instrumento DELFIA de Wallac (fluorescencia resuelta en el tiempo). Un aumento de la señal fluorescente con respecto al fondo indica una fosforilación por CRCGCL o una molécula inducida por CRCGCL.

Ejemplo 22

15 *Método de determinación de alteraciones en el gen de CRCGCL*

Va a aislarse ARN aislado de familias completas o pacientes individuales que se presentan con un fenotipo de interés (tal como una enfermedad). Entonces se genera ADNc a partir de estas muestras de ARN usando protocolos conocidos en la técnica. (Véase, Sambrook). Entonces se usa el ADNc como molde para PCR, que emplea cebadores que rodean regiones de interés en SEQ ID NO:1. Las condiciones de PCR sugeridas consisten en 35 ciclos a 95°C durante 30 segundos; 60-120 segundos a 52-58°C; y 60-120 segundos a 70°C, usando las disoluciones tampón descritas en Sidransky, D., *et al.*, Science 252: 706 (1991).

Entonces se secuencian los productos de PCR usando cebadores marcados en su extremo 5' con polinucleótido cinasa de T4, empleando polimerasa SequiTherm. (Epicentre Technologies). También se determinan los límites intrón-exón de exones seleccionados de CRCGCL y se analizan productos de PCR genómicos para confirmar los resultados. Entonces los productos de PCR que albergan mutaciones sospechosas en CRCGCL se clonan y se secuencian para validar los resultados de la secuenciación directa.

Se clonan los productos de PCR de CRCGCL en vectores con cola T tal como se describe en Holton, T.A. y Graham, M.W., Nucleic Acids Research, 19:1156 (1991) y se secuencian con polimerasa de T7 (United States Biochemical). Se identifican los individuos afectados mediante mutaciones en CRCGCL no presentes en individuos no afectados.

También se observan las redistribuciones genómicas como método para determinar alteraciones en el gen de CRCGCL. Los clones genómicos aislados según el ejemplo 2 se someten a traslado por mellas con digoxigenindesoxi-uridina 5'-trifosfato (Boehringer Mannheim), y se realiza FISH tal como se describe en Johnson, Cg. *et al.*, Methods Cell Biol. 35:73-99 (1991). Se lleva a cabo la hibridación con la sonda marcada usando un enorme exceso de ADN de cot-1 humano para hibridación específica en el locus genómico de CRCGCL.

Se someten a contratinción los cromosomas con 4,6-diamino-2-fenilidol y yoduro de propidio, produciendo una combinación de bandas C y R. Se obtienen imágenes alineadas para un mapeo preciso usando un conjunto de filtro de triple banda (Chroma Technology, Brattleboro, VT) en combinación con una cámara de dispositivo con acoplamiento de carga enfriada (Photometrics, Tucson, AZ) y filtros de longitud de onda de excitación variable. (Johnson, Cv. *et al.*, Genet. Anal. Tech. Appl., 8:75 (1991)). Se realizan la toma de imágenes, el análisis y las mediciones de longitud fraccional cromosómica usando el sistema del programa ISee Graphical (Inovision Corporation, Durham, NC). Se identifican alteraciones cromosómicas de la región genómica de CRCGCL (hibridada mediante la sonda) como inserciones, deleciones y translocaciones. Se usan estas alteraciones de CRCGCL como marcador de diagnóstico para una enfermedad asociada.

50 Ejemplo 23

Método para detectar niveles anómalos de CRCGCL en una muestra biológica

Pueden detectarse polipéptidos de CRCGCL en una muestra biológica, y si se detecta un nivel aumentado o disminuido de CRCGCL, este polipéptido es un marcador para un fenotipo particular. Los métodos de detección son numerosos, y por tanto, se entiende que un experto en la técnica puede modificar el siguiente ensayo para ajustarlo a sus necesidades particulares.

Por ejemplo, se usan los ELISA de tipo *sándwich*-anticuerpo para detectar CRCGCL en una muestra, preferiblemente una muestra biológica. Se recubren los pocillos de una placa de microtitulación con anticuerpos específicos para CRCGCL, a una concentración final de 0,2 a 10 ug/ml. Los anticuerpos son o bien monoclonales o bien policlonales y se producen mediante el método descrito en el ejemplo 11. Se bloquean los pocillos de modo que se reduce la unión no específica de CRCGCL al pocillo.

Entonces se incuban los pocillos recubiertos durante > 2 horas a TA con una muestra que contiene CRCGCL. Preferiblemente, deben usarse diluciones en serie de la muestra para validar los resultados. Entonces se lavan las placas tres veces con agua desionizada o destilada para eliminar el CRCGCL no unido.

ES 2 357 020 T3

A continuación, se añaden 50 ul de conjugado de fosfatasa alcalina-anticuerpo específico, a una concentración de 25-400 ng, y se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavan de nuevo las placas tres veces con agua desionizada o destilada para eliminar el conjugado no unido.

5 Se añaden 75 ul de disolución de sustrato de fosfato de 4-metilumbeliferilo (MUP) o fosfato de p-nitrofenilo (NPP) a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Se mide la reacción mediante un lector de placas de microtitulación. Se prepara una curva patrón, usando diluciones en serie de una muestra control, y se representa gráficamente la concentración de polipéptido de CRCGCL en el eje X (escala logarítmica) y la fluorescencia o absorbancia en el eje Y (escala lineal). Se interpola la concentración del CRCGCL en la muestra usando la curva patrón.

Ejemplo 24

Formulación de un polipéptido

15 La composición de CRCGCL se formulará y se dosificará de una manera consecuente con la buena práctica médica, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente (especialmente los efectos secundarios del tratamiento con el polipéptido de CRCGCL solo), el sitio de administración, el método de administración, la programación de la administración, y otros factores conocidos por los médicos. Por tanto, la "cantidad eficaz" para los fines del presente documento se determina mediante tales consideraciones.

20 Como proposición general, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de CRCGCL administrado por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 1 ug/kg/día a 10 mg/kg/día de peso corporal del paciente, aunque, tal como se indicó anteriormente, esto se someterá al criterio terapéutico. Más preferiblemente, esta dosis es de al menos 0,01 mg/kg/día, y lo más preferiblemente para seres humanos de entre aproximadamente 0,01 y 1 mg/kg/día para la hormona. Si se administra de manera continua, CRCGCL se administra normalmente a una tasa de dosis de aproximadamente 1 ug/kg/hora a aproximadamente 50 ug/kg/hora, o bien mediante 1-4 inyecciones al día o bien mediante infusiones subcutáneas continuas, por ejemplo, usando una minibomba. También puede emplearse una disolución en bolsa intravenosa. La duración del tratamiento que se necesita para observar cambios y el intervalo tras el tratamiento para que se produzcan respuestas parece variar dependiendo del efecto deseado.

30 Las composiciones farmacéuticas que contienen CRCGCL se administran por vía oral, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, tópicamente (como mediante polvos, pomadas, geles, gotas o parche transdérmico), por vía bucal, o como un aerosol oral o nasal. "Portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación no tóxicos sólidos, semisólidos o líquidos o adyuvante de formulación de cualquier tipo. El término "parenteral" tal como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración que incluyen inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

40 También se administra adecuadamente CRCGCL mediante sistemas de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen polilactidas (patente estadounidense n.º 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman, U. *et al.*, Biopolymers 22:547-556 (1983)), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (R. Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981), y R. Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)), etileno-acetato de vinilo (R. Langer *et al.*) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico (documento EP 133.988). Las composiciones de liberación sostenida también incluyen polipéptidos de CRCGCL atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen el CRCGCL se preparan mediante métodos conocidos *per se*: documento DE 3.218.121; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034 (1980); documento EP 52.322; documento EP 36.676; documento EP 88.046; documento EP 143.949; documento EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; las patentes estadounidenses n.ºs 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. Habitualmente, los liposomas son del tipo unilamelar pequeño (aproximadamente 200-800 Angstrom) en los que el contenido en lípidos es superior a aproximadamente el 30 por ciento molar de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia óptima con polipéptido secretado.

55 Para la administración parenteral, en una realización, generalmente se formula CRCGCL mezclándolo al grado de pureza deseado, en una forma inyectable de dosificación unitaria (disolución, suspensión o emulsión), con un portador farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que no es tóxico para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas y es compatible con otros componentes de la formulación. Por ejemplo, la formulación preferiblemente no incluye agentes oxidantes y otros compuestos que se sabe que son perjudiciales para los polipéptidos.

65 Generalmente, las formulaciones se preparan poniendo en contacto CRCGCL uniforme e íntimamente con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos. Entonces, si es necesario, se conforma el producto para dar la formulación deseada. Preferiblemente el portador es un portador parenteral, más preferiblemente una disolución que es isotónica con la sangre del receptor. Los ejemplos de tales vehículos portadores incluyen agua, solución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tales como aceites fijos y oleato de etilo también son útiles en el presente documento, así como los liposomas.

ES 2 357 020 T3

El portador contiene adecuadamente cantidades minoritarias de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético, y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato, poloxámeros o PEG.

Normalmente, se formula CRGCL en tales vehículos a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, preferiblemente 1-10 mg/ml, a un pH de aproximadamente 3 a 8. Se entenderá que el uso de determinados excipientes, portadores o estabilizadores dará como resultado la formación de sales de polipéptidos.

El CRGCL usado para administración terapéutica puede ser estéril. La esterilidad se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micras). Generalmente, las composiciones terapéuticas de polipéptidos se colocan en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa para disolución intravenosa o vial que tiene un tapón que puede perforarse mediante una aguja de inyección hipodérmica.

Habitualmente, los polipéptidos de CRGCL se almacenarán en recipientes de dosis múltiples o unitarias, por ejemplo, ampollas o viales sellados, como una disolución acuosa o como una formulación liofilizada para su reconstitución. Como ejemplo de una formulación liofilizada, se llenan viales de 10 ml con 5 ml de disolución acuosa de polipéptido de CRGCL (p/v) al 1% esterilizada por filtración, y se liofiliza la mezcla resultante. Se prepara la disolución para infusión reconstituyendo el polipéptido de CRGCL liofilizado usando agua para inyección bacteriostática.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenados con uno o más de los componentes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Asociado con tal(es) recipiente(s) puede haber una notificación en la forma recomendada por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, notificación que refleja la aprobación por la agencia de la fabricación, el uso o la venta para administración en seres humanos. Además, puede emplearse CRGCL junto con otros compuestos terapéuticos.

Ejemplo 25

Método para tratar niveles disminuidos de CRGCL

La presente invención se refiere a un método para tratar a un individuo que lo necesita de un nivel disminuido de actividad de CRGCL en el organismo, que comprende administrar a tal individuo una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de antagonista de CRGCL. Los antagonistas preferidos para su uso en la presente invención son anticuerpos específicos contra CRGCL.

Además, se apreciará que los estados provocados por una disminución en el nivel de expresión convencional o normal de CRGCL en un individuo puede tratarse administrando CRGCL, preferiblemente en la forma secretada. Por tanto, la invención también proporciona un método de tratamiento de un individuo que lo necesita de un nivel aumentado de polipéptido de CRGCL que comprende administrar a tal individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad de CRGCL para aumentar el nivel de actividad de CRGCL en tal individuo.

Por ejemplo, un paciente con niveles disminuidos de polipéptido de CRGCL recibe una dosis diaria de 0,1-100 µg/kg del polipéptido durante seis días consecutivos. Preferiblemente, el polipéptido está en la forma secretada. Los detalles exactos del esquema de dosificación, basado en la administración y formulación, se proporcionan en el ejemplo 24.

Ejemplo 26

Método para tratar niveles aumentados de CRGCL

La presente invención también se refiere a un método para tratar un individuo que lo necesita de un nivel aumentado de actividad de CRGCL en el organismo, que comprende administrar a tal individuo una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de CRGCL o un agonista del mismo.

Se usa tecnología antisentido para inhibir la producción de CRGCL. Esta tecnología es un ejemplo de un método de disminución de los niveles de polipéptido de CRGCL, preferiblemente una forma secretada, debido a una variedad de etiologías, tales como cáncer.

Por ejemplo, a un paciente que se le han diagnosticado niveles aumentados anómalamente de CRGCL se le administran polinucleótidos antisentido por vía intravenosa a 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 3,0 mg/kg-día durante 21 días. Se

ES 2 357 020 T3

repite este tratamiento tras un período de descanso de 7 días si el tratamiento se toleraba bien. Se proporciona la formulación del polinucleótido antisentido en el ejemplo 24.

Ejemplo 27

5

Método de tratamiento usando terapia génica - ex vivo

Un método de fibroblastos de trasplantes de terapia génica, que pueden expresar polipéptidos de CRCGCL, en un paciente. Generalmente, se obtienen fibroblastos de un sujeto mediante biopsia de piel. Se coloca el tejido resultante en medio de cultivo tisular y se separa en pequeños trozos. Se colocan pedazos pequeños del tejido sobre una superficie húmeda de un matraz de cultivo tisular, se colocan aproximadamente diez trozos en cada matraz. Se voltea el matraz, se cierra herméticamente y se deja a temperatura ambiente durante la noche. Tras 24 horas a temperatura ambiente, se invierte el matraz y los pedazos de tejido permanecen fijados al fondo del matraz y se añade medio nuevo (por ejemplo, medio F12 de Ham, con FBS al 10%, penicilina y estreptomycin). Entonces se incuban los matraces a 37°C durante aproximadamente una semana.

En este momento, se añade medio nuevo y se cambia posteriormente cada varios días. Tras unas dos semanas adicionales en cultivo, surge una monocapa de fibroblastos. Se tripsiniza la monocapa y se amplía a escala a matraces más grandes.

20

pMV-7 (Kirschmeier, P.T. *et al.*, DNA, 7:219-25 (1988)), flanqueado por las repeticiones terminales largas del virus de sarcoma murino de Moloney, se digiere con EcoRI y HindIII y se trata posteriormente con fosfatasa intestinal de ternero. Se fracciona el vector lineal sobre gel de agarosa y se purifica, usando perlas de vidrio.

El ADNc que codifica para CRCGCL puede amplificarse usando cebadores de PCR que corresponden a las secuencias de los extremos 5' y 3' respectivamente tal como se expone en el ejemplo 1. Preferiblemente, el cebador en 5' contiene un sitio EcoRI y el cebador en 3' incluye un sitio HindIII. Se añaden juntas cantidades iguales de la estructura principal lineal del virus de sarcoma murino de Moloney y el fragmento de EcoRI y HindIII amplificado, en presencia de ADN ligasa de T4. Se mantiene la mezcla resultante en condiciones apropiadas para el ligamiento de los dos fragmentos. Entonces la mezcla de ligamiento se usa para transformar bacterias HB 101, que después se siembran en placa sobre agar que contiene kanamicina para el fin de confirmar que el vector contiene CRCGCL apropiadamente insertado.

Las células de empaquetamiento GP+am12 o pA317 anfotrópicas se hacen crecer en cultivo celular hasta densidad confluyente en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con suero de ternero (CS) al 10%, penicilina y estreptomycin. Entonces se añade el vector MSV que contiene el gen de CRCGCL al medio y se transducen las células de empaquetamiento con el vector. Las células de empaquetamiento producen ahora partículas virales infecciosas que contiene el gen de CRCGCL (las células de empaquetamiento se denominan ahora células productoras).

Se añade medio nuevo a las células productoras transducidas, y posteriormente, se recoge el medio de una placa de 10 cm de células productoras confluentes. El medio usado, que contiene las partículas virales infecciosas, se filtra a través de un filtro Millipore para eliminar las células productoras sueltas y entonces se usa este medio para infectar células de fibroblasto. Se retira el medio de una placa subconfluyente de fibroblastos y se reemplaza rápidamente por el medio de las células productoras. Se retira y se reemplaza este medio por medio nuevo. Si el título del virus es alto, entonces prácticamente todos los fibroblastos se infectarán y no se requiere selección. Si el título es muy bajo, entonces es necesario usar un vector retroviral que tiene un marcador seleccionable, tal como neo o his. Una vez que se han infectado los fibroblastos eficazmente, se analizan los fibroblastos para determinar si se produce la proteína de CRCGCL.

Entonces los fibroblastos modificados por ingeniería genética se trasplantan en el huésped, o bien solo o bien tras haberse hecho crecer hasta confluencia sobre microperlas portadoras citodex 3.

Ejemplo 28

Terapia génica usando gen de CRCGCL endógeno

Otro método de terapia génica según la presente invención implica asociar operativamente la secuencia de CRCGCL endógeno con un promotor a través de recombinación homóloga tal como se describe, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 5.641.670, presentada el 24 de junio de 1997; publicación internacional n.º WO 96/29411, publicada el 26 de setiembre de 1996; publicación internacional n.º WO 94/12650, publicada el 4 de agosto de 1994; Koller *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932-8935 (1989); y Zijlstra *et al.*, Nature 342:435-438 (1989). Este método implica la activación de un gen que está presente en las células diana, pero que no se expresa en las células, o se expresa a un nivel inferior al deseado.

Se preparan construcciones de polinucleótidos que contienen unas secuencias promotoras y de direccionamiento, que son homólogas a la secuencia no codificante en 5' de CRCGCL endógeno, franqueando el promotor. La secuencia de direccionamiento estará suficientemente cerca del extremo 5' de CRCGCL de modo que el promotor se unirá operativamente a la secuencia endógena con recombinación homóloga. Pueden amplificarse las secuencias promo-

ES 2 357 020 T3

toras y de direccionamiento usando PCR. Preferiblemente, el promotor amplificado contiene sitios de enzimas de restricción definidos en los extremos 5' y 3'. Preferiblemente, el extremo 3' de la primera secuencia de direccionamiento contiene el mismo sitio de enzima de restricción que el extremo 5' del promotor amplificado y el extremo 5' de la segunda secuencia de direccionamiento contiene el mismo sitio de restricción que el extremo 3' del promotor amplificado.

Se digieren el promotor amplificado y las secuencias de direccionamiento amplificadas con las enzimas de restricción apropiadas y se tratan posteriormente con fosfatasa intestinal de ternero. Se añaden juntos el promotor digerido y las secuencias de direccionamiento digeridas en presencia de ADN ligasa de T4. Se mantiene la mezcla resultante en condiciones apropiadas para el ligamiento de los dos fragmentos. Se fracciona por tamaños la construcción sobre un gel de agarosa después se purifica mediante extracción con fenol y precipitación con etanol.

En este ejemplo, se administran las construcciones de polinucleótidos como polinucleótidos desnudos a través de electroporación. Sin embargo, también pueden administrarse las construcciones de polinucleótidos con agentes que facilitan la transfección, tales como liposomas, secuencias virales, partículas virales, agentes precipitantes, etc. Tales métodos de administración se conocen en la técnica.

Una vez que se transfectan las células, tendrá lugar la recombinación homóloga que da como resultado el promotor que está unido operativamente a la secuencia de CRCGCL endógeno. Esto da como resultado la expresión de CRCGCL en la célula. Puede detectarse la expresión mediante tinción inmunológica, o cualquier otro método conocido en la técnica.

Se obtienen fibroblastos de un sujeto mediante biopsia de piel. Se coloca el tejido resultante en DMEM + suero de ternero fetal al 10%. Los fibroblastos que crecen exponencialmente o de fase estacionaria temprana se tripsinizan y se aclaran de la superficie de plástico con medio nutritivo. Se retira una alícuota de la suspensión celular para su recuento, y se someten las células restantes a centrifugación. Se aspira el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 5 ml de tampón de electroporación (HEPES 20 mM, pH 7,3, NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 0,7 mM, dextrosa 6 mM). Se vuelven a centrifugar las células, se aspira el sobrenadante, y se resuspenden las células en tampón de electroporación que contiene albúmina sérica bovina acetilada 1 mg/ml. La suspensión celular final contiene aproximadamente 3 X 10⁶ células/ml. La electroporación debe realizarse inmediatamente tras la resuspensión.

Se prepara ADN de plásmido según técnicas convencionales. Por ejemplo, para construir un plásmido para el direccionamiento al locus de CRCGCL, se digiere plásmido pUC18 (MBI Fermentas, Amherst, NY) con HindIII. Se amplifica por PCR el promotor de CMV con un sitio XbaI en el extremo 5' y un sitio BamHI en el extremo 3'. Se amplifican dos secuencias no codificantes de CRCGCL a través de PCR: se amplifica una secuencia no codificante de CRCGCL (fragmento 1 de CRCGCL) con un sitio HindIII en el extremo 5' y un sitio XbaI en el extremo 3'; se amplifica la otra secuencia no codificante de CRCGCL (fragmento 2 de CRCGCL) con un sitio BamHI en el extremo 5' y un sitio HindIII en el extremo 3'. Se digieren el promotor de CMV y los fragmentos de CRCGCL con las enzimas apropiadas (promotor de CMV - XbaI y BamHI; fragmento 1 de CRCGCL - XbaI; fragmento 2 de CRCGCL - BamHI) y se ligan juntos. Se digieren el producto de ligamiento resultante con HindIII, y se liga con el plásmido de pUC 18 digerido con HindIII.

Se añade ADN de plásmido a una cubeta estéril con una separación de electrodos de 0,4 cm (Bio-Rad). La concentración de ADN final es generalmente de al menos 120 µg/ml. Entonces se añaden 0,5 ml de la suspensión celular (que contiene aproximadamente 1,5 X 10⁶ células) a la cubeta, y se mezclan suavemente la suspensión celular y las disoluciones de ADN. Se realiza la electroporación con un aparato Gene-Pulser (Bio-Rad). Se establecen la capacitancia y la tensión en 960 µF y 250-300 V, respectivamente. A medida que aumenta la tensión, disminuye la supervivencia celular, pero el porcentaje de células sobrevivientes que incorporan de manera estable el ADN introducido en sus genomas aumenta drásticamente. Dados estos parámetros, debe observarse un tiempo de impulso de aproximadamente 14-20 mseg.

Se mantienen las células sometidas a electroporación a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 min., y entonces el contenido de la cubeta se retira suavemente con una pipeta de transferencia estéril. Se añaden las células directamente a 10 ml de medio nutritivo precalentado (DMEM con suero de ternero al 15%) en una placa de 10 cm y se incuban a 37°C. Al día siguiente, se aspira y se reemplaza el medio por 10 ml de medio nuevo y se incuban durante unas 16-24 horas adicionales.

Entonces los fibroblastos modificados por ingeniería genética se inyectan en el huésped, o bien solos o bien después que se han hecho crecer hasta confluencia en microperlas portadoras citodex 3. Los fibroblastos ahora producen el producto proteico. Entonces los fibroblastos pueden introducirse en un paciente tal como se describió anteriormente.

Ejemplo 29

Terapia génica

Pueden usarse los polinucleótidos de la presente invención en métodos de terapia génica *in vivo* para tratar trastornos, enfermedades y estados. El método de terapia génica se refiere a la introducción de secuencias CRCGCL de ácido nucleico desnudo (ADN, ARN, y ADN o ARN antisentido) en un animal para aumentar o disminuir la expresión del

polipéptido de CRCGCL. Puede unirse operativamente el polinucleótido de CRCGCL a un promotor o cualquier otro elemento genético necesario para la expresión del polipéptido de CRCGCL por el tejido diana. Tales técnicas y métodos de terapia génica y administración se conocen en la técnica, véase, por ejemplo, los documentos WO90/11092, WO98/11779, las patentes estadounidense n.º 5693622, 5705151, 5580859; Tabata H. *et al.* (1997) *Cardiovasc. Res.* 35(3):470-479, Chao J *et al.* (1997) *Pharmacol. Res.* 35(6):517-522, Wolff J.A. (1997) *Neuromuscul. Disord.* 7(5):314-318, Schwartz B. *et al.* (1996) *Gene Ther.* 3(5):405-411, Tsurumi Y. *et al.* (1996) *Circulation* 94(12):3281-3290.

Pueden administrarse las construcciones de polinucleótidos de CRCGCL mediante cualquier método que administre materiales inyectables a las células de un animal, tal como, inyección en el espacio intersticial de tejidos (corazón, músculo, piel, pulmón, hígado, intestino y similares). Pueden administrarse las construcciones de polinucleótidos de CRCGCL en un portador acuoso o líquido farmacéuticamente aceptable.

El término polinucleótido, ADN o ARN "desnudo", se refiere a secuencias que están libres de cualquier vehículo de administración que actúa para ayudar, promover o facilitar la entrada en la célula, incluyendo secuencias virales, partículas virales, formulaciones de liposomas, Lipofectin o agentes precipitantes y similares. Sin embargo, también pueden administrarse los polinucleótidos de CRCGCL en formulaciones de liposomas (tales como las enseñadas en Felgner P.L. *et al.* (1995) *Ann. NY Acad. Sci.* 772:126-139 y Abdallah B. *et al.* (1995) *Biol. Cell* 85(1):1-7) que pueden prepararse mediante métodos bien conocidos por los expertos en la técnica.

Las construcciones de vector de polinucleótido de CRCGCL usadas en el método de terapia génica son preferiblemente construcciones que no se integrarán en el genoma del huésped ni contendrán secuencias que permitan la replicación. Cualquier promotor fuerte conocido por los expertos en la técnica puede usarse para dirigir la expresión de ADN. A diferencia de otras técnicas de terapias génicas, una ventaja principal de la introducción de secuencias de ácidos nucleicos desnudos en células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de polinucleótidos en las células. Los estudios han mostrado que las secuencias de ADN que no se replican pueden introducirse en células para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante períodos de hasta seis meses.

Puede administrarse la construcción de polinucleótidos de CRCGCL en el espacio intersticial de tejidos dentro de un animal, incluyendo de músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula y tejido conjuntivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende el líquido intercelular, matriz de mucopolisacáridos entre las fibras reticulares de tejidos de órganos, fibras elásticas en las paredes de vasos o cámaras, fibras de colágeno de tejidos fibrosos, o esa misma matriz dentro de tejido conjuntivo que reviste células musculares o en las lagunas del hueso. Es de manera similar el espacio ocupado por el plasma de la circulación y el líquido linfático de los canales linfáticos. Se prefiere la administración en el espacio intersticial del tejido muscular por las razones tratadas a continuación. Pueden administrarse convenientemente mediante inyección en los tejidos que comprenden estas células. Preferiblemente, se administran a y se expresan en células que no se dividen, persistentes que se diferencian, aunque puede lograrse la administración y la expresión en células no diferenciadas o diferenciadas de manera menos completa, tales como, por ejemplo, células madre de sangre o fibroblastos de piel. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad para captar y expresar polinucleótidos.

Para la inyección de polinucleótidos de CRCGCL desnudos, una cantidad de dosificación eficaz de ADN o ARN estará en el intervalo de desde aproximadamente 0,05 g/kg de peso corporal hasta aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferiblemente la dosificación será de desde aproximadamente 0,005 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg y más preferiblemente de desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg. Naturalmente, tal como apreciará el experto, esta dosificación variará según el sitio de inyección tisular. Puede determinarse fácilmente la dosificación apropiada y eficaz de secuencia de ácido nucleico por los expertos en la técnica y puede depender del estado que esté tratándose y de la vía de administración. La vía de administración preferida es mediante la vía de inyección parenteral en el espacio intersticial de tejidos. Sin embargo, también pueden usarse otras vías parenterales, tales como, inhalación de una formulación de aerosol particularmente para la administración a tejidos pulmonares o bronquiales, garganta o membranas mucosas de la nariz. Además, pueden administrarse construcciones de polinucleótidos de CRCGCL desnudos a arterias durante angioplastia mediante el catéter usado en el procedimiento.

Los efectos de respuesta a la dosis de polinucleótido de CRCGCL inyectado en músculo *in vivo* se determinan tal como sigue. Se prepara ADN molde de CRCGCL adecuado para la producción de ARNm que codifica para el polipéptido de CRCGCL según una metodología de ADN recombinante convencional. El ADN molde, que puede ser o bien circular o bien lineal, o bien se usa como ADN desnudo o bien se compleja con liposomas. Entonces se inyectan en los músculos cuádriceps de ratones diversas cantidades del ADN molde.

Se anestesian ratones Balb/C machos y hembras de cinco a seis semanas de edad mediante inyección intraperitoneal con 0,3 ml de Avertin al 2,5%. Se hace una incisión de 1,5 cm en la cara anterior del muslo, y se visualiza directamente el músculo cuádriceps. Se inyecta el ADN molde de CRCGCL en 0,1 ml de portador en una jeringuilla de 1 cc a través de una aguja de calibre 27 durante un minuto, aproximadamente a 0,5 cm del sitio de inserción distal del músculo en la rodilla y aproximadamente a 0,2 cm de profundidad. Se coloca una sutura sobre el sitio de inyección para la localización futura, y se cierra la piel con clips de acero inoxidable.

Tras un tiempo de incubación apropiado (por ejemplo, 7 días) se preparan extractos de músculo extirpando el cuádriceps completo. Cada quinta sección transversal de 15 µm de los músculos cuádriceps individuales se tiñe histológicamente para determinar la expresión de la proteína de CRCGCL. Puede realizarse un transcurso temporal para la expresión de la proteína de CRCGCL de manera similar excepto que los cuádriceps de diferentes ratones se reco-

5
10

Ejemplo 30

Animales transgénicos con CRCGCL

15
20

También pueden expresarse los polipéptidos de CRCGCL en animales transgénicos. Pueden usarse animales de cualquier especie, incluyendo, pero sin limitarse a, ratones, ratas, conejos, hámsteres, cobayas, cerdos, cerdos enanos, cabras, ovejas, vacas y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, monos y chimpancés para generar animales transgénicos. En una realización específica, las técnicas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la técnica, se usan para expresar polipéptidos de la invención en seres humanos, como parte de un protocolo de terapia génica.

25
30

Puede usarse cualquier técnica conocida en la técnica para introducir el transgén (es decir, polinucleótidos de la invención) en animales para producir las líneas fundadoras de los animales transgénicos. Tales técnicas incluyen, pero sin limitarse a, microinyección pronuclear (Paterson *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:691-698 (1994); Carver *et al.*, Biotechnology (NY) 11:1263-1270 (1993); Wright *et al.*, Biotechnology (NY) 9:830-834 (1991); y Hoppe *et al.*, patente estadounidense n.º 4.873.191 (1989)); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82:6148-6152 (1985)), blastocistos o embriones; direccionamiento génico en células madre embrionarias (Thompson *et al.*, Cell 56:313-321 (1989)); electroporación de células o embriones (Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3:1803-1814 (1983)); introducción de los polinucleótidos de la invención usando una pistola génica (véase, por ejemplo, Ulmer *et al.*, Science 259:1745 (1993)); introducir construcciones de ácido nucleico en células madre pluripotentes embrionarias y transferir las células madre de nuevo al blastocisto; y transferencia génica mediada por espermatozoides (Lavitrano *et al.*, Cell 57:717-723 (1989)); etc. Para una revisión de tales técnicas, véase Gordon, "Transgenic Animals", Intl. Rev. Cytol. 115:171-229 (1989).

35
40

Puede usarse cualquier técnica conocida en la técnica para producir clones transgénicos que contienen polinucleótidos de la invención, por ejemplo, transferencia nuclear en ovocitos enucleados de núcleos procedentes de células adultas, fetales o embrionarias cultivadas inducidas a quiescencia (Campbell *et al.*, Nature 380:64-66 (1996); Wilmut *et al.*, Nature 385:810-813 (1997)).

45
50

Se dan a conocer además animales transgénicos que llevan el transgén en todas sus células, así como animales que llevan el transgén en algunas de sus células, pero no en todas, es decir, animales mosaico o quiméricos. Puede integrarse el transgén como un único transgén o como múltiples copias tales como en concatámeros, por ejemplo, tándems cabeza-cabeza o tándems cola-cabeza. El transgén también puede introducirse selectivamente en y activarse en un tipo celular particular siguiendo, por ejemplo, la enseñanza de Lasko *et al.* (Lasko *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236 (1992)). Las secuencias reguladoras requeridas para una activación específica del tipo celular de este tipo dependerán del tipo celular particular de interés, y resultará evidente para los expertos en la técnica. Cuando se desea que el transgén del polinucleótido se integre en el sitio cromosómico del gen endógeno, se prefiere el direccionamiento génico.

55
60

En resumen, cuando va a utilizarse una técnica de este tipo, se diseñan vectores que contienen algunas secuencias de nucleótidos homólogas al gen endógeno para el fin de integrar, a través de recombinación homóloga con secuencias cromosómicas, en y alterar la función de la secuencia de nucleótidos del gen endógeno. También puede introducirse selectivamente el transgén en un tipo celular particular, inactivando de ese modo el gen endógeno sólo en ese tipo celular, siguiendo, por ejemplo, la enseñanza de Gu *et al.* (Gu *et al.*, Science 265:103-106 (1994)). Las secuencias reguladoras requeridas para una inactivación específica del tipo celular de este tipo dependerán del tipo celular particular de interés, y resultará evidente para los expertos en la técnica.

65

Una vez que se han generado los animales transgénicos, puede someterse a ensayo la expresión del gen recombinante utilizando técnicas convencionales. Puede lograrse la selección inicial mediante análisis de transferencia de tipo Southern o técnicas de PCR para analizar tejidos de animales para verificar que ha tenido lugar la integración del transgén. También puede evaluarse el nivel de expresión de ARNm del transgén en los tejidos de los animales transgénicos usando técnicas que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia de tipo Northern de muestras tisulares obtenidas del animal, análisis de hibridación *in situ*, y transcriptasa reversa-PCR (rt-PCR). También pueden evaluarse muestras de tejido que expresa el gen transgénico, de manera inmunocitoquímica o de manera inmunohistoquímica usando anticuerpos específicos para el producto transgénico.

Una vez que se producen los animales fundadores, pueden criarse, criarse de manera endogámica, intercruzarse o cruzarse para producir colonias del animal particular. Los ejemplos de tales estrategias de cría incluyen, pero

sin limitarse a: inter cruzamiento de animales fundadores con más de un sitio de integración con el fin de establecer líneas separadas; cría endogámica de líneas separadas con el fin de producir transgénicos compuestos que expresan el transgén a niveles superiores debido a los efectos de expresión aditiva de cada transgén; cruzamiento de animales transgénicos heterocigotos para producir animales homocigotos para un sitio de integración dado con el fin tanto de incrementar la expresión como de eliminar la necesidad de seleccionar animales mediante análisis de ADN; cruzamiento de líneas homocigotas separadas para producir líneas homocigotas o heterocigotas compuestas; y cría para colocar el transgén en un fondo distinto que es apropiado para un modelo experimental de interés.

Los animales transgénicos de la invención tienen usos que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de modelos animales útiles en la elaboración de la función biológica de los polipéptidos de CRCGCL, en el estudio de estados y/o trastornos asociados con la expresión de CRCGCL aberrante, y en la selección de compuestos eficaces para mejorar tales estados y/o trastornos.

Ejemplo 31

Animales con inactivación de CRCGCL

También puede reducirse la expresión génica de CRCGCL endógeno mediante inactivación o “knocking out” del gen de CRCGCL y/o su promotor usando recombinación homóloga direccionada. (Por ejemplo, véase Smithies *et al.*, Nature 317:230-234 (1985); Thomas & Capecchi, Célula 51:503-512 (1987); Thompson *et al.*, Cell 5:313-321 (1989)). Por ejemplo, puede usarse un polinucleótido no funcional, mutante de la invención (o una secuencia de ADN completamente no relacionada) flanqueado por ADN homólogo a la secuencia de polinucleótido endógeno (o bien las regiones codificantes o bien las regiones reguladoras del gen), con o sin un marcador seleccionable y/o un marcador seleccionable negativo, para transfectar células que expresan polipéptidos de la invención *in vivo*. Se usan técnicas conocidas en la técnica para generar inactivaciones en células que contienen, pero no expresan el gen de interés. La inserción de la construcción de ADN, a través de recombinación homóloga direccionada, da como resultado la inactivación del gen diana. Tales enfoques son particularmente adecuados en campos de investigación y agricultura en los que pueden usarse modificaciones a células madres embrionarias para generar descendencia animal con un gen seleccionado como diana inactivo (por ejemplo, véase Thomas & Capecchi 1987 y Thompson 1989, citado anteriormente). Sin embargo, puede adaptarse rutinariamente este enfoque para su uso en seres humanos siempre que las construcciones de ADN recombinante se administren directamente o se dirijan al sitio requerido *in vivo* usando vectores virales apropiados que resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

Las células que se modifican por ingeniería genética para expresar los polipéptidos de la invención, o alternativamente, que se modifican por ingeniería genética para no expresar los polipéptidos de la invención (por ejemplo, inactivaciones) se administran a un paciente *in vivo*. Pueden obtenerse tales células del paciente (es decir, animal, incluyendo ser humano) o un donante con CMH compatible y pueden incluir, pero sin limitarse a fibroblastos, células de la médula ósea, células sanguíneas (por ejemplo, linfocitos), adipocitos, células musculares, células endoteliales, etc. Las células se modifican por ingeniería genética *in vitro* usando técnicas de ADN recombinante para introducir la secuencia codificante de los polipéptidos de la invención en las células, o alternativamente, para alterar la secuencia codificante y/o la secuencia reguladora endógena asociada con los polipéptidos de la invención, por ejemplo, mediante transducción (usando vectores virales, y preferiblemente vectores que integran el transgén en el genoma celular) o procedimientos de transfección, incluyendo, pero sin limitarse a, el uso de plásmidos, cósmidos, YAC, ADN desnudo, electroporación, liposomas, etc. La secuencia codificante de los polipéptidos de la invención puede colocarse bajo el control de un promotor constitutivo o inducible fuerte o promotor/potenciador para lograr la expresión, y preferiblemente secreción, de los polipéptidos de CRCGCL. Pueden introducirse las células modificadas mediante ingeniería genética que expresan y preferiblemente secretan los polipéptidos de la invención en el paciente de manera sistémica, por ejemplo, en la circulación, o por vía intraperitoneal.

Alternativamente, pueden incorporarse las células en una matriz e implantarse en el organismo, por ejemplo, pueden implantarse fibroblastos modificados por ingeniería genética como parte de un injerto de piel; pueden implantarse células endoteliales modificadas por ingeniería genética como parte de un injerto linfático o vascular. (Véanse, por ejemplo, Anderson *et al.* patente estadounidense n.º 5.399.349; y Mulligan & Wilson, patente estadounidense n.º 5.460.959).

Cuando las células que van a administrarse no son autólogas o no son células con MHC compatible, pueden administrarse usando técnicas bien conocidas que impiden el desarrollo de una respuesta inmunitaria del huésped contra las células introducidas. Por ejemplo, pueden introducirse las células en una forma encapsulada que, aunque permite un intercambio de componentes con el entorno extracelular inmediato, no permite que las células introducidas las reconozca el sistema inmunitario del huésped.

Los animales con inactivación tienen usos que incluyen, pero no se limitan a, sistemas de modelos animales útiles en la elaboración de la función biológica de los polipéptidos de CRCGCL, en el estudio de estados y/o trastornos asociados con la expresión de CRCGCL aberrante, y en la selección de compuestos eficaces para la mejora de tales estados y/o trastornos. Por ejemplo, puede prepararse un ratón con inactivación usando las secuencias dadas a conocer como AA008694 y W98372.

ES 2 357 020 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Res	Pos	Garni... Alfa	Chou... Alfa	Garni... Beta	Chou- Beta	Garni... Giro	Chou- Giro	Garni... Hélice	Kyte-... Hidro...	Hoop-... Hidro...	Eisen... Alfa	Eisen... Beta	Karpl... Flexi...	James... Antíg...	Emini Super...
Met	1	.	.	B	-0,56	0,01	.	.	.	-0,10	0,59
Gly	2	.	.	B	-0,98	0,23	.	.	.	-0,10	0,34
Arg	3	.	A	B	-1,40	0,49	.	.	.	-0,60	0,22
Leu	4	.	A	B	-1,30	0,74	.	.	.	-0,60	0,18
Val	5	.	A	B	-1,26	1,04	.	.	.	-0,60	0,20
Leu	6	.	A	B	-1,24	1,04	.	.	.	-0,60	0,10
Leu	7	A	A	-1,49	1,54	.	.	.	-0,60	0,12
Trp	8	A	A	-2,46	1,36	.	.	.	-0,60	0,17
Gly	9	A	A	-2,34	1,36	.	.	.	0,60	0,15
Ala	10	A	A	-2,30	1,46	.	.	.	-0,60	0,16
Ala	11	A	A	-2,30	1,46	.	.	.	-0,60	0,12
Val	12	.	A	B	-1,83	1,23	.	.	.	-0,60	0,10
Phe	13	.	A	B	-1,89	1,23	.	.	.	-0,60	0,10
Leu	14	.	A	B	-1,83	1,16	.	.	.	-0,60	0,10
Leu	15	A	T	.	-1,84	1,57	.	.	.	-0,20	0,14
Gly	16	T	C	-1,84	1,54	.	.	.	0,00	0,16
Gly	17	T	T	.	-1,80	1,26	.	.	.	020	0,19
Trp	18	A	T	.	-1,44	1,26	.	.	.	-0,20	0,19
Met	19	.	.	B	-0,63	1,00	.	.	.	-0,40	0,19
Ala	20	.	.	B	-0,17	0,97	.	.	.	-0,40	0,34
Leu	21	.	.	B	-0,17	0,97	.	.	.	-0,40	0,32
Gly	22	T	C	-0,41	0,49	.	.	F	0,32	0,32
Gln	23	T	C	-0,71	0,37	.	.	F	0,79,	0,32
Gly	24	T	C	-0,11	0,37	.	.	F	0,96	0,39
Gly	25	T	C	0,13	-0,31	.	.	F	1,73	0,69
Ala	26	C	0,09	-0,31	.	.	F	1,70	0,39
Ala	27	A	0,43	-0,07	.	.	F	1,33	0,29
Glu	28	A	.	.	B	.	.	.	-0,46	-0,10	.	.	.	0,81	0,52

ES 2 357 020 T3

65	Tyr	60	.	55	.	50	B	45	B	40	.	35	.	30	0,47	25	0,71	20	.	15	.	10	-0,45	5	1,15	
	Arg	61	.		.		B		B		.		.		128		0,66		.			.		-0,45		1,32
	Phe	62	.		.		B		B		T		.		1,59		-0,13		.			.		1,19		1,62
	Asn	63		T		.		1,70		-0,63		.			.		2,38		1,79
	Gly	64		T		.		1,49		-0,89		.			.		2,57		0,92
	Asp	65		T		.		1,73		-0,13		.			.		276		1,67
	Glu	66		T		.		1,62		-0,91		.			.		3,40		1,73
	Ala	67		T		.		1,66		-0,91		.			.		286		3,04
	Tyr	68		T		.		1,34		-0,77		.			.		2,22		0,97
	Asp	69		T		.		1,69		-0,29		.			.		1,73		0,81
	Gln	70		T		.		1,44		0,11		.			.		0,94		1,29
	Cys	71	.		.		B		.		.		.		0,63		0,37		.			.		0,40		1,29
	Thr	72	.		.		B		.		T		.		0,41		0,30		.			.		0,25		0,64
	Asn	73	.		.		B		.		T		.		0,66		0,99		.			.		-0,20		0,30
	Tyr	74	.		.		B		.		T		.		0,66		0,99		.			.		-0,20		0,98
	Ieu	75	.		.		B		.		.		.		0,31		0,41		.			.		-0,25		1,18
	Ieu	76	.		.		B		.		.		.		0,94		0,36		.			.		-0,10		0,73
	Gln	77	.		.		B		.		.		.		0,94		0,46		.			.		0,00		0,63
	Glu	78	.		.		B		.		.		.		0,64		0,19		.			.		0,70		1,10
	Gly	79		T		.		0,54		-0,11		.			.		1,95		1,79
	His	80		T		.		0,69		-0,37		.			.		220		1,02
	Thr	81		T		.		0,69		-020		.			.		250		0,32
	Ser	82		T		.		-0,12		0,49		.			.		1,35		0,26
	Gly	83		T		.		-0,12		0,74		.			.		1,10		0,16
	Cys	84	.		.		B		.		T		.		-0,37		0,24		.			.		0,60		0,19
	Ieu	85	.		.		B		.		.		.		-0,33		0,26		.			.		-0,05		0,14
	Ieu	86	A		A		-0,02		-0,13		.			.		0,30		0,24
	Asp	87	A		A		0,39		-0,16		.			.		0,30		0,79
	Ala	88	A		A		0,73		-0,73		.			.		0,90		1,87
	Glu	89	A		A		1,40		-1,41		.			.		0,90		3,79
	Gln	90	A		A	.	.		.		T		.		1,32		-2,10		.			.		1,30		3,79

ES 2 357 020 T3

65	Arg	153	.	55	.	50	B	45	.	40	.	35	.	30	1,30	25	0,40	20	.	15	F	10	0,58	5	2,19
	Ser	154		0,99		-0,24		.			F			2,11
	Pro	155		1,84		-0,16		.	.		F			1,94
	Phe	156	.		T			1,56		-0,91		.	.		F			1,72
	Asp	157		1,80		0,00		.	.		F			1,35
	Thr	158		1,39		0,01		.	.		F			1,51
	Glu	159	A			1,73		-0,03		.	.		F			2,33
	Trp	160	A			1,94		-0,81		.	.		F			2,80
	Gln	161	A			2,64		-0,41		.	.		F			3,36
	Ser	162	.		T		.		T		.		.		2,64		-0,90		.	.		F			3,36
	Lys	163	.		T		.		T		.		.		264		-0,50		.	.		F			5,13
	Gln	164	.		T		.		T		.		.		1,98		-0,93		.	.		F			4,28
	Glu	165	.		T		.		T		.		.		2,27		-0,76		.	.		F			1,71
	Asn	166	.		T		.		T		.		.		1,41		-0,74		.	.		F			1,38
	Thr	167	.		T		.		T		.		.		1,40		-0,10		.	.		F			0,59
	Cys	168	.		.		B		.		.		.		0,47		-0,01		.	.		F			0,49
	Asn	169	.		.		B		.		.		.		0,47		0,67		.	.		.			0,21
	Val	170	.		.		B		.		.		.		0,12		0,27		.	.		.			0,26
	Thr	171	.		.		B		.		.		.		-0,69		0,21		.	.		.			0,47
	Ile	172	.		.		B		.		.		.		-0,36		0,33		.	.		.			0,24
	Glu	173	A		A		.		B		.		.		-0,30		-0,07		.	.		.			0,55
	Gly	174	A		A			-0,30		-0,21		.	.		F			0,38
	Leu	175	A		A			0,60		-0,70		.	.		.			0,95
	Asp	176	A		A			0,24		-1,39		.	.		F			1,09
	Ala	177	A		A			0,89		-0,81		.	.		F			0,59
	Glu	178	A		A			0,59		-0,49		.	.		F			1,13
	Lys	179	A		A		.		B		.		.		0,23		-0,79		.	.		.			0,90
	Cys	180	A		A		.		B		.		.		0,76		0,00		.	.		.			0,77
	Tyr	181	A		A		.		.B		.		.		-0,10		0,41		.	.		.			0,47
	Ser	182	A		A		.		B		.		.		0,60		1,06		.	.		.			0,17
	Phe	183	A		A		.		B		.		.		-0,26		1,06		.	.		.			0,64

ES 2 357 020 T3

65	Arg	215	.	A	F	1,15	0,49
60	Asp	216	.	A	F	1,15	0,29
	Ala	217	.	A	1,00	0,71
	Cys	218	.	A	B	0,60	0,52
	Ala	219	.	A	1,00	0,48
	Glu	220	.	A	F	0,85	0,69
	Thr	221	.	A	F	1,14	2,00
	Pro	222	.	A	F	1,68	3,06
	Thr	223	F	2,32	3,53
	Pro	224	F	2,56	3,78
	Pro	225	F	3,40	4,89
	Lys	226	F	2,86	2,80
	Pro	227	A	F	2,32	2,42
	Lys	228	A	F	1,78	3,13
	Leu	229	A	F	1,24	1,36
	Ser	230	.	.	B	F	0,45	0,62
	Lys	231	.	.	B	-0,30	0,25
	Phe	232	.	.	B	-0,60	0,22
	Ile	233	.	.	B	-0,60	0,22
	Leu	234	.	.	B	-0,60	0,14
	Ile	235	.	.	B	-0,60	0,14
	Ser	236	A	-0,60	0,20
	Ser	237	A	-0,60	0,17
	Leu	238	A	-0,60	0,20
	Ala	239	A	-0,60	0,12
	Ile	240	A	-0,60	0,09
	Leu	241	A	-0,60	0,08
	Leu	242	A	-0,60	0,11
	Met	243	.	.	B	-0,60	0,13
	Val	244	A	-0,60	0,13
	Ser	245	A	-0,60	0,13
5																									
10																									
15																									
20																									
25																									
30																									
35																									
40																									
45																									
50																									
55																									
60																									
65																									

ES 2 357 020 T3

65	Leu	246	A	.	.	B	.	.	.	1,39	0,11
	Leu	247	A	.	.	B	.	.	.	1,16	0,19
	Leu	248	A	.	.	B	.	.	.	1,20	0,12
	Leu	249	A	.	.	B	.	.	.	1,73	0,15
	Ser	250	A	.	.	B	.	.	.	1,04	0,36
	Leu	251	A	.	.	B	.	.	.	1,04	0,36
	Trp	252	A	.	.	B	.	.	.	1,27	0,46
	Lys	253	A	.	.	B	.	.	.	0,59	0,68
	Leu	254	A	.	.	B	.	.	.	0,84	0,61
	Trp	255	A	.	.	B	.	.	.	0,16	1,16
	Arg	256	A	.	.	B	.	.	.	-0,76	1,16
	Val	257	A	.	.	B	.	.	.	0,03	1,21
	Lys	258	.	.	B	0,03	0,95
	Lys	259	.	.	B	-0,20	0,34
	Phe	260	.	.	B	0,23	0,71
	Leu	261	.	.	B	-0,03	0,48
	Ile	262	.	.	B	0,61	0,18
	Pro	263	.	.	B	1,04	0,32
	Ser	264	.	.	B	0,26	.	.	.	F	0,64
	Val	265	C	.	0,00	.	.	.	F	1,41
	Pro	266	C	.	-0,69	.	.	.	F	1,82
	Asp	267	C	.	-0,73	.	.	.	F	1,82
	Pro	268	-0,43	.	.	.	F	1,72
	Lys	269	T	.	-0,29	.	.	.	F	0,96
	Ser	270	-0,29	.	.	.	F	0,89
	Ile	271	0,14	0,57
	Phe	272	0,40	0,24
	Pro	273	1,19	0,15
	Gly	274	C	.	0,80	0,38
	Leu	275	0,80	0,30
	Phe	276	0,51	0,27
5															
10															
15															
20															
25															
30															
35															
40															
45															
50															
55															

ES 2 357 020 T3

65	Ala	370	.	A	.	.	.
	Leu	371	:	A	:	:	:
	Ter	372	.	A	.	.	.
60							
55							
50				B	.	.	.
45			
40			
35			
30				-0,36	-0,86	-0,94	.
25				0,83	0,87	0,54	.
20			
15			
10				-0,32	-0,60	-0,60	.
5			
				0,36	0,30	0,51	.

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido de longitud completa de análogo de cadena gamma común de receptor de citocina que comprende los residuos de aminoácido +1 a +371 tal como se expone en SEQ ID NO:2;
- (b) una secuencia de ácido nucleico que codifica para el polipéptido maduro de análogo de cadena gamma común de receptor de citocina que comprende los residuos de aminoácido +23 a +371 tal como se expone en SEQ ID NO:2;
- (c) una variante alélica de la secuencia de ácido nucleico definida en (a) o (b); y
- (d) el polinucleótido complementario a la secuencia de ácido nucleico de una cualquiera de (a) a (c).

2. Polinucleótido según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido de análogo de cadena gamma común de receptor de citocina es la codificada por el ADNc contenido en el depósito de la ATCC n.º 209641 ó 209691.

3. Polinucleótido según la reivindicación 1 ó 2, siendo dicho polinucleótido ADN, ARN, ADNc o ADN genómico.

4. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, siendo dicho polinucleótido bicatenario o monocatenario.

5. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 fusionado a un polinucleótido heterólogo.

6. Polinucleótido según la reivindicación 5, en donde el polinucleótido heterólogo codifica para un polipéptido heterólogo.

7. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, estando dicho polinucleótido inmovilizado.

8. Polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, estando dicho polinucleótido marcado.

9. Vector que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

10. Vector según la reivindicación 9, en el que el polinucleótido está operativamente unido a una secuencia de control reguladora.

11. Método de producción de una célula huésped que comprende modificar por ingeniería genética células con el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o el vector según la reivindicación 9 ó 10.

12. Célula huésped seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) células huésped que comprenden el vector según la reivindicación 9 ó 10;
- (b) células huésped modificadas por ingeniería genética con el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8; y
- (c) células huésped, en las que un polinucleótido endógeno según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 está operativamente asociado con una secuencia de control reguladora heteróloga.

13. Célula huésped según la reivindicación 12, siendo dicha célula huésped una célula procariota, célula eucariota, célula de vertebrados, célula COS, célula CHO, o célula de *E. coli*.

14. Método de producción de un polipéptido que comprende cultivar la célula huésped según la reivindicación 12 ó 13 en condiciones tales que se expresa el polipéptido codificado por dicho polinucleótido; y recuperar dicho polipéptido.

15. Polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

16. Polipéptido según la reivindicación 15, estando dicho polipéptido sintetizado químicamente, o pudiéndose obtener a partir de la célula huésped según la reivindicación 12 ó 13 o que puede obtenerse mediante el método según la reivindicación 14.

17. Polipéptido según la reivindicación 15 ó 16, estando el polipéptido marcado o pegilado.

ES 2 357 020 T3

18. Polipéptido según la reivindicación 17, en el que el marcador es una toxina, un radioisótopo o un marcador fluorescente.

19. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18 fusionado a un polipéptido heterólogo.

20. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, careciendo dicho polipéptido de una metionina N-terminal.

21. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, teniendo dicho polipéptido una metionina N-terminal.

22. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, estando dicho polipéptido inmovilizado.

23. Anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22.

24. Anticuerpo según la reivindicación 23 que es policlonal, monoclonal, quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, Fv de cadena sencilla, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o fragmento Fab.

25. Anticuerpo según las reivindicaciones 23 ó 24, estando dicho anticuerpo marcado.

26. Anticuerpo según la reivindicación 25, en el que dicho marcador es una toxina, radioisótopo o un marcador fluorescente.

27. Anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, estando dicho anticuerpo inmovilizado.

28. Anticuerpo que es un anticuerpo anti-idiotípico contra el anticuerpo según la reivindicación 23.

29. Polinucleótido que hibrida específicamente en condiciones de hibridación rigurosas con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1 que codifica para los residuos de aminoácido +1 a +371 de SEQ ID NO: 2 y que no consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos:

```
cgacctgacc acactctccg tctctatttc agagtgaaga agtttctcat tcccagcgtg
cagaccgaa atccatcttc cccgggctct ttgagataca ccaagggaac ttcaggtatc
gcctctctct tgtgtctctt ctctctctca ccaagcaggt gcccctctgc ctgcattcct
atctctctga gcgcgacct tttagagaat gacattaaca gccgggcgca gtctcacgcc
tgtcatcca gcactttggg aggccgaggt gggaggctca cttcaggtca ggaattcgag
accagcctgg
```

30. Ácido nucleico antisentido o ribozima que puede unirse al polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 e inhibir de ese modo la producción del polipéptido según la reivindicación 15.

31. Composición que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y 29, el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, el anticuerpo según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 o el ácido nucleico antisentido o la ribozima según la reivindicación 30.

32. Composición farmacéutica que comprende el polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 y 29, el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22 o el ácido nucleico antisentido o la ribozima según la reivindicación 30.

ES 2 357 020 T3

1	CGGCACGAGGGCATGGGGCGGCTGGTTCTGCTGTGGGGAGCTCCCGTCTTTCTGCTGGGA	60
1	M G R L V L L W G A A V F L L G	16
61	GGCTGGATGGCTTTGGGGCAAGGAGGAGCAGCAGAAGGAGTACAGATTCAGATCATCTAC	120
17	G W M A L G Q G G A A E G V Q I Q I I Y	36
121	TTCAATTTAGAAACCGTGCAGGTGACATGGAATGCCAGCAAATACTCCAGGACCAACCTG	180
37	F N L E T V Q V T W N A S K Y S R T N L	56
181	ACTTTCCTACTACAGATTCACCGGTGATGAGGCCTATGACCAGTGCACCAACTACCTTCTC	240
57	T F H Y R F N G D E A Y D Q C T N Y L L	76
241	CAGGAAGTGCACACTTCGGGGTGCCTCCTAGACGCGAGCAGCGAGACGACATTCCTCTAT	300
77	Q E G H T S G C L L D A E Q R D D I L Y	96
301	TTCTCCATCAGGAATGGGACGCACCCCGTTTTCACCGCAAGTCGCTGGATGGTTTATTAC	360
97	F S I R N G T H P V F T A S R W M V Y Y	116
361	CTGAAACCCAGTTCGCCGAAGCAGTGAGATTTTCGTGGCATCAGGATGCAGTGACCGTG	420
117	L K P S S P K H V R F S W H Q D A V T V	136
421	ACGTGTTCTGACCTGTCTACGGGGATCTCCTCTATGAGGTTTCAGTACCGGAGCCCCCTC	480
137	T C S D L S Y G D L L Y E V Q Y R S P F	156
481	GACACCGAGTGGCAGTCCAACAGGAAAATACCTGCAACGTCACCATAGAAGGCTTGGAT	540
157	D T E W Q S K Q E N T C N V T I E G L D	176
541	GCCGAGAAGTGTACTCTTCTGGGTGAGGTTGAAGGCTATGGAGGATGTATATGGGCCA	600
177	A E K C Y S F W V R V K A M E D V Y G P	196
601	GACACATACCCAAGCGACTGGTTCAGAGGTGACATGCTGSCAGAGAGGCGAGATTCGGGAT	660
197	D T Y P S D W S E V T C W Q R G E I R D	216
661	GCCTGTGCAGAGACACCAAGCCTCCCAACCAAGCTGTCCAATTTATTTTAAITTTCC	720
217	A C A E T P T P P K P K L S K F I L I S	236
721	AGCCTGGCCATCCTTCTGATGGTGTCTCTCCTCCTTCTGTCTTTATGGAAATTATGGAGA	780
237	S L A I L L M V S L L L L S L W K L W R	256
781	GTGAAGAAGTTTCTCATTCCCAGCGTGCCAGACCCGAAATCCATCTTCCCCGGGCTCTTT	840
257	V K K F L I P S V P D P K S I F P G L F	276
841	GAGATACACCAAGGGAACCTTCAGGAGTGGATCAGACACCCAGAACGTTGGCCACCTC	900
277	E I H Q G N F Q E W I T D T Q N V A H L	296

FIG. 1A

ES 2 357 020 T3

```

901 CACAAGATGGCAGGTGCAGAGCAAGAAAGTGGCCCCGAGGAGCCCCTGGTAGTCCAGTTG 960
297 H K M A G A E Q E S G P E E P L V V Q L 316

961 GCCAAGACTGAAGCCGAGTCTCCCAGGATGCTGGACCCACAGACCGAGGAGAAAGAGGCC 1020
317 A K T E A E S P R M L D P Q T E E K E A 336

1021 TCTGGGGGATCCCTCCAGCTTCCCCACCAGCCCCTCCAAGGGGTGATGTGGTCACAATC 1080
337 S G G S L Q L P H Q P L Q G G D V V T I 356

1081 GGGGGCTTCACCTTTGTGATGAATGACCGCTCCTACGTGGCGTTGTGATGGACACACCAC 1140
357 G G F T F V M N D R S Y V A L * 372

1141 TGTCAAAGTCAACGTCAGGATCCACGTTGACATTTAAAGACAGAGGGGACTGTCCCGGGG 1200

1201 ACTCCACACCACCATGGATGGGAAGTCTCCACGCCAATGATGGTAGGACTAGGAGACTCT 1260

1261 GAAGACCCAGCCTCACCGCCTAATGCGGCCACTGCCCTGCTAACTTTCCCCCACAATGAGT 1320

1321 CTCTGTGTTCAAAGGCTTGATGGCAGATGGGAGCCAATTGCTCCAGGAGATTTACTCCCA 1380

1381 GTTCCTTTTCGTGCCCTGAACGTTGTACATAAACCCCAAGGCAGCACGTCCAAAATGCTG 1440

1441 TAAAACCATCTTCCCACTCTGTGAGTCCCAGTCCCGTCCATGTACCTGTTCATAGCAT 1500

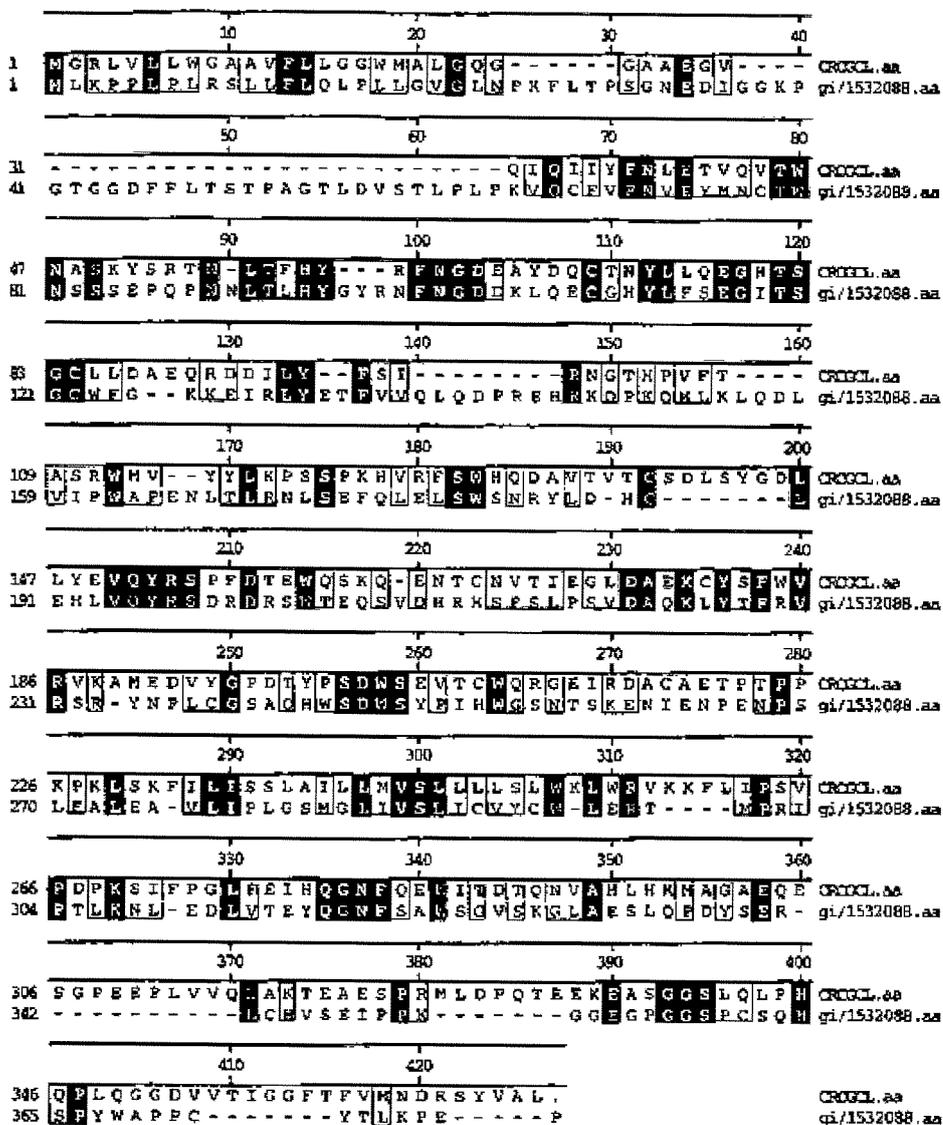
1501 TGGATTCTGGGAGGATTTTTGTCTGTTTTGAGACTCCAAACCACCTCTACCCCTACAAA 1560

1561 AAAAAAAAAAAAAA 1573

```

FIG. 1B

ES 2 357 020 T3



Decoración 'Decoración n.º 1': Residuos en recuadrados que coinciden con el consenso denominando "Consenso n.º 2"

Decoración 'Decoración n.º 2': Residuos sombreados (en negro continuo) que coinciden con el consenso denominado "Consenso n.º 1" de manera exacta.

FIG. 2

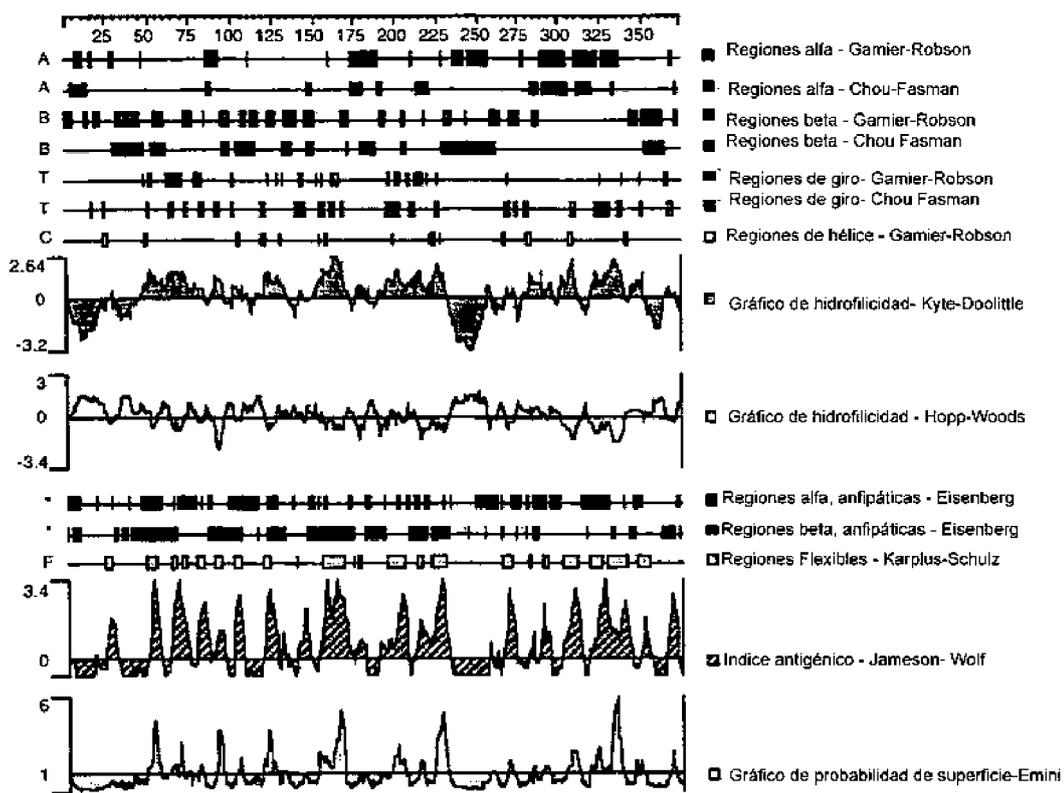


FIG. 3

ES 2 357 020 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Human Genome Sciences, Inc.

5 <120> Análogo de cadena gamma común de receptor de citocina

<130> PF466PCT

10 <140> Sin asignar
<141> 05-03-1999

<150> 60/086.505

15 <151> 22-05-1998

<150> 60/078.563

20 <151> 19-03-1998

<160> 30

<170> PatentIn Ver. 2.0

25 <210> 1
<211> 1573
<212> ADN

30 <213> *Homo sapiens*

<220> 1

35 <221> CDS
<222> (13).. (1125)

<400> 1

40

```
cggcacgagg gc atg ggg cgg ctg gtt ctg ctg tgg gga gct gcc gtc ttt 51
      Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe
        1             5             10

45 ctg ctg gga ggc tgg atg gct ttg ggg caa gga gga gca gca gaa gga 99
   Leu Leu Gly Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly
     15             20             25

   gta cag att cag atc atc tac ttc aat tta gaa acc gtg cag gtg aca 147
   Val Gln Ile Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr
     30             35             40             45

   tgg aat gcc agc aaa tac tcc agg acc aac ctg act ttc cac tac aga 195
   Trp Asn Ala Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg
     50             55             60

55 ttc aac ggt gat gag gcc tat gac cag tgc acc aac tac ctt ctc cag 243
   Phe Asn Gly Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln
     65             70             75

   gaa ggt cac act tcg ggg tgc ctc cta gac gca gag cag cga gac gac 291
   Glu Gly His Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Glu Gln Arg Asp Asp
     80             85             90

   att ctc tat ttc tcc atc agg aat ggg acg cac ccc gtt ttc acc gca 339
   Ile Leu Tyr Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala
     95             100            105

65 agt cgc tgg atg gtt tat tac ctg aaa ccc agt tcc ccg aag cac gtg 387
```

ES 2 357 020 T3

	Ser Arg Trp Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val	
	110	115 120 125
5	aga ttt tcg tgg cat cag gat gca gtg acg gtg acg tgt tct gac ctg	435
	Arg Phe Ser Trp His Gln Asp Ala Val Thr Val Thr Cys Ser Asp Leu	
		130 135 140
10	tcc tac ggg gat ctc ctc tat gag gtt cag tac cgg agc ccc ttc gac	483
	Ser Tyr Gly Asp Leu Leu Tyr Glu Val Gln Tyr Arg Ser Pro Phe Asp	
		145 150 155
15	acc gag tgg cag tcc aaa cag gaa aat acc tgc aac gtc acc ata gaa	531
	Thr Glu Trp Gln Ser Lys Gln Glu Asn Thr Cys Asn Val Thr Ile Glu	
		160 165 170
20	ggc ttg gat gcc gag aag tgt tac tct ttc tgg gtc agg gtg aag gct	579
	Gly Leu Asp Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala	
		175 180 185
25	atg gag gat gta tat ggg cca gac aca tac cca agc gac tgg tca gag	627
	Met Glu Asp Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu	
		190 195 200 205
30	gtg aca tgc tgg cag aga ggc gag att cgg gat gcc tgt gca gag aca	675
	Val Thr Cys Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr	
		210 215 220
35	cca acg cct ccc aaa cca aag ctg tcc aaa ttt att tta att tcc agc	723
	Pro Thr Pro Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser	
		225 230 235
40	ctg gcc atc ctt ctg atg gtg tct ctc ctc ctt ctg tct tta tgg aaa	771
	Leu Ala Ile Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys	
		240 245 250
45	tta tgg aga gtg aag aag ttt ctc att ccc agc gtg cca gac ccg aaa	819
	Leu Trp Arg Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys	
		255 260 265
50	tcc atc ttc ccc ggg ctc ttt gag ata cac caa ggg aac ttc cag gag	867
	Ser Ile Phe Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu	
		270 275 280 285
55	tgg atc aca gac acc cag aac gtg gcc cac ctc cac aag atg gca ggt	915
	Trp Ile Thr Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly	
		290 295 300
60	gca gag caa gaa agt ggc ccc gag gag ccc ctg gta gtc cag ttg gcc	963
	Ala Glu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala	
		305 310 315
65	aag act gaa gcc gag tct ccc agg atg ctg gac cca cag acc gag gag	1011
	Lys Thr Glu Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu	
		320 325 330
70	aaa gag gcc tct ggg gga tcc ctc cag ctt ccc cac cag ccc ctc caa	1059
	Lys Glu Ala Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln	
		335 340 345
75	ggc ggt gat gtg gtc aca atc ggg ggc ttc acc ttt gtg atg aat gac	1107

ES 2 357 020 T3

Gly Gly Asp Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp
 350 355 360 365

5 cgc tcc tac gtg gcg ttg tgatggacac accactgtca aagtcaacgt 1155
 Arg Ser Tyr Val Ala Leu
 370

10 caggatccac gttgacattt aaagacagag gggactgtcc eggggactcc acaccacat 1215
 ggatgggaag tctccacgcc aatgatggta ggactaggag actctgaaga cccagcctca 1275
 ccgcctaatac cggccactgc cctgctaact ttccccaca tgagtctctg tgttcaaagg 1335
 15 cttgatggca gatgggagcc aattgctcca ggagatttac tcccagttcc ttttcgtgcc 1395
 tgaacgttgt cacataaacc ccaaggcagc acgtccaaaa tgctgtaaaa ccattctccc 1455
 20 actctgtgag tcccagttc cgtccatgta cctgttccat agcattggat tctcggagga 1515
 tttttgtct gttttgagac tccaaaccac ctctaccctt aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 1573

25 <210> 2
 <211> 371
 <212> PRT
 30 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

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

ES 2 357 020 T3

Ala Glu Lys Cys Tyr Ser Phe Trp Val Arg Val Lys Ala Met Glu Asp
180 185 190

5 Val Tyr Gly Pro Asp Thr Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Glu Val Thr Cys
195 200 205

Trp Gln Arg Gly Glu Ile Arg Asp Ala Cys Ala Glu Thr Pro Thr Pro
210 215 220

10 Pro Lys Pro Lys Leu Ser Lys Phe Ile Leu Ile Ser Ser Leu Ala Ile
225 230 235 240

Leu Leu Met Val Ser Leu Leu Leu Leu Ser Leu Trp Lys Leu Trp Arg
15 245 250 255

Val Lys Lys Phe Leu Ile Pro Ser Val Pro Asp Pro Lys Ser Ile Phe
260 265 270

20 Pro Gly Leu Phe Glu Ile His Gln Gly Asn Phe Gln Glu Trp Ile Thr
275 280 285

Asp Thr Gln Asn Val Ala His Leu His Lys Met Ala Gly Ala Glu Gln
290 295 300

25 Glu Ser Gly Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Gln Leu Ala Lys Thr Glu
305 310 315 320

Ala Glu Ser Pro Arg Met Leu Asp Pro Gln Thr Glu Glu Lys Glu Ala
30 325 330 335

Ser Gly Gly Ser Leu Gln Leu Pro His Gln Pro Leu Gln Gly Gly Asp
340 345 350

35 Val Val Thr Ile Gly Gly Phe Thr Phe Val Met Asn Asp Arg Ser Tyr
355 360 365

Val Ala Leu
370

40

<210> 3

<211> 363

45 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

50 Met Leu Lys Pro Pro Leu Pro Leu Arg Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
1 5 10 15

Asn Glu Asp Ile Gly Gly Lys Pro Gly Thr Gly Gly Asp Phe Phe Leu
55 20 25 30

Thr Ser Thr Pro Ala Gly Thr Leu Asp Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro
35 40 45

60 Lys Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp
50 55 60

Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Pro Asn Asn Leu Thr Leu His Tyr Gly

ES 2 357 020 T3

	65	70	75	80
	Tyr Arg Asn Phe Asn Gly Asp Asp Lys Leu Gln Glu Cys Gly His Tyr	85	90	95
5	Leu Phe Ser Glu Gly Ile Thr Ser Gly Cys Trp Phe Gly Lys Lys Glu	100	105	110
	Ile Arg Leu Tyr Glu Thr Phe Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu	115	120	125
10	His Arg Lys Gln Pro Lys Gln Met Leu Lys Leu Gln Asp Leu Val Ile	130	135	140
	Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Arg Asn Leu Ser Glu Phe Gln	145	150	155
15	Leu Glu Leu Ser Trp Ser Asn Arg Tyr Leu Asp His Cys Leu Glu His	165	170	175
	Leu Val Gln Tyr Arg Ser Asp Arg Asp Arg Ser Trp Thr Glu Gln Ser	180	185	190
20	Val Asp His Arg His Ser Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Ala Gln Lys	195	200	205
	Leu Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Tyr Asn Pro Leu Cys Gly Ser	210	215	220
25	Ala Gln His Trp Ser Asp Trp Ser Tyr Pro Ile His Trp Gly Ser Asn	225	230	235
	Thr Ser Lys Glu Asn Ile Glu Asn Pro Glu Asn Pro Ser Leu Phe Ala	245	250	255
30	Leu Glu Ala Val Leu Ile Pro Leu Gly Ser Met Gly Leu Ile Val Ser	260	265	270
35	Leu Ile Cys Val Tyr Cys Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro	275	280	285
	Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr Gln Gly Asn Phe	290	295	300
40	Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro	305	310	315
	Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys His Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly	325	330	335
45	Gly Glu Gly Pro Gly Gly Ser Pro Cys Ser Gln His Ser Pro Tyr Trp	340	345	350
50	Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Pro	355	360	

55 <210> 4
 <211> 733
 <212> ADN
 60 <213> *Homo sapiens*

65

ES 2 357 020 T3

<400> 4

gggatccgga gcccaaatct tctgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg 60
5 aattcgaggg tgcaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga 120
tctcccggac tcttgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt aagccacgaa gaccctgagg 180
10 tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg 240
aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtcttg caccaggact 300
ggctgaatgg caaggagtac aagtgcgaag tctccaacaa agccctocca acccccatcg 360
15 agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc 420
catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct 480
atccaagcga catcgcctgt gagtgggaga gcaatgggca gccggagAAC aactacaaga 540
20 ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg 600
acaagagcag gtggcagcag gggaacctct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc 660
25 acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatgagtg cgacggccgc 720
gactctagag gat 733

30 <210> 5

<211> 5

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SITIO

40 <222> (3)

<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

<400> 5

45 Trp Ser Xaa Trp Ser
1 5

<210> 6

50 <211> 86

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

55 <400> 6

gcgcctcgag atttccccga aatctagatt tccccgaaat gatttccccg aatgatttc 60
60 cccgaaatat ctgcatctc aattag 86

<210> 7

<211> 27

65 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 357 020 T3

<400> 7
gcggaagct ttttgcaaag cctaggc 27

5 <210> 8
<211> 271
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 8
ctcgagattt ccccgaaatc tagatttccc cgaaatgatt tccccgaaat gatttccccg 60
15 aaatatctgc catctcaatt agtcagcaac catagtcccg ccctaactc cgcccatccc 120
gcccctaact ccgccagtt ccgccattc tccgcccat ggctgactaa tttttttat 180
20 ttatgcagag gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt 240
ttttggaggc ctaggctttt gcaaaaagct t 271

<210> 9
25 <211> 32
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 9
gcgctcgagg gatgacagcg atagaacccc gg 32

<210> 10
35 <211> 31
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 10
gcaagcttc gcgactccc ggatccgctt c 31

<210> 11
45 <211> 12
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 11
ggggactttc cc 12

<210> 12
55 <211> 73
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 12
gggcctcga ggggactttc ccggggactt tccggggact tccggggact ttccatcctg 60
65 ccattcaat tag 73

ES 2 357 020 T3

<210> 13
<211> 265
<212> ADN
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

10 ctcgagggga ctttccggg gactttccgg ggactttccg ggactttcca tctgccatct 60
caattagtc gcaaccatag tccccccct aactccgccc atcccgcccc taactccgcc 120
15 cagttccgcc cttctccgc cccatggctg actaatTTTT tttatttatg cagaggccga 180
ggccgectcg gcctctgagc tattccagaa gtagtggagga ggcttttttg gaggcctagg 240
cttttgcaaa aagctt 256

20
<210> 14
<211> 29
<212> ADN
25 <213> *Homo sapiens*

<400> 14
30 gttaggccat gggaggagca gcagaagga 29

<210> 15
<211> 33
35 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 15
40 ggttaaagat ctcaacgcc a ctaggagcg gtc 33

<210> 16
<211> 38
45 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 16
50 ccggttagat ctgccatcat ggctttgggg caaggagg 38

<210> 17
<211> 36
55 <212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 17
60 ccggtttcta gatcacaagg ccacgtagga gcggtc 36

<210> 18
<211> 7
65 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 357 020 T3

- <220>
<221> SITIO
<222> (1)
5 <223> Xaa es igual a Ser, Thr, Gly o Leu
- <220>
<221> SITIO
10 <222> (2)
<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido
- <220>
15 <221> SITIO
<222> (4)
<223> Xaa es igual a Ser o Gly
- 20 <220>
<221> SITIO
<222> (5)
25 <223> Xaa es igual a cualquier aminoácido
- <400> 18
Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Trp Ser
30 1 5
- <210> 19
<211> 7
<212> PRT
35 <213> *Homo sapiens*
- <220>
40 <221> SITIO
<222> (2)
<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido
- 45 <220>
<221> SITIO
<222> (5)
<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido
50
- <400> 19
Thr Xaa Pro Ser Xaa Trp Ser
1 5
- 55 <210> 20
<211> 7
<212> PRT
60 <213> *Homo sapiens*
- <220>
<221> SITIO
65 <222> (2)
<223> Xaa es igual a Pro o Glu

ES 2 357 020 T3

<220>
 <221> SITIO
 <222> (3)
 5 <223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

<220>
 <221> SITIO
 10 <222> (4)
 <223> Xaa es igual a Val o Ile

<220>
 15 <221> SITIO
 <222> (6)
 <223> Xaa es igual a Asn, Ser o Asp

20 <400> 20
 Trp Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Pro
 1 5

25 <210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <221> SITIO
 35 <222> (3)
 <223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

<400> 21
 40 Ile Pro Xaa Val Pro Asp Pro
 1 5

<210> 22
 <211> 54
 45 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 22
 50
 Gln Ile Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp
 1 5 10 15

55 Asn Ala Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe
 20 25 30

 Asn Gly Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu
 35 40 45

60 Gly His Thr Ser Gly Cys
 50

65 <210> 23
 <211> 30
 <212> PRT

ES 2 357 020 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

5 Arg Arg His Ser Leu Phe Leu His Gln Glu Trp Asp Ala Pro Arg Phe
 1 5 10 15
 10 His Arg Lys Ser Leu Asp Gly Leu Leu Pro Glu Thr Gln Phe
 20 25 30

<210> 24

15 <211> 81

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 24

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

40 <210> 25

<211> 181

<212> PRT

45 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> SITIO

50 <222> (68)

<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

<220>

55 <221> SITIO

<222> (73)

<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

60 <220>

<221> SITIO

<222> (88)

65 <223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

ES 2 357 020 T3

<400> 25

```

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

```

40

<210> 26

<211> 1567

<212> ADN

45 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

50 <222> (830)

<223> n es igual a a, t, g o c

<220>

55 <221> misc_feature

<222> (416)

<223> y es igual a c o t

60

<220>

<221> misc_feature

<222> (784)

65 <223> m es igual a a o c

<220>

ES 2 357 020 T3

<221> misc_feature

<222> (785)

<223> y es igual a c o t

5

<400> 26

```

    gggcatggg cggctggttc tqctgtggg agctgccgtc tttctgctgg gagqctqgat 60
10    ggctttggg caaggaggag cagcagaagg agtacagatt caratcatct acttcaattt 120
    agaaaccgtg caggtgacat ggaatgccag caaatactcc aggaccaacc tgactttcca 180
    ctacagattc aacggatgat aggcctatga ccagtgcacc aactaccttc tccaggaagg 240
15    tcacactctg gggcgctccc tagacgcasa gcagcgagac gacattctct atttctccat 300
    caggaatggg acgcaccccg ttttcaccgc aagtcgctgg atggtttatt acctgaaacc 360

    cagttccccg aagcacgtga gatttcgtgg catcaggaaw gacggtgacg tgttcycgac 420
    ctgtctctac gggatctctc ctatgaggtt cagtaccgga gccctctcga caccgagtgg 480
    cagtcctaac aggaaatac ctgcaacgtc accatagaag gcttggatgc cgagaagtgt 540
25    tactctttct gggcgagggt gaaggctatg gaggatgtat atgggccaga cacatacca 600
    agcgaactgg cagaggtgac atgctggcag agaggcgaga ttcgggatgc ctgtgcagag 660
    acaccaacgc ctcccaaac aaagctgtcc aaatttattt taatttccag cctggccalc 720
    cttctgacgg tgtctctctc cttctgtctt ttatggaat tatggagart gaagaagttt 780
    ctcmvtccca gcgtgccaga cccgaaatcc atcttccctg ggtcttttgn tatacaccaa 840
    gggaaacttc aggagtggat cacagacacc cagaactgga cccacctcca caagatggca 900
    ggtgcagagc aagaaagtgg ccccgaggag cccctggtag tccagttggc caagactgaa 960
35    qccgagtctc ccagatgct ggaccacag accgaggaqa aagaggcttc tgggggatcc 1020
    ctccagcttc cccaccagcc cctccaaggc ggtgatgtgg tcacaatcgg gggcttcacc 1080
    tttgtgatga atgaccgctc ctactgtggc ttgtgatgga cacaccactg tcaaagtcaa 1140
40    cgtcaggatc cacgttgaca tttaaagaca ggggggactg tcccggggac tccacaccac 1200
    catggatggg aagtcctcac gccaatgatg gtaggactag gagactctga agaccagcc 1260
    tcaccgccta atgcggccac tgcctgcta actttcccc acatgagtct ctgtgttcaa 1320
    aggctttagt gcagatggga gccaatgct ccaggagatt tactcccagt tcttttctgt 1380
45    gctgaacgct gtcacataaa ccccaaggca gcacgtccaa aatgctgtaa aacctcttc 1440
    ccactctgtg agtccccagt tccgtccatg taccattccc atagcattgg attctcggag 1500
    gattttttgt ctgtttttag actccaaacc acctctaccc ctacaaaaaa aaaaaaaaaa 1560
50    aactcga                                     1567
```

<210> 27

55 <211> 170

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

60 <220>

<221> SITIO

<222> (89)

<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

65

<220>

ES 2 357 020 T3

<221> SITIO

<222> (132)

<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

5

<220>

<221> SITIO

<222> (138)

10

<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

<400> 27

15

Met Gly Arg Leu Val Leu Leu Trp Gly Ala Ala Val Phe Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Trp Met Ala Leu Gly Gln Gly Gly Ala Ala Glu Gly Val Gln Ile
20 25 30

20

Gln Ile Ile Tyr Phe Asn Leu Glu Thr Val Gln Val Thr Trp Asn Ala
35 40 45

25

Ser Lys Tyr Ser Arg Thr Asn Leu Thr Phe His Tyr Arg Phe Asn Gly
50 55 60

Asp Glu Ala Tyr Asp Gln Cys Thr Asn Tyr Leu Leu Gln Glu Gly His
65 70 75 80

30

Thr Ser Gly Cys Leu Leu Asp Ala Xaa Gln Arg Asp Asp Ile Leu Tyr
85 90 95

Phe Ser Ile Arg Asn Gly Thr His Pro Val Phe Thr Ala Ser Arg Trp
100 105 110

35

Met Val Tyr Tyr Leu Lys Pro Ser Ser Pro Lys His Val Arg Phe Arg
115 120 125

Gly Ile Arg Xaa Asp Gly Asp Val Phe Xaa Thr Cys Pro Thr Gly Ile
130 135 140

40

Ser Ser Met Arg Phe Ser Thr Gly Ala Pro Ser Thr Pro Ser Gly Ser
145 150 155 160

Pro Asn Arg Lys Ile Pro Ala Thr Ser Pro
165 170

45

<210> 28

<211> 36

50

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 28

55

ccggttagat ctgccatcat gggcggtg gttctg 36

<210> 29

<211> 31

60

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

65

ggccgtcta gatttgaca gctttggtt g 31

<210> 30

ES 2 357 020 T3

<211> 4

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

5

<220>

<221> SITIO

<222> (2)

10

<223> Xaa es igual a cualquier aminoácido

<400> 30

15

Trp Xaa Trp Ser
1

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65