



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 505**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/435** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)  
**C12N 15/12** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)  
**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03752132 .5**  
96 Fecha de presentación : **09.09.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1539228**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.06.2005**

54 Título: **Composición y procedimientos novedosos para el tratamiento de enfermedades inmunorelacionadas.**

30 Prioridad: **11.09.2002 US 410062 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.04.2011**

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**  
**1 Dna Way**  
**South San Francisco, California 94080-4990, US**

72 Inventor/es: **Baldwin, Daryl T.;**  
**Bodary, Sarah C.;**  
**Chan, Andrew C.;**  
**Clark, Hilary;**  
**Jackman, Janet, K. y**  
**Wood, William, I.**

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 357 505 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

Composición y procedimientos novedosos para el tratamiento de enfermedades inmunorelacionadas.

**Campo de la invención**

5

**[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos útiles para el diagnóstico de enfermedades inmunorelacionadas.

**Antecedentes de la invención**

10

**[0002]** Las enfermedades inmunorelacionadas e inflamatorias son la manifestación o consecuencia de rutas biológicas bastante complejas, a menudo múltiples interconectadas que en la fisiología normal son críticas para responder a un traumatismo o lesión, iniciar la reparación de un traumatismo o lesión, y preparan la defensa innata y adquirida frente a organismos extraños. La enfermedad o patología aparece cuando estas rutas fisiológicas normales provocan un traumatismo o lesión adicional ya sea relacionado directamente con la intensidad de la respuesta, o como consecuencia de una regulación anormal o una estimulación excesiva, o una reacción al mismo, o como una combinación de estos.

15

**[0003]** Aunque la génesis de estas enfermedades a menudo implica rutas multietapas y a menudo sistemas/rutas biológicas múltiples diferentes, la intervención en los puntos críticos en una o más de estas rutas puede tener un efecto de mejora o terapéutico. La intervención terapéutica puede darse por antagonismo de un procedimiento/ruta perjudiciales o la estimulación de un procedimiento/ruta beneficiosos.

20

**[0004]** Se conocen muchas enfermedades inmunorelacionadas y se han estudiado de forma exhaustiva. Dichas enfermedades incluyen enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes, enfermedades inflamatorias no mediadas por mecanismos inmunes, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasia, etc.

25

**[0005]** Los linfocitos T (células T) son un componente importante de una respuesta inmune de un mamífero. Los linfocitos T reconocen los antígenos que están asociados con una auto-molécula codificada por los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El antígeno puede mostrarse junto con las moléculas de MHC en la superficie de células que presentan antígenos, células infectadas por virus, células cancerosas, injertos, etc. El sistema de linfocitos T elimina estas células alteradas que representan una amenaza para la salud del mamífero hospedador. Los linfocitos T incluyen linfocitos T colaboradores y linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T colaboradores proliferan de manera extensiva a raíz del reconocimiento de un complejo antígeno-MHC en un antígeno que presenta la célula. Los linfocitos T colaboradores también secretan una diversidad de citocinas, es decir, linfoquinas, que desempeñan un papel central en la activación de linfocitos B, linfocitos T citotóxicos y una diversidad de otras células que participan en la respuesta inmune.

30

35

**[0006]** Las enfermedades inmunorelacionadas pueden tratarse por supresión de la respuesta inmune. El uso de anticuerpos neutralizantes que inhiban las moléculas que tienen actividad estimulante inmune sería beneficioso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias y mediadas por mecanismos inmunes. Pueden utilizarse moléculas que inhiben la respuesta inmune (proteínas directamente o a través del uso de anticuerpos agonistas) para inhibir la respuesta inmune y mejorar de este modo la enfermedad inmunorelacionada.

40

45

**[0007]** Se sabe que los linfocitos T CD4+ son importantes reguladoras de la inflamación. En este documento, los linfocitos T CD4+ se activaron y se analizó el perfil de los genes expresado de forma diferencial tras la activación. Propiamente dicha, la activación de genes específicos puede ser una diana terapéutica potencial. Es necesaria la co-estimulación *in vivo* para obtener una respuesta inmune proliferativa productiva. La lista de moléculas coestimuladoras es bastante extensa y todavía no está claro qué moléculas coestimuladoras juegan únicamente funciones críticas en los diferentes tipos de fases de la inflamación. En esta solicitud, la atención se centra en un gen específicamente regulado por aumento mediante la estimulación con anti-CD3/ICAM, o anti-CD3/anti-CD28 y puede ser útil en la dirección de los procedimientos inflamatorios.

50

**[0008]** Varias enfermedades de la piel se correlacionan con una respuesta inmune aberrante a la autoinmunidad. Las enfermedades, tales como la psoriasis, se distinguen por angioedema, escamación de la piel, edema y la presencia de anticuerpos que se unen a proteínas de la piel. En esta solicitud, los experimentos determinan que un gen se regula por aumento en la piel psoriásica frente a la piel normal.

55

**[0009]** La expresión trastorno inflamatorio intestinal ("TII") describe un grupo de trastornos inflamatorios crónicos de causas desconocidas en los que el intestino (grueso) se inflama, provocando con frecuencia espasmos o diarrea. Se estima que la prevalencia del TII en los Estados Unidos es de aproximadamente 200 casos por cada 5 100.000 personas. Los pacientes con TII pueden dividirse en dos grupos principales, aquellos con colitis ulcerosa ("CU") y aquellos con enfermedad de Crohn ("EC").

**[0010]** En pacientes con CU, existe una reacción inflamatoria que afecta esencialmente a la mucosa del colon. La inflamación es típicamente uniforme y continua sin intervenir en zonas de la mucosa normal. Las células de la 10 mucosa superficial, así como el epitelio de las criptas y la submucosa están implicados en una reacción inflamatoria con infiltración neutrófila. Finalmente, esta situación progresa típicamente hasta provocar un daño epitelial con pérdida de células epiteliales, dando como resultado múltiples ulceraciones, fibrosis, displasia y la retracción longitudinal del colon.

**[0011]** La EC difiere de la CU en que la inflamación se extiende a través de todas las capas de la pared 15 intestinal e incluye el mesenterio, así como los nódulos linfáticos. La EC puede afectar a cualquier parte del canal alimentario desde la boca hasta el ano. A menudo, la enfermedad es discontinua, es decir, los segmentos gravemente afectados por la enfermedad del intestino se separan de las zonas aparentemente no afectadas por la enfermedad. En la EC, la pared intestinal también se espesa, lo que conduce a obstrucciones. Además, no son 20 comunes las fístulas ni las fisuras.

**[0012]** Clínicamente, el TII se caracteriza por diversas manifestaciones que a menudo dan como resultado un curso crónico e impredecible. A menudo, la diarrea sanguinolenta y el dolor abdominal se acompañan de fiebre y pérdida de peso. No es común la anemia, como lo es la fatiga severa. Las manifestaciones articulares varían de 25 artralgia a artritis aguda, así como las anomalías en la función hepática se asocian comúnmente con TII. Los pacientes con TII también tienen un riesgo mayor de padecer carcinomas de colon en comparación con la población general. Durante los "ataques" agudos de TII, normalmente el trabajo y otras actividades normales son imposibles de realizar, y a menudo el paciente es hospitalizado.

**[0013]** Aunque todavía se desconoce la causa de los TII, están implicados varios factores, tales como factores 30 genéticos, infecciosos y la susceptibilidad inmunológica. El TII es mucho más común en caucásicos, especialmente aquellos con ascendencia judía. La naturaleza inflamatoria crónica de la dolencia ha impulsado una búsqueda intensa de una posible causa infecciosa. Aunque se han descubierto agentes que estimulan la inflamación aguda, no se ha descubierto que ninguno de estos provoque la inflamación crónica asociada con el TII. La hipótesis de que el 35 TII es una enfermedad autoinmune se apoya por la manifestación extraintestinal que se ha mencionado previamente del TII como artritis en las articulares, y la respuesta positiva conocida del TII por el tratamiento con agentes terapéuticos, tales como glucocorticoides adrenales, ciclosporina y azatioprina, que se sabe que suprimen la respuesta inmune. Además, el tracto GI, más que cualquier otro órgano del cuerpo, está expuesto continuamente a sustancias antigénicas potenciales, tales como proteínas procedentes de la comida, subproductos bacterianos 40 (LPS), etc.

**[0014]** Además, el riesgo de padecer cáncer de colon es altamente elevado en pacientes con colitis ulcerosa severa, particularmente si la enfermedad ha existido durante varios años. Aproximadamente el 20-25% de los 45 pacientes con TII requieren finalmente cirugía para eliminar el colon, debido a hemorragias masivas, enfermedad crónica debilitante, perforación del colon, o riesgo de cáncer. A veces, la cirugía también se realiza cuando otros tratamientos médicos fallan, o cuando los efectos secundarios de los esteroides u otros medicamentos dañan la salud del paciente. Ya que la cirugía es invasiva y altera drásticamente la vida del paciente, no es un régimen de tratamiento altamente deseable, y es típicamente el tratamiento de último recurso. Para un mejor entendimiento de esta enfermedad y posibilitar su tratamiento, los experimentos determinaron que un gen se reguló por aumento tanto 50 en la EC como en CU cuando se compararon con el tejido normal. Este gen puede resultar útil en el tratamiento de formas de TII.

**[0015]** A pesar de los avances que se han identificado anteriormente en la investigación de trastornos inmunes, existe una gran necesidad de agentes diagnósticos y terapéuticos adicionales capaces de detectar la 55 presencia de trastornos inmunes en un mamífero y de reducir de forma eficaz estos trastornos.

#### Resumen de la invención

**[0016]** Realizaciones La presente invención es según se reivindica.

- [0017]** La presente invención se basa en la identificación de proteínas (incluyendo anticuerpos agonistas y antagonistas) que sean un resultado de la estimulación de la respuesta inmune en mamíferos. Las enfermedades inmunorelacionadas pueden tratarse suprimiendo o mejorando la respuesta inmune. Las moléculas que mejoran la respuesta inmune estimulan o potencian la respuesta inmune a un antígeno. Las moléculas que estimulan la respuesta inmune pueden usarse terapéuticamente cuando la mejora de la respuesta inmune sea beneficiosa. Alternativamente, pueden usarse terapéuticamente moléculas que suprimen la respuesta inmune atenúan o reducen la respuesta inmune a un antígeno (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) cuando la atenuación de la respuesta inmune sea beneficiosa (por ejemplo, inflamación). Por consiguiente, los polipéptidos PRO52254, agonistas y antagonistas de los mismos también son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades inmuno-relacionadas e inflamatorias. En un aspecto específico, dichas medicinas y medicamentos comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido PRO52254, agonista o antagonista del mismo con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la mezcla es estéril.
- [0018]** La entrada de la base de datos de GenBank AL833175 describe una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido PRO52254, y una secuencia aminoacídica que comprende la secuencia aminoacídica que codifica el polipéptido PRO52254. Sin embargo, esta entrada de base de datos no menciona ninguna función posible para estas secuencias.
- [0019]** El documento WO 00/58334 A1 describe una secuencia nucleotídica que comprende una secuencia que es casi idéntica a la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido PRO52254 (véase el gen gene 23), y una secuencia aminoacídica que comprende la secuencia aminoacídica que codifica el polipéptido PRO52254 (véase la proteína 23). Sin embargo, el documento WO 00/58334 A1 no describe específicamente que el gen 23 o la proteína 23 sean útiles en el tratamiento de trastornos inmunes relacionados.
- [0020]** En este documento se describe un procedimiento para identificar agonistas o antagonistas a un polipéptido PRO52254 que comprende poner en contacto el polipéptido PRO52254 con una molécula candidata y controlar la actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO52254. El polipéptido PRO52254 puede ser un polipéptido PRO52254 de secuencia nativa. El agonista o antagonista de PRO52254 puede ser el anticuerpo anti-PRO52254.
- [0021]** En este documento se describe una composición de materia que comprende un polipéptido PRO52254 o un anticuerpo agonista o antagonista que se une al polipéptido en una mezcla con un vehículo o excipiente. La composición puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o el anticuerpo.
- [0022]** La presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico de una enfermedad inmunorelacionada en un mamífero, como se define en las reivindicaciones.
- [0023]** La detección de la unión del anticuerpo puede ser cualitativa o cuantitativa, y puede realizarse en comparación con el control de la formación del complejo en una muestra de control de células tisulares normales conocidas del mismo tipo celular. Una gran cantidad de complejos formados en la muestra de ensayo indica la presencia o ausencia de una enfermedad inmune en el mamífero del que se obtuvieron las células tisulares de ensayo. El anticuerpo preferentemente lleva un marcador detectable. La formación del complejo puede controlarse, por ejemplo, por microscopia de luz, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en la técnica. La muestra de ensayo se obtiene normalmente de un individuo que se sospecha que tiene una deficiencia o anomalía del sistema inmune.
- [0024]** En otro aspecto más, la divulgación proporciona una partícula vírica recombinante que comprende un vector vírico que consiste básicamente en un promotor, ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido PRO52254, (b) un polipéptido agonista de un polipéptido PRO52254, o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido PRO52254, y una secuencia señal para la secreción celular del polipéptido, en la que el vector vírico está asociado con las proteínas estructurales víricas. Preferentemente, la secuencia señal es de un mamífero, tal como a partir de un polipéptido PRO52254 nativo.
- [0025]** En una realización más adicional, la divulgación se refiere a una célula productora *ex vivo* que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa proteínas estructurales retrovíricas y también comprende un vector retrovírico que consiste básicamente en un promotor, ácido nucleico que codifica (a) un polipéptido PRO52254, (b) un polipéptido agonista de un polipéptido PRO52254 o (c) un polipéptido antagonista de un polipéptido PRO52254, y una secuencia señal para la secreción celular del polipéptido, en la que dicha célula productora empaqueta el vector retrovírico junto con las proteínas estructurales para producir partículas retrovíricas

recombinantes.

**[0026]** En una realización más adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la actividad de linfocitos T en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido PRO52254, (b) un agonista de un polipéptido PRO52254, o (c) un antagonista de un polipéptido PRO52254, en el que la actividad de linfocitos T en mamífero aumenta.

**[0027]** En una realización más adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para disminuir la actividad de linfocitos T en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido PRO52254, (b) un agonista de un polipéptido PRO52254, o (c) un antagonista de un polipéptido PRO52254, en el que la actividad de linfocitos T en el mamífero disminuye.

**[0028]** En una realización más adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para aumentar la proliferación de linfocitos T en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido PRO52254, (b) un agonista de un polipéptido PRO52254, o (c) un antagonista de un polipéptido PRO52254, en el que la proliferación de linfocitos T en el mamífero aumenta.

**[0029]** En una realización más adicional, la divulgación proporciona un procedimiento para disminuir la proliferación de linfocitos T en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero (a) un polipéptido PRO52254, (b) un agonista de un polipéptido PRO52254, o (c) un antagonista de un polipéptido PRO52254, en el que la proliferación de linfocitos T en el mamífero disminuye.

#### Breve descripción de los dibujos

**[0030]** La Figura 1 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 1) de un ADNc de PRO52254 de secuencia nativa, en la que la SEQ ID NO: 1 es un clon denominado en este documento como "DNA327145". La Figura 2 muestra la secuencia aminoacídica (SEQ ID NO: 2) obtenida a partir de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 1 mostrada en la Figura 1. La Figura 3 muestra una secuencia nucleotídica (SEQ ID NO: 3) de un ADNc de PRO71302 de secuencia MURINA nativa, en la que SEQ ID NO: 3 es un clon denominado en este documento como "DNA327512". La Figura 4 muestra la secuencia aminoacídica (SEQ ID NO: 4) obtenida a partir de la secuencia codificante de SEQ ID NO: 3 mostrada en la Figura 3.

#### 35 Divulgación detallada de las realizaciones preferidas

##### I. Definiciones

**[0031]** Las expresiones "polipéptido PRO52254" y "PRO52254", como se usan en este documento, y cuando se siguen inmediatamente de una designación numérica se refieren a diversos polipéptidos, en los que la designación completa (es decir, PRO52254/número) se refiere a secuencias polipeptídicas específicas como se describe en este documento. La expresión "polipéptido PRO52254/número" y "PRO52254/número" en las que el término "número" se proporciona como una designación numérica real, como se usa en este documento, incluye polipéptidos de secuencia nativa y variantes polipeptídicas (que se definen adicionalmente en este documento). Los polipéptidos PRO52254 descritos en este documento, pueden aislarse a partir de una diversidad de fuentes, tales como tipos de tejido humano o a partir de otra fuente, o prepararse por procedimientos recombinantes o sintéticos. La expresión "polipéptido PRO52254" se refiere a cada polipéptido PRO52254/número individual descrito en este documento. Todas las descripciones en esta memoria descriptiva que hacen referencia al "polipéptido PRO52254" se refieren a cada uno de los polipéptidos de forma individual, así como conjuntamente. Por ejemplo, las descripciones de la preparación de, la purificación de, la derivación, la formación de anticuerpos a o por el contrario, la administración de, composiciones que contienen, tratamiento de una enfermedad con, etc., pertenecen a cada polipéptido de la divulgación individualmente. La expresión "polipéptido PRO52254" también incluye variantes de los polipéptidos PRO52254/número descritos en este documento.

**[0032]** Un "polipéptido PRO52254 de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia aminoacídica que el polipéptido PRO52254 correspondiente de origen natural. Dichos polipéptidos PRO52254 de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. La expresión "polipéptido PRO52254 de secuencia nativa" incluye específicamente formas de origen natural truncadas o secretadas del polipéptido PRO52254 específico (por ejemplo, una secuencia de dominio

extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas empalmadas alternativamente) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. En diversas realizaciones de la divulgación, los polipéptidos PRO52254 de secuencia nativa descritos en este documento son polipéptidos de secuencia nativa maduros o de longitud completa que comprenden las secuencias aminoacídicas de longitud completa mostradas en las figuras adjuntas. Los  
 5 codones de inicio y de terminación se muestran en fuente negrita y subrayada en las figuras. Sin embargo, mientras que se muestra que el polipéptido PRO52254 descrito en las figuras adjuntas comienza con restos de metionina denominados en este documento como aminoácido de posición I en las figuras, es concebible y posible que otros restos de metionina ubicados en la dirección 5' o en la dirección 3' del aminoácido de posición 1 en las figuras puede emplearse como el resto aminoacídico de partida para los polipéptidos PRO52254.

10

**[0033]** El "dominio extracelular" o "ECD" del polipéptido PRO52254 se refiere a una forma del polipéptido PRO52254 que es básicamente libre de los dominios transmembrana y citoplásmicos. Generalmente, un ECD del polipéptido PRO52254 tendrá menos del 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplásmicos y preferentemente, tendrá menos del 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana  
 15 identificado por los polipéptidos PRO52254 de la presente invención se identifica de conformidad con los criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero lo más probable es que no sea de más de aproximadamente 5 aminoácidos en cada extremo del dominio como se identificó inicialmente en este documento. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido PRO52254 puede contener de aproximadamente 5 o menos  
 20 aminoácidos en cualquier lado del límite dominio transmembrana/dominio extracelular como se identifica en los Ejemplos o la memoria descriptiva y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y ácido nucleico que los codifican, se contemplan por la presente divulgación.

**[0034]** La ubicación aproximada de los "péptidos señal" de los diversos polipéptidos PRO52254 descritos en este documento se muestra en la presente memoria descriptiva y/o las figuras adjuntas. Se observa, sin embargo, que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero lo más probable es que no sea más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite C-terminal del péptido señal como se identificó inicialmente en este documento, en el que el límite C-terminal del péptido señal puede identificarse de conformidad  
 25 con los criterios rutinariamente empleados en la técnica para identificar el tipo de elemento de secuencia aminoacídica (por ejemplo, Nielsen y col., Prot. Eng., 10: 1-6 (1997) y von Heinje y col., Nucl. Acids Res., 14: 4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, dando como resultado en más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, en los que el péptido señal se escinde entre no más de aproximadamente 5 aminoácidos a cualquier lado del límite C-terminal del péptido señal como se identifica en este documento, y los  
 30 polinucleótidos que los codifican, se contemplan por la presente divulgación.

**[0035]** "Variante de polipéptido PRO52254" se refiere a un polipéptido PRO52254 activo como se ha definido anteriormente o a continuación que tiene al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 80% con una secuencia de polipéptido PRO52254 de secuencia nativa de longitud completa como se describe en  
 40 este documento, una secuencia de polipéptido PRO52254 que carece del péptido señal como se describe en este documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO52254, con o sin el péptido señal, como se describe en este documento o cualquier otro fragmento de una secuencia de PRO52254 de longitud completa como se describe en este documento. Dichas variantes de polipéptido PRO52254 incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO52254 en los que se añaden, o se eliminan uno o más restos aminoacídicos, en el extremo N o C de la secuencia  
 45 aminoacídica nativa de longitud completa. Normalmente, una variante de polipéptido PRO52254 tendrá al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 80%, alternativamente, al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 81%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 82%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 83%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del  
 50 84%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 85%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 86%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 87%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 88%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 89%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 90%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 91%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 92%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 93%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 94%, alternativamente al menos  
 55 aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 95%, alternativamente al menos

aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 96%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 97%, alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 98% y alternativamente al menos aproximadamente una identidad de secuencia aminoacídica del 99% con respecto a una secuencia de polipéptido PRO52254 de secuencia nativa de longitud completa como se describe en este documento, una secuencia polipéptido PRO52254 que carece de péptido señal como se describe en este documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO52254, con o sin el péptido señal, como se describe en este documento o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de polipéptido PRO52254 de longitud completa como se describe en este documento. Normalmente, variantes de polipéptidos PRO52254 son al menos de aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos

10 [0036] aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 40 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 60 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 80 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 300 aminoácidos de longitud, o más.

20 [0037] El "porcentaje (%) de identidad de secuencia aminoacídica" con respecto a las secuencias del polipéptido PRO52254 identificadas en este documento se define como el porcentaje de restos aminoacídicos en una secuencia candidata que son idénticos con los restos aminoacídicos en la secuencia específica de polipéptido PRO52254, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica puede conseguirse de diversas maneras que están dentro de la capacidad del experto en la materia, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se van a comparar. Sin embargo, para los fines de este documento, los valores del % de identidad de secuencia aminoacídica se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 que se indica a continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 a continuación se ha presentado con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C. 20559, en la que está registrado bajo el N° de Registro de Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son ajustan en el programa ALIGN-2 y no varían.

45 [0038] En las situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia aminoacídica determinada A a, con, o frente a una secuencia aminoacídica determinada B (que puede escribirse alternativamente como una secuencia aminoacídica determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos a, con, o frente a una secuencia aminoacídica determinada B) se calcula como se indica a continuación:

#### 100 veces la fracción X/Y

50 en la que X es el número de restos aminoacídicos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de restos aminoacídicos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia aminoacídica A no sea igual a la longitud de la secuencia aminoacídica B, el % de identidad de secuencia aminoacídica de A a B no será igual al % de identidad de secuencia aminoacídica de B a A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad de secuencia aminoacídica utilizando este procedimiento, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia aminoacídica de la secuencia de aminoácidos denominada "Proteína de Comparación" con respecto a la secuencia aminoacídica denominada "PRO52254", en la que "PRO52254" representa la secuencia aminoacídica de un polipéptido PRO52254 hipotético de interés, "Proteína de Comparación" representa la secuencia aminoacídica de

un polipéptido frente al que se está comparando el

**[0039]** polipéptido "PRO52254" de interés, y cada uno de "X", "Y" y "Z" representa diferentes restos aminoacídicos hipotéticos.

5

**[0040]** A menos que se especifique otra cosa, todos los valores en % de identidad de secuencia aminoacídica utilizados en este documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad de secuencia aminoacídica también pueden obtenerse como se describe a continuación usando del programa informático WU-BLAST-2 (Altschul y col.,

10 Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996). La mayor parte de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento ("overlap span") = 1, fracción de solapamiento ("overlap fraction") = 0,125, umbral de palabra ("word threshold") T = 11, y matriz de puntuación ("scoring matrix") = BLOSUM 62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, el valor en % de identidad de secuencia aminoacídica se determina dividiendo

15 (a) el número de restos aminoacídicos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO52254 de interés que tiene una secuencia obtenida a partir del polipéptido PRO52254 nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (es decir, la secuencia frente a la que se compara el polipéptido PRO52254 de interés que puede ser un polipéptido variante PRO52254) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de restos aminoacídicos del polipéptido PRO52254 de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un polipéptido que comprende una secuencia aminoacídica A que tiene o teniendo al menos una

20 identidad de secuencia aminoacídica del 80% con respecto a la secuencia aminoacídica de B", la secuencia aminoacídica A es la secuencia aminoacídica de comparación de interés y la secuencia aminoacídica B es la secuencia aminoacídica del polipéptido PRO52254 de interés.

25 **[0041]** El porcentaje de identidad de secuencia aminoacídica también se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> o bien pueden obtenerse del National Institute of Health, Bethesda, MD. El programa NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo,

30 por ejemplo, no desenmascarado = sí, cadena = todos, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, e-valor de multipaso = 0,01, constante para multipaso = 25, caída para alineación con espacios final ("dropoff for final gapped alignment") = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62.

35 **[0042]** En las situaciones en las que se emplea NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias aminoacídicas, el % de identidad de secuencia aminoacídica de una secuencia aminoacídica determinada A a, con, o frente a una secuencia aminoacídica determinada B (que puede escribirse alternativamente como una secuencia aminoacídica determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia aminoacídica a, con, o frente a una secuencia aminoacídica determinada B) se calcula como se indica a continuación:

#### 100 veces la fracción X/Y

40 en la que X es el número de restos aminoacídicos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de A y B, y en la que Y es el número total de restos aminoacídicos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia aminoacídica A no sea igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia aminoacídica de A a B no será igual al % de identidad de secuencia aminoacídica de B a A.

45

**[0043]** El "polinucleótido variante PRO52254" o "secuencia de ácidos nucleicos variante PRO52254" se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica una polipéptido PRO52254 activo como se define a continuación y que tiene al menos aproximadamente un 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido PRO52254 de secuencia nativa de longitud completa

50 como se describe en este documento, una secuencia de polipéptido PRO52254 de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se describe en este documento, un dominio extracelular de un polipéptido PRO52254, con o sin el péptido señal, como se describe en este documento, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido PRO52254 de longitud completa como se describe en este documento. Normalmente, un polinucleótido variante PRO52254 tendrá al menos aproximadamente un 80% de identidad de

55 secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente al menos aproximadamente un 81% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente al menos aproximadamente un 82% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente al menos aproximadamente un 83% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,



alternativamente al menos aproximadamente un 84% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 5 alternativamente al menos aproximadamente un 85% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 86% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 87% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 10 alternativamente al menos aproximadamente un 88% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 89% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 90% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 91% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 15 alternativamente al menos aproximadamente un 92% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 93% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 94% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 95% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 20 alternativamente al menos aproximadamente un 96% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 alternativamente al menos aproximadamente un 97% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos,  
 15 alternativamente al menos aproximadamente un 98% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, y  
 alternativamente al menos aproximadamente un 99% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una  
 secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido PRO52254 de secuencia nativa de longitud  
 completa como se describe en este documento, una secuencia de polipéptido PRO52254 de secuencia nativa de  
 longitud completa que carece del péptido señal como se describe en este documento, un dominio extracelular de un  
 20 polipéptido PRO52254, con o sin el péptido señal, como se describe en este documento, o cualquier otro fragmento  
 de una secuencia de polipéptido PRO52254 de longitud completa como se describe en este documento. Las  
 variantes no incluyen la secuencia nucleotídica nativa.

**[0044]** Normalmente, los polinucleótidos variantes PRO52254 tienen al menos 30 nucleótidos de longitud,  
 25 alternativamente al menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos  
 aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 120 nucleótidos de  
 longitud, alternativamente al menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos  
 aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 210 nucleótidos de  
 longitud, alternativamente al menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos  
 30 aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 300 nucleótidos de  
 longitud, alternativamente al menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos  
 aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 900 nucleótidos de  
 longitud, o más.

35 **[0045]** El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos" con respecto a las secuencias de  
 ácidos nucleicos que codifica el PRO52254 identificadas en este documento se define como el porcentaje de  
 nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos  
 de PRO52254 de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario,  
 40 para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el  
 porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro  
 de la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible públicamente, tal como el software BLAST,  
 BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Sin embargo, para los fines de este documento, los valores del % de la  
 identidad de secuencia de ácidos nucleicos se generan usando el programa informático de comparación de  
 45 secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a  
 continuación. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era de Genentech, Inc. y el código  
 fuente mostrado en la Tabla 1 a continuación se ha presentado con la documentación del usuario en la Oficina de  
 Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington D.C. 20559, en la que está registrado bajo el N° de Registro de  
 50 Derechos de Autor de Estados Unidos TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de  
 Genentech Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la  
 Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX,  
 preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son ajustan en el  
 programa ALIGN-2 y no varían.

**[0046]** En las situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de ácidos  
 55 nucleicos, el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C  
 a, con, o frente a una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que puede escribirse alternativamente como  
 una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de  
 ácidos nucleicos a, con, o frente a una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula como se indica a  
 continuación:

**100 veces la fracción W/Z**

en la que W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y en la que Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no sea igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de D a C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos denominada "ADN de Comparación" con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos denominada "ADN de PRO52254", en la que "ADN de PRO52254" representa una secuencia de ácidos nucleicos hipotética que codifica el PRO52254 de interés, "ADN de Comparación" representa la secuencia nucleotídica de una molécula de ácido nucleico frente a la que se está comparando la molécula de ácido nucleico "ADN de PRO52254" de interés, y "N", "L" y "V" representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos.

**[0047]** A menos que se indique otra cosa específicamente, los valores en % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos usados en este documento se obtienen como se ha descrito en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2. Sin embargo, los valores en % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos también se pueden obtener como se describe a continuación mediante el uso del programa informático WU-BLAST-2 (Altschul y col., Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996). La mayor parte de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se fijan en los valores por defecto. Los valores no fijados a valores por defecto, es decir, los parámetros ajustables, se fijan según los siguientes valores: espacio de solapamiento ("overlap span") = 1, fracción de solapamiento ("overlap fraction") = 0,125, umbral de palabra ("word threshold") T = 11, y matriz de puntuación ("scoring matrix") = BLOSUM 62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, el valor en % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos se determina dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos en el emparejamiento entre la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO52254 de interés que tiene una secuencia obtenida a partir del ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO52254 de secuencia nativa y la molécula de ácido nucleico de comparación de interés (es decir, la secuencia contra la que se compara la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO52254 de interés que puede ser un polipéptido variante PRO52254) según se determina por WU-BLAST-2 entre (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO52254 de interés. Por ejemplo, en la afirmación "un molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos A que tiene al menos un 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos de B", la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de ácido nucleico de comparación de interés y la secuencia de ácidos nucleicos B es la secuencia de ácidos nucleicos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO52254 de interés.

**[0048]** El porcentaje de identidad de secuencia de ácidos nucleicos también puede determinarse usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 puede descargarse de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> bien puede obtenerse del National Institute of Health, Bethesda, MD. El programa NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en los que todos los parámetros de búsqueda se fijan a valores por defecto incluyendo, por ejemplo, no desenmascarado = sí, cadena = todos, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, e-valor de multipaso = 0,01, constante para multipaso = 25, caída para alineación con espacios final "(dropoff for final gapped alignment)" = 25 y la matriz de puntuación = BLOSUM62.

**[0049]** En las situaciones en las que se emplea NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias, el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o frente a una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que puede escribirse alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos a, con, o frente a una secuencia de aminoácidos determinada D) se calcula como se indica a continuación:

**100 veces la fracción W/Z**

en la que W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no sea igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos de D a C.

**[0050]** En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes PRO52254 son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido PRO52254 activo y que es capaz de hibridarse, preferentemente en condiciones de hibridación y lavado rigurosas, con respecto a secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido PRO52254 de longitud completa como se describe en este documento. Los polipéptidos variantes PRO52254 pueden ser aquéllos  
5 codificados por un polinucleótido variante PRO.

**[0051]** El término "aislado" cuando se usa para describir los diversos polipéptidos descritos en este documento, se refiere a polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interfieren típicamente  
10 con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de una secuencia aminoacídica N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el  
15 polipéptido *in situ* en el interior de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido PRO52254 no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

**[0052]** Un ácido nucleico "aislado" que codifica un polipéptido PRO52254 u otro ácido nucleico "aislado" que  
20 codifica un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia normalmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos se distinguen de la molécula de ácido nucleico específica que codifica el polipéptido tal y  
25 como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una ubicación cromosómica diferente de la de las células naturales.

**[0053]** El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador en particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.  
30  
35

**[0054]** Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la  
40 transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se usan  
45 según la práctica convencional.

**[0055]** El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales dirigidos contra PRO52254 (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos dirigidos contra PRO52254 con especificidad polipeptídica, anticuerpos monocatenarios dirigidos contra PRO52254, y fragmentos de anticuerpos dirigidos contra PRO52254 (véase a continuación). El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos con la excepción de que pueden estar presentes posibles mutaciones naturales que en pequeñas cantidades.  
50  
55

**[0056]** La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación puede determinarse fácilmente por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende

generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para volverse a hibridar cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que las temperaturas relativas superiores tenderán a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las temperaturas inferiores no tanto. Para obtener detalles adicionales y explicaciones de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

10 **[0057]** Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de rigurosidad elevada", como se usan en este documento, pueden identificarse por aquéllas que: (1) emplean una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con

15 **[0058]** cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) emplean formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de rigurosidad elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

20 **[0059]** Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse como se describen en Sambrook y col, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las que se han descrito anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar los factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

30 **[0060]** El término "epítipo marcado" cuando se usa en este documento, se refiere a un polipéptido químico que comprende un polipéptido PRO52254 condensado a un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene restos suficientes para proporcionar un epítipo frente al que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiera en la actividad del polipéptido al que se condensa. El polipéptido marcador también es preferentemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos marcador adecuados tienen generalmente al menos seis restos aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos aminoácidos).

40 **[0061]** Como se usa en este documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia aminoácida con la especificidad de unión deseada, que es distinta de la del sitio de identificación y unión del antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominios constantes de la inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia aminoácida contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos de IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y la IgA-2), IgE, IgD o IgM.

50 **[0062]** "Activo" o "actividad" para los fines de este documento, se refiere a una forma o formas de un polipéptido PRO52254 que retienen una actividad biológica y/o inmunológica de PRO52254 nativo o de origen natural, en la que actividad "biológica" se refiere a una función biológica (inhibidora o estimuladora) provocada por un PRO52254 nativo o de origen natural que es distinta de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico que se encuentra en un PRO52254 nativo o de origen natural y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo frente a un epítipo antigénico que se encuentra en un PRO52254 nativo o de origen natural.

**[0063]** El término "antagonista" se usa en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea,

inhibe o neutraliza parcial o totalmente la actividad biológica de un polipéptido PRO52254 nativo descrito en este documento. De forma similar, el término "agonista" se usa en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido PRO52254 nativo descrito en este documento. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos PRO52254 nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, pequeñas moléculas orgánicas agonistas o antagonistas, etc. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO52254 pueden comprender poner en contacto un polipéptido PRO52254 con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas asociadas normalmente con el polipéptido PRO52254.

10

**[0064]** "Tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en el que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) el trastorno o dolencia patológica objetivo. Entre aquéllos que necesitan el tratamiento se incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno así como aquéllos que son propensos a padecer el trastorno o aquéllos a los que se debe prevenir el trastorno.

15

**[0065]** La administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes en un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo largo de tiempo. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que es bastante cíclico en su naturaleza.

20

**[0066]** "Mamífero" para los fines del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de deporte o de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

25

**[0067]** La administración "combinada con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

30

**[0068]** Los "vehículos", como se usan en este documento, incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuestos a los mismos en las dosis y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa de pH tamponado. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™.

40

**[0069]** Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región variable o de unión a antígeno del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057-1062); moléculas de anticuerpos monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticuerpos.

45

**[0070]** La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticas, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio único de unión a antígeno y un fragmento "Fc" residual, una denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación a antígeno y aún es capaz de reticular el antígeno.

50

**[0071]** "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan

55

**[0072]** para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDR específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

- [0073]** El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de una serie de restos en el extremo carboxi del dominio CH1 de la cadena pesada que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el resto o  
5 restos de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tenían cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.
- [0074]** Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de invertebrado pueden  
10 asignarse a uno de dos tipos claramente diferentes, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- [0075]** Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA,  
15 IgD, IgE, IgG e IgM, y varios de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2.
- [0076]** Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "sFv" comprenden los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el  
20 polipéptido Fv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, págs. 269-315 (1994).
- [0077]** El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a  
25 antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena de polipéptido (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente en, por ejemplo, el documento EP 404.097; el documento WO  
30 93/11161; y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).
- [0078]** Un anticuerpo "aislado" es el que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirán con los usos de diagnóstico y terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros  
35 solutos proteínicos y no proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferentemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El  
40 anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- [0079]** Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido en particular o un  
45 epítipo en un polipéptido particular es el que se une a este polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin la unión sustancial a cualquier otro polipéptido o epítipo de polipéptido.
- [0080]** La palabra "marcador" cuando se usa en este documento, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo para generar un anticuerpo "marcado". El  
50 "marcador" puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.
- [0081]** Por "fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la  
55 presente divulgación. Los ejemplos de fases sólidas que incluidos en este documento engloban las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliácridamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna

de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos N° 4.275.149.

5 **[0082]** Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido PRO52254 o un anticuerpo para el mismo) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de las membranas biológicas.

10 **[0083]** Una "molécula pequeña" se define en este documento como que tiene un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Dalton.

15 **[0084]** La expresión "enfermedad inmunorelacionada" se refiere a una enfermedad en la que un componente del sistema inmune de un mamífero provoca, media o por otro lado contribuye a una morbilidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en las que la estimulación o la intervención de la respuesta inmune tiene un efecto de mejora en la progresión de la enfermedad. Se incluyen en esta expresión enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes, enfermedades inflamatorias no mediadas por mecanismos inmunes, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasia, etc.

20 **[0085]** La expresión "enfermedad mediada por linfocitos T" se refiere a una enfermedad en la que los linfocitos T median o también contribuyen directa o indirectamente a una morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por linfocitos T puede asociarse con efectos mediados por células, efectos mediados por linfocinas, etc., e incluso efectos asociados con linfocitos B, si los linfocitos B se estimulan, por ejemplo, por las linfocinas secretadas por los linfocitos T.

25 **[0086]** Los ejemplos de otras enfermedades inmunorelacionadas o inflamatorias, al menos alguna de las cuales son mediadas por mecanismos inmunes o linfocitos T, que pueden tratarse según la divulgación, incluyen lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, la artritis crónica juvenil, espondiloartritis, esclerosis sistémica (esclerodermia), las miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia autoinmune hemolítica (pancitopenia inmune, hemoglobinuria nocturna paroxismal), trombocitopenia autoinmune (trombocitopenia idiopática púrpura, trombocitopenia inmune-mediada), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por mecanismos inmunes (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o el síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica; 30 enfermedades hepato biliares, tales como la hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), la hepatitis activa crónica autoinmune, la cirrosis biliar primaria, la hepatitis granulomatosa, y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa; enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y la enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por mecanismos inmunes, incluyendo enfermedades ampollas de la piel, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, 40 enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a la comida y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad; enfermedades asociadas a trasplantes, incluyendo rechazo del injerto y enfermedad del injerto contra el hospedador. Las enfermedades infecciosas, incluyendo las enfermedades víricas, tales como SIDA (infección por VIH), hepatitis A, B, C, D y E, herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones 45 fúngicas, infecciones por protozoos, infecciones por parásitos.

**[0087]** La expresión "cantidad eficaz" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO52254 y/o un agonista/antagonista que da como resultado conseguir un fin indicado particular. Una "cantidad eficaz" de un polipéptido PRO52254 o agonista o antagonista del mismo puede determinarse empíricamente. Además, una 50 "cantidad terapéuticamente eficaz" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO52254 y/o un agonista/antagonista que es eficaz para conseguir un efecto terapéutico deseado. Esta cantidad también puede determinarse empíricamente.

**[0088]** La expresión "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos 55 radioactivos (por ejemplo  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$  y  $^{186}\text{Re}$ ), agentes quimioterapéuticos y toxinas, tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o fragmentos de los mismos.

**[0089]** Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos

de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, citosina arabinosido ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citoxina, taxoides, por ejemplo paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalano, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la Patente de Estados Unidos N° 4,675,187), melfalano y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición los agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, como por ejemplo tamoxifeno y onapristona.

- 10 **[0090]** Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento, se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa expresando en exceso cualquiera de los genes identificados en este documento, *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de las células diana en fase S. Los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de fase S), tales como los agentes que inducen el arresto de G1 y el arresto de la fase M. Los bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores topo II como por ejemplo doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que detienen G I y que también desbordan la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN como por ejemplo tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami y col., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente pág. 13.

- [0091]** El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Los ejemplos de dichas citocinas incluyen linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen las hormonas del crecimiento, tales como la hormona del crecimiento humana, la N-metionil hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorelaxina; las hormonas glicoproteicas, tales como la hormona estimuladora del folículo (FSH), la hormona estimuladora de la tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor de crecimiento hepático; el factor de crecimiento de fibroblastos; la prolactina; el lactógeno placentario; el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ ; la sustancia inhibidora de mullerian; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); los factores de crecimiento nervioso; el factor de crecimiento plaquetario; los factores de crecimiento transformadores (TGF), tales como el TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; el factor de crecimiento similar a la insulina I y II; la eritropoyetina (EPO); los factores osteoinductores; interferones, tales como el interferón  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ; los factores estimuladores de colonias (CSF), tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL), tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores polipeptídicos incluyendo LIF y el ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citocina incluye proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivos celulares recombinantes y los equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

- [0092]** Como se usa en este documento, el término "inmuno adhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia aminoacídica con la especificidad de unión deseada, que es distinta de la del sitio de identificación y unión del antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominios constantes de la inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia aminoacídica contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos de IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y la IgA-2), IgE, IgD o IgM.

- [0093]** Como se usa en este documento, la expresión "células inflamatorias" designa células que mejoran la respuesta inflamatoria, tales como células mononucleares, eosinófilos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (PMN).



**Tabla 1**

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26]={
/*  A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */ { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */ { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */ {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */ { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */ { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */ {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */ { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */ {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */ {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */ {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */ {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */ {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */ { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */ {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */ { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */ { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */ {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */ { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */ { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */ { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */ {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */ { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */ {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */ { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};

```

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP      16      /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP      24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS        1024    /* max jmps in an path */
#define MX          4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT        3       /* value of matching bases */
#define DMIS        0       /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0       8       /* penalty for a gap */
#define DINS1       1       /* penalty per base */
#define PINS0       8       /* penalty for a gap */
#define PINS1       4       /* penalty per residue */

struct jmp {
    short          n[MAXJMP];    /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP];    /* base no. of jmp in seq x */
};
/* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
    int            score;        /* score at last jmp */
    long           offset;       /* offset of prev block */
    short          ijmp;        /* current jmp index */
    struct jmp     jp;          /* list of jmps */
};

struct path {
    int            spc;          /* number of leading spaces */
    short          n[JMPS];      /* size of jmp (gap) */
    int            x[JMPS];      /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char             *ofile;        /* output file name */
char             *names[2];     /* seq names: getseqs() */
char             *prog;        /* prog name for err msgs */
char             *seqx[2];     /* seqs: getseqs() */
int              dmax;         /* best diag: nw() */
int              dmax0;        /* final diag */
int              dna;         /* set if dna: main() */
int              endgaps;      /* set if penalizing end gaps */
int              gapx, gapy;    /* total gaps in seqs */
int              len0, len1;   /* seq lens */
int              ngapx, ngapy;  /* total size of gaps */
int              smax;         /* max score: nw() */
int              *xbm;         /* bitmap for matching */
long            offset;        /* current offset in jmp file */
struct           diag          *dx;    /* holds diagonals */
struct           path          pp[2];  /* holds path for seqs */

char             *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char             *getseq(), *g_alloc();

```

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 * where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 * The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
 * Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 * Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 * A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 * Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
    main
    int    ac;
    char   *av[ ];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0;                /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out";        /* output file */

    nw();                       /* fill in the matrix, get the possible jmps */
    readjmps();                 /* get the actual jmps */
    print();                    /* print stats, alignment */

    cleanup(0);                /* unlink any tmp files */
}

```

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()
{
    nw
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;       /* keep track of delx */
    int       *tmp;              /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;               /* score for each type */
    int       ins0, ins1;        /* insertion penalties */
    register  id;                 /* diagonal index */
    register  ij;                 /* jmp index */
    register  *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    register  xx, yy;            /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
     */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
         */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbrm[*px-'A']&xbrm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

```

...NW

```

id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    col1[yy] = mis;
else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejmps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
&& xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
    dx[id].ijmp++;
    if (++ij >= MAXJMP) {
        writejmps(id);
        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }
}
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[ ]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256    /* maximum output line */
#define P_SPC   3      /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;          /* set output line length */
FILE    *fx;          /* output file */

print()
print
{
    int     lx, ly, firstgap, lastgap;    /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) {    /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) {    /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) {    /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
    int lx, ly; /* "core" (minus endgaps) */
    int firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */
{
    int nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char outx[32];
    double pct;
    register n0, n1;
    register char *p0, *p1;

    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

getmat



```

fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outh, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outh);
}

fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outh, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outh);
}
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];       /* jmp index for a path */
static      nc[2];       /* number at start of current line */
static      ni[2];       /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];      /* ptr to current element */
static char *po[2];      /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars() */

/*
 * print alignment of described in struct path pp[ ]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;

        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr\_align

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;

        more++;

        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
                */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;

            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
    dumpblock
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr\_align

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[ ] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;

    for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

nums

putline

...putline

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[ ] is current element (from 1)
 * nc[ ] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = ':';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_alloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE *fj;

int cleanup();                            /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
int i;
{
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}

/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char *
getseq(file, len)
char *file; /* file name */
int *len; /* seq len */
{
    char line[1024], *pseq;
    register char *px, *py;
    int natgc, tlen;
    FILE *fp;

    if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
        exit(1);
    }
    tlen = natgc = 0;
    while (fgets(line, 1024, fp)) {
        if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
            continue;
        for (px = line; *px != '\n'; px++)
            if (isupper(*px) || islower(*px))
                tlen++;
    }
    if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
    }
    pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
}

```

cleanup

getseq

...getseq

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
}
*py++ = '\0';
*py = '\0';
(void) fclose(fp);
dna = natgc > (tlen/3);
return(pseq+4);
}

```

```

char *
g_malloc(msg, nx, sz)
char *msg;          /* program, calling routine */
int nx, sz;         /* number and size of elements */

```

g\_malloc

```

{
    char *px, *calloc();

    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

```

```

/*
* get final jmps from dx[ ] or tmp file, set pp[ ], reset dmax: main()
*/

```

```

readjmps()
readjmps
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;

    if (fj) {
        (void) fclose(fj);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

...readjumps

```

        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1
             */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy++;
            ngapy -= siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
            i1++;
        }
        else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
            pp[0].n[i0] = siz;
            pp[0].x[i0] = xx;
            gapx++;
            ngapx += siz;
            /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
            siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
            i0++;
        }
    }
    else
        break;
}

/* reverse the order of jumps
*/
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
    writejmps
    int    ix;
{
    char    *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

**Tabla 2**

PRO52254	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad de la secuencia aminoacídica = (el número de restos aminoacídicos de combinación idéntica entre las dos secuencias polipeptídicas como se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos aminoacídicos del polipéptido PRO52254) = 5 dividido por 15 = 33,3%

5

**Tabla 3**

PRO52254	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de la secuencia aminoacídica = (el número de restos aminoacídicos de combinación idéntica entre las dos secuencias polipeptídicas como se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos aminoacídicos del polipéptido PRO52254) = 5 dividido por 10 = 50%

**Tabla 4**

PRO52254-ADN	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos = (el número de nucleótidos de combinación idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos como se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de PRO52254-ADN) = 6 dividido por 14 = 42,9%

10

**Tabla 5**

PRO52254-ADN	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLLV	(Longitud = 9 nucleótidos)

% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos = (el número de nucleótidos de combinación idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos como se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de PRO52254-ADN) = 4 dividido por 12 = 33,3%



## II. Procedimientos de la Invención

## Polipéptidos PRO52254 de Longitud Completa

5 **[0094]** Como se da a conocer en este documento, se aíslan secuencias nucleotídicas que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos PRO52254. En particular, se han identificado y aislado los ADNc que codifican diversos polipéptidos PRO52254, como se da a conocer con más detalle en los Ejemplos que se indican a continuación. Debe apreciarse que las proteínas producidas en ciclos de expresión diferentes pueden ser números PRO52254 diferentes determinados, pero el número UNQ es único para cualquier ADN determinado y la proteína codificada, y no cambiará. Sin embargo, por simplicidad, en la presente memoria descriptiva, la proteína codificada por las moléculas de ácido nucleico nativo de longitud completa dadas a conocer en este documento, así como todos los homólogos nativos adicionales y variantes incluidas en la definición anterior de PRO52254, se denominarán como "PRO52254/número", independientemente de su origen o modo de preparación.

10  
15 **[0095]** Como se da a conocer en los Ejemplos que se indican a continuación, se han depositado diversos clones de ADNc con el ATCC. Las secuencias nucleotídicas reales de dichos clones pueden determinarse fácilmente por un experto en la materia mediante la secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos rutinarios en la técnica. La secuencia aminoacídica predicha puede determinarse a partir de la secuencia nucleotídica que usa un experto de forma rutinaria. Para los polipéptidos PRO52254 y los ácidos nucleicos codificantes descritos en este documento, los Solicitantes han identificado lo que se cree que es el mejor marco de lectura identificable con la información de la secuencia disponible en el momento.

## Variantes del Polipéptido PRO52254

25 **[0096]** Además de los polipéptidos PRO52254 de secuencia nativa de longitud completa descritos en este documento, se contempla que pueden prepararse variantes de PRO52254. Las variantes de PRO52254 pueden prepararse introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ADN de PRO52254, y/o mediante la síntesis del polipéptido PRO52254 deseado. Los expertos en la materia apreciarán que los cambios aminoacídicos pueden alterar los procedimientos post-traduccionales del PRO52254, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a la membrana

30 **[0097]** Las variaciones en el PRO52254 de secuencia nativa de longitud completa o en diversos dominios del PRO52254 descrito en este documento, pueden realizarse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservadoras y no conservadoras expuestas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos Nº 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones que codifican el PRO52254 que dan como resultado un cambio en la secuencia aminoacídica del PRO52254 en comparación con el PRO52254 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del PRO52254. La orientación para determinar qué resto aminoacídico puede insertarse, sustituirse o eliminarse sin afectar de forma adversa a la actividad deseada, puede encontrarse mediante la comparación de la secuencia del PRO52254 con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia aminoacídica realizados en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido que tenga una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadores. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia de forma sistemática y probando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

45  
50 **[0098]** Se proporcionan fragmentos del polipéptido PRO52254 en este documento. Dichos fragmentos pueden truncarse en el extremo N o C, o puede carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de restos aminoacídico que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO52254.

55 **[0099]** Los fragmentos de PRO52254 pueden prepararse por una pluralidad de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados pueden sintetizarse químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de PRO52254 mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para escindir proteínas en los sitios definidos por los restos aminoacídicos particulares, o mediante la

digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada más implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento polipeptídico deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos del polipéptido PRO52254 comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido PRO52254 nativo descrito en este documento.

**[0100]** En realizaciones particulares, las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 6 con el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 6, o como se describe a continuación en referencia a las clases de aminoácidos, y los productos se criban.

Tabla 6

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

**[0101]** Las modificaciones sustanciales en la identidad funcional o inmunológica del polipéptido PRO52254 se realizan mediante la selección de las sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o hélice, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los restos de origen natural se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de la cadena lateral:

- (1) hidrófobas: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilas neutra: cys, ser, thr;
- (3) ácidas: asp, glu;
- (4) básicas: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromáticas: trp, tyr, phe.

**[0102]** Las sustituciones no conservadoras comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos restos sustituidos también pueden introducirse en sitios de sustitución conservadora o, más preferentemente, en los sitios restantes (no conservados).

**[0103]** Las variaciones pueden realizarse usando procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina, y mutagénesis por PCR. Puede realizarse mutagénesis dirigida al sitio [Carter y col., Nucl. Acids. Res., 13: 4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids. Res., 10: 6487 (1987)], mutagénesis de casete [Wells y col., Gene, 34 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] u otras técnicas conocidas en el ADN clonado para producir el ADN variante de PRO52254.

**[0104]** También puede emplearse el análisis de aminoácidos por barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos están los aminoácidos pequeños y neutros. Dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. También se prefiere típicamente la alanina ya que es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones internas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isostérico.

#### C. Modificaciones de PRO52254

**[0105]** En este documento se dan a conocer las modificaciones covalentes de PRO52254. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos marcados de un polipéptido PRO52254 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los restos N- o C-terminales del PRO52254. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular PRO52254 en una superficie o matriz de soporte insoluble en agua para su uso en el procedimiento de purificación de anticuerpos anti-PRO52254, y viceversa. Entre los agentes de reticulación usados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo.

**[0106]** Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos de glutaminilo y asparaginilo para dar los restos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)], la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

**[0107]** Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO52254 incluida en esta divulgación comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. "Alteración del patrón de glicosilación nativo" para los fines de este documento pretende referirse a la eliminación de uno o más restos de carbohidratos hallados en el PRO52254 de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el PRO52254 de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, incluyendo un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos de carbohidratos presentes.

**[0108]** La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO52254 puede realizarse alterando la secuencia aminoacídica. La alteración puede realizarse, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución con, uno o más restos de serina o treonina al PRO52254 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia aminoacídica de PRO52254 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO52254 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

**[0109]** Otros medios para aumentar el número de restos de carbohidratos en el polipéptido PRO52254 son mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., págs. 259-306 (1981).

**[0110]** La eliminación de los restos de carbohidratos presentes en el polipéptido PRO52254 puede realizarse química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de los codones que codifican los restos aminoacídicos que actúan como dianas para la glicosilación. Se conocen técnicas de desglicosilación químicas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin, y col. Arch. Biochem. Biophys., 259: 52 (1987) y en Edge, y col. Anal. Biochem., 118: 131 (1981). La escisión enzimática de restos de carbohidratos del polipéptido puede conseguirse mediante el uso de una diversidad de endo- y exo-glicosidasas como se describe en Thotakura y col. Meth. Enzymol., 138: 350 (1987).

**[0111]** Otro tipo de modificación covalente de PRO52254 comprende la unión del polipéptido PRO52254 a uno entre una diversidad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxilalquilenos, de la manera expuesta en las Patentes de Estados Unidos N° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 5 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

**[0112]** El PRO52254 también puede modificarse de manera que forme una molécula quimérica que comprende PRO52254 condensado a otro polipéptido o secuencia aminoacídica heterólogos.

10 **[0113]** Una molécula quimérica de este tipo puede comprender una fusión del PRO52254 con un polipéptido marcador que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-marcador. El epítipo-marcador se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo del PRO52254. La presencia de dichas formas  
15 marcadas con epítipo del PRO52254 puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Además, la disposición del epítipo marcador permite que el PRO52254 se purifique fácilmente mediante purificación  
de afinidad usando un anticuerpo anti-marcador u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo marcador. En la técnica se conocen bien diversos polipéptidos marcadores y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se  
incluyen marcadores de poli-histidina (poli-his) o de poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido marcador HA de la gripe y su anticuerpo 12C45 [Field y col., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; el marcador de c-myc y los  
20 anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y el marcador de la glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein  
Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos marcadores se incluyen el péptido Flag [Hopp y col., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin y col., Science, 255: 192-194 (1992)]; un  
péptido epítipo de alfa-tubulina [Skinner y col., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido marcador de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

25 **[0114]** Una molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO52254 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada como "inmuno adhesina"), una fusión de este tipo podría ser a una región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones  
de Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado)  
30 de un polipéptido PRO52254 en lugar de al menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos N° 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995.

#### 35 D. Preparación de PRO52254

**[0115]** La descripción que se indica a continuación se refiere principalmente a la producción de PRO52254 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de PRO52254. Por supuesto, se prevé que puedan utilizarse procedimientos alternativos, que se conocen bien en la  
40 técnica, para preparar PRO52254. Por ejemplo, la secuencia de PRO52254, o partes de la misma, pueden producirse mediante síntesis directa de péptidos usando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewan y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede realizarse, por ejemplo, usando un Sintetizador de Péptidos de Biosistemas Aplicados (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Pueden sintetizarse  
45 químicamente diversas partes del PRO52254 de forma separada y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el PRO52254 de longitud completa.

##### 1. Aislamiento del ADN que Codifica PRO52254

50 **[0116]** El ADN que codifica PRO52254 puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO52254 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de PRO52254 humano puede obtenerse convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica PRO52254 también puede obtenerse a  
55 partir de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

**[0117]** Las bibliotecas se pueden explorar con sondas (tales como anticuerpos para el PRO52254 u oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la

proteína codificada por el mismo. La exploración del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede realizarse usando procedimientos convencionales, tal como se describe en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica PRO52254 es usar la metodología de PCR [Sambrook y col., anteriormente; Dieffenbach y col., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

- 10 **[0118]** Los Ejemplos que se indican a continuación describen técnicas para explorar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben tener una longitud suficiente y lo suficientemente inequívoca de forma que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido se marca preferentemente de manera que pueda detectarse tras la hibridación de ADN en la biblioteca que se está explorando. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radiomarcadores como ATP marcado con <sup>32</sup>P, biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la rigurosidad moderada y la rigurosidad elevada, se proporcionan en Sambrook y col., anteriormente.
- 15 **[0119]** Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de exploración de bibliotecas pueden compararse y alinearse a otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en las bases de datos públicas, tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácidos o nucleótidos) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa puede determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica y como se describen en este documento.
- 20 **[0120]** El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína puede obtenerse mediante la exploración del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas usando la secuencia aminoacídica deducida descrita en este documento por primera vez, y, si es necesario, usando procedimientos convencionales de extensión de cebadores como se describe en Sambrook y col., anteriormente, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

## 2. Selección y Transformación de Células Hospedadoras

- 30 **[0121]** Las células hospedadoras se transfectan o se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos en este documento para la producción de PRO52254 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, pueden seleccionarse por un experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden encontrarse en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., anteriormente.
- 40 **[0122]** Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, CaCl<sub>2</sub>, CaPO<sub>4</sub>, mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando las técnicas convencionales apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio que usa cloruro cálcico, como se describe en Sambrook y col., anteriormente, o electroporación se usa generalmente para las células procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, como describe Shaw y col., *Gene*, 23: 315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, puede emplearse el procedimiento de precipitación de fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células hospedadoras de mamíferos en la Patente de Estados Unidos N° 4.399.216. Las transformaciones en la levadura se realizan típicamente según el procedimiento de Van Solingen y col., *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros procedimientos para introducir ADN en las células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para conocer diversas técnicas para transformar células de mamífero, véase Keown y col., *Methods in enzymology*, 185:527-537 (1990) y Manssur y col., *Nature*, 336: 348-352 (1988).
- 50 **[0123]** Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de este documento incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Las procariotas adecuadas incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, enterobacteriáceas, tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* Ka12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y

K5772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariontas adecuadas incluyen enterobacteriáceas, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989),

5 *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferido ya que es una cepa hospedadora común para fermentaciones de producto de ADN recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al hospedador, incluyendo los ejemplos de

10 dichos hospedadores la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan<sup>r</sup>*; la cepa de *E. coli* W3110 37D6 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli*

15 que tiene la proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos N° 4.946.783 expedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

[0124] Además de los procariontas, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son

20 hospedadores de clonación o de expresión adecuados para los vectores que codifican PRO52254. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariótico inferior usado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos N° 4.943.529; Fleer y col., Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt y col.

25 J. Bacterial, 154(2): 737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8: 135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic. Microbiol. 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*,

30 tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538, publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y hospedadores *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn y col., Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Nelly y Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas

35 son adecuadas en este documento e incluyen, pero sin limitación, levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas entre el género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Puede encontrarse una lista de especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrrophs, 269 (1982).

40 [0125] Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de PRO52254 glicosilado se obtienen a partir de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Algunos ejemplos más

45 específicos incluyen línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (293 ó 293 células subclonadas para su crecimiento en cultivo de suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36: 59 (1977)); células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23: 243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula hospedadora apropiada se considera que está dentro las

50 capacidades del experto en la materia.

### 3. Selección y Uso de un Vector Replicable

[0126] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica PRO52254 puede insertarse en un

55 vector replicable para su clonación (amplificación del ADN) o para su expresión. Están disponibles públicamente diversos vectores. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o varios sitios de endonucleasa de restricción apropiados usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero sin limitación, una o más

secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligamiento convencionales que se conocen por un experto en la materia.

5 **[0127]** El PRO52254 puede producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el PRO52254 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, entre grupo de la  
10 fosfatasa alcalina, penicilinas, 1pp o líderes de enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, el líder del factor alfa (incluyendo líderes del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.010.182), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. Albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento WO 90/13646, publicado el 15 de noviembre de  
15 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como líderes secretores víricos.

**[0128]** Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que  
20 permite la replicación del vector en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una diversidad de bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayor parte de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2  $\mu$  es adecuado para la levadura, y diversos orígenes víricos varios (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos.

25 **[0129]** Los vectores de clonación y de expresión contendrán típicamente un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrezato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo,  
30 por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

**[0130]** Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la  
identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica PRO52254, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea celular de  
35 CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe en Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb y col., Nature, 282: 39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7: 141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-  
40 1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

**[0131]** Los vectores de clonación y de expresión contienen normalmente un promotor unido operativamente a la  
secuencia de ácido nucleico que codifica PRO52254 para dirigir la síntesis de ARNm. Se conocen promotores reconocidos por una diversidad de células hospedadoras potenciales. Los promotores adecuados para su uso con  
45 hospedadores procariotas incluyen los sistemas de promotores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa [Chang y col., Nature, 275: 615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281: 544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); documento EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)]. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica  
50 PRO52254.

**[0132]** Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen  
promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], tal como  
55 enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

**[0133]** Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una

transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras se describen  
5 adicionalmente en el documento EP 73.657.

**[0134]** La transcripción de PRO52254 a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos a partir de los genomas de virus, tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el  
10 virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

**[0135]** Puede incrementarse la transcripción de un ADN que codifica el PRO52254 por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, normalmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadoras a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, una secuencia usará un potenciador de un  
20 virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de PRO52254, pero se sitúa preferentemente en un sitio 5' del promotor.

**[0136]** Los vectores de expresión usados en las células hospedadoras eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles normalmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc  
30 eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica PRO52254.

**[0137]** Además, se describen otros procedimientos, vectores y células hospedadoras adecuados para su adaptación a la síntesis de PRO52254 en un cultivo celular de vertebrados recombinantes en Gething y col., Nature,  
35 293: 620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281: 40-46 (1979); el documento EP 117.060 y el documento EP 117.058.

#### 4. Detección de la Amplificación/Expresión Génica

**[0138]** La amplificación y/o expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante una transferencia Southern convencional, una transferencia de Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada correctamente, en base a las secuencias proporcionadas en este documento. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex  
45 específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos pueden marcarse y el ensayo puede realizarse cuando el dúplex está unido a una superficie, de manera que tras la formación del dúplex en la superficie, pueda detectarse la presencia de anticuerpos unidos al dúplex.

**[0139]** Alternativamente, la expresión génica puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse frente a un polipéptido PRO52254 de secuencia  
55 nativa o frente a un péptido sintético en base a las secuencias de ADN proporcionadas en este documento o frente a una secuencia exógena condensada a ADN de PRO52254 que codifica un epítipo de anticuerpo específico

#### 5. Purificación de Polipéptido



**[0140]** Las formas de PRO52254 pueden recuperarse del medio de cultivo o de los lisados de células hospedadoras. Si está unido a membrana, puede liberarse de la membrana usando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X 100) o mediante escisión enzimática. Las células utilizadas en la expresión de PRO52254 pueden interrumpirse mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclo congelación-descongelación, sonicación, interrupción mecánica o agentes de lisado celular.

**[0141]** Puede desearse purificar PRO52254 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; purificación por cromatografía sobre gel de sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatoforfoque; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefrosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas marcadas con epítipo del PRO52254. Pueden emplearse diversos procedimientos de purificación de proteína y dichos métodos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción usado y el PRO52254 particular producido.

#### 6. Distribución Tisular

**[0142]** La ubicación de tejidos que expresan el PRO52254 puede identificarse determinando la expresión de ARNm en diversos tejidos humanos. La ubicación de dichos genes proporciona información sobre que tejidos son más probables de verse afectados por las actividades de estimulación e inhibición de los polipéptidos PRO52254. La ubicación de un gen en un tejido específico también proporciona una muestra de tejido para los ensayos de bloqueo analizados a continuación.

**[0143]** Como se ha indicado anteriormente, la expresión génica en diversos tejidos puede medirse mediante una transferencia Southern convencional, una transferencia de Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205 [1980]), transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada correctamente, en base a las secuencias proporcionadas en este documento. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN, dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína.

**[0144]** Alternativamente, la expresión génica en diversos tejidos puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse frente a un polipéptido PRO52254 de secuencia nativa o frente a un péptido sintético en base a las secuencias de ADN proporcionadas en este documento o frente a una secuencia exógena condensada a ADN de PRO52254 que codifica un epítipo de anticuerpo específico. A continuación, se proporcionan técnicas generales para generar anticuerpos, y protocolos especiales para transferencia de Northern e hibridación *in situ*.

#### F. Estudios de Unión a Anticuerpos

**[0145]** La actividad de los polipéptidos PRO52254 puede verificarse adicionalmente por estudios de unión a anticuerpos, en los que se comprueba la capacidad de los anticuerpos anti-PRO52254 para inhibir el efecto de los polipéptidos PRO52254, respectivamente, sobre células tisulares. Los anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados, cuya preparación se describirá a continuación en este documento.

**[0146]** Los estudios de unión a anticuerpos pueden realizarse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos tipo sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, págs.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

**[0147]** Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito de la muestra de ensayo para la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se va a unir, los anticuerpos preferentemente se

insolubilizan antes o después de la competición, a fin de que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos pueda separarse convenientemente del patrón y el analito que todavía permanece sin unirse.

5 **[0148]** Los ensayos tipo sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una porción inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína que se va a detectar. En un ensayo tipo sándwich, el analito de la muestra de ensayo se une mediante un primer anticuerpo que se inmoviliza sobre un soporte sólido y, a partir de entonces, un segundo anticuerpo se une al analito, formando de este modo un complejo de tres partes insoluble. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.376.110. El segundo anticuerpo puede marcarse a sí mismo con un resto detectable (ensayos tipo sándwich directos) o puede medirse usando un anticuerpo anti-10 inmunoglobulina que se marca con un resto detectable (ensayo tipo sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso, el resto detectable es una enzima.

15 **[0149]** Para el ensayo de inmunohistoquímica, la muestra tisular puede estar recién preparada o congelada, o puede impregnarse en parafina y fijarse con un conservante, tal como, por ejemplo, formalina.

15 Anticuerpos dirigidos contra PRO52254

#### 1. Anticuerpos Policlonales

20 **[0150]** Los anticuerpos anti-PRO pueden comprender anticuerpos policlonales. Se conocen procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales por el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales pueden desarrollarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante inyecciones múltiples por vía subcutánea o intraperitoneal. El agente inmunizante puede incluir el polipéptido 25 PRO52254 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína conocida para que sea inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas incluyen, pero sin limitación, hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Los ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El 30 protocolo de inmunización puede seleccionarse por un experto en la materia sin excesiva experimentación.

#### 2. Anticuerpos monoclonales

35 **[0151]** Alternativamente, los anticuerpos dirigidos contra PRO52254 pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos en Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza típicamente un ratón, un hámster u otro animal hospedador apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. 40

45 **[0152]** El agente inmunizante incluirá típicamente el polipéptido PRO52254 o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica ("PLB") si se desean células de origen humano, o se usan esplenocitos o células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Después, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academia Press, (1986), págs. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son típicamente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Normalmente, se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células 50 inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

55 **[0153]** Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquéllas que se fusionan de manera eficaz, soportan un nivel de expresión elevado estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT.

**[0154]** Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que pueden obtenerse, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la Colección Americana de Cultivos

Tipo, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) págs. 51-63].

5

**[0155]** Después, el medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan puede ensayarse para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al PRO52254. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo

10

inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Poliard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

15

**[0156]** Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse limitando los procedimientos de dilución y pueden desarrollarse mediante procedimientos convencionales [Goding, anteriormente]. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden desarrollarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

20

**[0157]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido de ascitis mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-seferosa, purificación por cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

25

**[0158]** Los anticuerpos monoclonales también pueden fabricarse mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la divulgación puede aislarse fácilmente y secuenciarse usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la divulgación sirven como una

30

fuente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN puede situarse en vectores de expresión, que después se transfectan en células hospedadoras, tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de ningún modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las

35

secuencias homólogas murinas [Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison y col., anteriormente] o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina. Dicho polipéptido de no inmunoglobulina puede sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo de la divulgación, o puede sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la divulgación para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

40

**[0159]** Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Se conocen bien en la técnica procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los restos de cisteína

45

pertinentes se sustituyen con otro resto aminoacídico o se eliminan para evitar la reticulación.

**[0160]** Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, puede realizarse utilizando técnicas rutinarias conocidas en la técnica.

50

### 3. Anticuerpos Humanos y Humanizados

**[0161]** Los anticuerpos dirigidos contra PRO52254 pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son

55

inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima obtenida a partir de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se reemplazan por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donador), tal como ratón, rata o conejo

que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos flanqueantes de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los restos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o las secuencias flanqueantes. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de forma óptima al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2: 593-596 (1992)].

**[0162]** Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos aminoacídicos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos restos aminoacídicos no humanos se denominan a menudo como restos "importados", que se adquieren típicamente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDR o secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567), en los que sustancialmente se ha sustituido menos de un dominio variable intacto humano por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos restos de CDR y posiblemente algunos restos de FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

**[0163]** Los anticuerpos humanos también pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo las bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cole y col. y Boerner y col. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner y col., J. Immunol., 147(1): 86-95 (1991)]. De forma similar, los anticuerpos humanos pueden fabricarse mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena se han inactivado parcial o completamente. Tras la estimulación, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece estrechamente a los observados en humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., Bio/Technology 10, 779-783 (1992); Lonberg y col., Nature 368, 856-859 (1994); Morrison, Nature 368, 812-13 (1994); Fishwild y col., Nature Biotechnology 14, 845-51, (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13, 65-93 (1995).

**[0164]** Los anticuerpos también pueden madurarse por afinidad usando procedimientos de selección y/o mutagénesis conocidos como se ha descrito anteriormente. Los anticuerpos maduros de afinidad tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, incluso más preferentemente 20 ó 30 veces mayor que la del anticuerpo de partida (generalmente murino, humanizado o humano) a partir del cual se prepara el anticuerpo maduro.

45

#### 4. Anticuerpos Biespecíficos

**[0165]** Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el PRO52254, la otra es para cualquier otro antígeno, y preferentemente para una proteína o receptor o subunidad del receptor de la superficie celular.

**[0166]** Se conocen en la técnica procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en las que las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Millstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]. Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se realiza normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad. En el documento WO 93/08829, publicado el

13 de mayo de 1993, y en Traunecker y col., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991) se describen procedimientos similares.

**[0167]** Los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden condensarse a secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. La fusión preferentemente es con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, CH2, y regiones CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedador adecuado. Para obtener más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

**[0168]** Según otro enfoque descrito en el documento WO 96/27011, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte de la región de CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar al de la cadena o las cadenas laterales grandes se crean en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando cadenas laterales grandes de aminoácidos por unas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

**[0169]** Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>). Se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando uniones químicas. Brennan y col., Science 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que los anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Después, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de nitrobenzoato (TNB). Después, uno de los derivados de Fab'-TNB se convierte de nuevo en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden usarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

**[0170]** Los fragmentos Fab' pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado F(ab')<sub>2</sub>. Cada fragmento de Fab' se secretó de forma separada de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. Dicho anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que expresaban en exceso el receptor ErbB2 y los linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos frente a dianas de tumores de mama humanos.

**[0171]** También se han descrito diversas técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol. 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se oxidaron de nuevo para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este procedimiento también puede usarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub> complementarios de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenario (sFv). Véase, Gruber y col., J. Immunol. 152: 5368 (1994). Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147: 60 (1991).

**[0172]** Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítomos diferentes en un polipéptido PRO52254 determinado en este documento. Alternativamente, un brazo de polipéptido anti-PRO52254 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante en un leucocito, tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores Fc para IgG (Fc $\gamma$ R), tales como Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16) para centrar los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el polipéptido PRO52254 particular. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos en células que expresan un polipéptido PRO52254 particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a PRO52254 y un brazo que se une a un agente citotóxico o un radionúcleo quelante, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al polipéptido PRO52254 y además se une al factor tisular (TF).

#### 5. Anticuerpos Heteroconjugados

**[0173]** Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos N° 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [documentos WO 91/00360; WO 92/300373; EP 03089]. Se considera que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter.

Los ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

**[0174]** Las proteínas de superficie celular, tales como proteínas que se expresan en exceso en ciertas enfermedades inmunorelacionadas, son dianas excelentes para candidatos de fármacos o el tratamiento de enfermedades. Las mismas proteínas junto con proteínas secretadas codificadas por los genes amplificadas en las patologías inmunorelacionadas encuentran un uso adicional en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos dirigidos frente a los productos de proteínas de genes amplificadas en la esclerosis múltiple, artritis reumatoide u otras enfermedades inmunorelacionadas como diagnósticos o pronósticos.

**[0175]** Por ejemplo, pueden usarse anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, para detectar cualitativamente o cuantitativamente la expresión de proteínas codificadas por genes amplificadas o expresada en excesos ("productos génicos marcadores"). El anticuerpo preferentemente se equipa con un elemento detectable, por ejemplo, un marcador detectable, y la unión puede controlarse por microscopia de luz, citometría de flujo, fluorimetría u otras técnicas conocidas en la técnica. Estas técnicas son particularmente adecuadas, si el gen expresada en exceso codifica una proteína de superficie celular. Dichos ensayos de unión se realizan básicamente como se ha descrito anteriormente.

**[0176]** La detección *in situ* de la unión del anticuerpo con los productos génicos marcadores puede realizarse, por ejemplo, por inmunofluorescencia o microscopia de inmunoelectrones. Para este fin, se elimina un espécimen histológico del paciente, y se aplica al mismo un anticuerpo marcado, preferentemente superponiendo el anticuerpo en una muestra biológica. Este procedimiento también permite determinar la distribución del producto génico marcador en el tejido examinado. Será evidente para los expertos en la materia que están disponibles una amplia variedad de procedimientos histológicos para realizar la detección *in situ*.

**[0177]** Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

#### Ejemplos

**[0178]** Los reactivos disponibles en el mercado a los que se hace referencia en los ejemplos se usaron según las instrucciones del fabricante a menos de que se indicara otra cosa. La fuente de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de toda la memoria descriptiva, por los números de acceso de la ATCC es la Asociación Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA.

Ejemplo 1: Clonación de PRO52254

**[0179]** Se buscó una base de datos de ADN de marcadores de secuencia expresada (EST) (Merck/Washington University) y se identificó un EST que contenía dominios de interés, específicamente uno o más dominios de inmunoglobulina (Ig) y uno o más motivos de inhibición basados en inmuno tirosina (ITIM). La búsqueda se realizó

usando el programa de ordenador BLAST o BLAST2 [Altschul y col., Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996)] usando como comparación los dominios de interés en una traducción de 6 marcos de lectura de las secuencias. Las comparaciones que dieron como resultado una puntuación BLAST de 70 (o en algunos casos, 90) o mayor que no codificó proteínas conocidas se agruparon y, cuando fue necesario, se recopilaron en secuencia de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

**[0180]** En base a la secuencia que se ha descrito anteriormente, los oligonucleótidos se sintetizaron: 1) para identificar por PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de la secuencia codificante de longitud completa para PRO52254. Los cebadores directos e inversos varían generalmente de 20 a 30 nucleótidos, y a menudo se diseñan para dar un producto de PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias sonda tienen típicamente de 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan más oligonucleótidos cuando la secuencia consenso es mayor de aproximadamente 1-1,5 kpb. Para explorar varias bibliotecas para un clon de longitud completa, el ADN de las bibliotecas se exploró por amplificación de PCR, como por Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, anteriormente, con el par cebador de PCR. Después, se usó una biblioteca positiva para aislar los clones que codificaban el gen de interés usando el oligonucleótido sonda y uno de los pares de cebadores.

**[0181]** Las sondas de oligonucleótidos empleadas fueron las que se indican a continuación:

20 5' CGTCCTATCTGCAGTCGGCTACTTTCA 3' (cebador directo) (SEQ ID NO: 5)  
5' CCAGAAGATGCCTCTGGTTGCTAACCA 3' (cebador inverso) (SEQ ID NO: 6)

**[0182]** Se usó un conjunto de 50 bibliotecas de ADNc humano diferentes de diversos tejidos para la clonación. Las bibliotecas de ADNc usadas para alisar los clones de ADNc se construyeron mediante procedimientos convencionales usando reactivos disponibles en el mercado, tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se preparó con oligo dT que contenía un sitio NotI, se unió por extremos romos a adaptadores de hemiquinasa de Sall, se escindió con NotI, se midió su tamaño apropiadamente por electroforesis en gel y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio de Sfil; véase, Holmes y col., Science, 253: 1278-1280 (1991)) en los sitios únicos de XhoI y NotI.

**[0183]** La secuencia nucleotídica completa del clon, denominada en este documento como DNA327145, se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). El clon DNA327145 contiene una fase de lectura abierta con un sitio de iniciación de la traducción evidente en los posiciones 77-79 del nucleótido y una señal de detención en las posiciones 809-811 del nucleótido (Figura 1, SEQ ID NO: 1). El precursor de polipéptido predicho tiene una longitud de 244 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 26318,98 daltons y un pI de aproximadamente 5,71. El análisis de la secuencia de PRO52254 de longitud completa mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2) manifiesta la presencia de una diversidad de dominios polipeptídicos importantes como se muestra en la Figura 2, en los que las ubicaciones proporcionadas por los dominios polipeptídicos importantes se aproximan a las que se han descrito.

**[0184]** Un análisis de la base de datos de proteínas actual, usando el análisis de alineamiento de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa mostrado en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), manifestó una identidad de secuencia entre la secuencia aminoacídica de PRO52254 y secuencias de proteínas no conocidas.

**[0185]** Usando la secuencia humana de PRO52254 se buscó una base de datos murina para secuencias homólogas. Se diseñaron oligonucleótidos frente a estos homólogos putativos y se sondearon bibliotecas de ADNc murino por PCR. Después, se usó una librería positiva para aislar clones que codificaban el gen de interés usando el oligonucleótido sonda y uno de los pares de cebadores.

**[0186]** Las sondas de oligonucleótidos empleadas fueron las que se indican a continuación:

5' CAGGACCAGCTTCTGGCCATTTATAGTGT 3' (cebador directo) (SEQ ID NO: 7)  
5' CTGCTTCCAGTCGACTTGGGTCACCTT 3' (cebador inverso) (SEQ ID NO: 8)  
5' CCTGGTGGGATTTACAAGGGGAGAATATTCCTGAAGGTCCAAGAAA 3' (sonda) (SEQ ID NO: 9)

El homólogo MURINO de longitud completa de PRO52254 se clonó y a este clon se le dio la denominación PRO71302 para la secuencia polipeptídica y DNA327512 para la secuencia nucleotídica. La secuencia nucleotídica completa del clon, denominada en este documento como DNA327512, se muestra en la

Figura 3 (SEQ ID NO: 3). El clon de ADN contiene una fase de lectura abierta sencilla con un sitio de iniciación de traducción evidente en las posiciones 60-62 del nucleótido y una señal de detención en las posiciones 783-785 del nucleótido (Figura 3, SEQ ID NO: 3). El precursor polipeptídico predicho tiene una longitud de 241 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 26088,51 daltons y un pl estimado de aproximadamente 5,12. El análisis de la secuencia de PRO de longitud completa mostrado en la Figura 4 (SEQ ID NO: 4) manifiesta la presencia de una diversidad de dominios polipeptídicos importantes como se muestra en la Figura 4, en los que las ubicaciones proporcionadas por los dominios polipeptídicos importantes se aproximan a las que se han descrito.

**[0187]** Un análisis de la base de datos de proteínas actual, usando el análisis de alineamiento de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa mostrada en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), manifestó una identidad de secuencia entre la secuencia aminoacídica de PRO71302 y secuencias de proteínas no conocidas.

#### Ejemplo 2: Análisis de micromatrices de linfocitos T estimulados

**[0188]** Las micromatrices de ácidos nucleicos, que a menudo contienen miles de secuencias génicas, son útiles en la identificación de genes expresados diferencialmente en tejidos enfermos en comparación con sus homólogos normales. Usando micromatrices de ácidos nucleicos, muestras de ensayo y de control de ARNm de muestras de tejido de ensayo y de control se transcribieron de forma inversa y se marcaron para generar sondas de ADNc. Después, las sondas de ADNc se hibridaron para dar un matraz de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. El matraz se configura de modo que la secuencia y la posición de cada miembro del matraz se conozca. Por ejemplo, una selección de genes que se conoce que va a expresarse en ciertas patologías puede disponerse sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de matriz particular indica que la muestra a partir de la cual se obtuvo la sonda expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda de una muestra de ensayo (en este caso, linfocitos T CD4+ activados) es mayor que la señal de hibridación de una sonda de una muestra de control (en este caso, linfocitos T CD4+ no estimulados), se identifican el gen o los genes expresados en exceso en el tejido de ensayo. La implicación de este resultado es que una proteína expresada en exceso en un tejido de muestra es útil no solo como un marcador diagnóstico para la presencia de la afección, sino también como una diana terapéutica para el tratamiento de la afección.

**[0189]** La metodología de hibridación de ácidos nucleicos y la tecnología de micromatrices se conoce bien en la técnica. En un ejemplo, la preparación específica de ácidos nucleicos para hibridación y las sondas, platinas de los microscopios y las condiciones de hibridación se detallan en la Solicitud de Patente PCT N° de Serie PCT/US01/10482, presentada el 30 de marzo de 2001 y que se incorpora en este documento por referencia.

**[0190]** En este experimento, los linfocitos T CD4+ se purificaron a partir de un único donante usando el protocolo RossetteSep™ (de Stem Cell Technologies, Vancouver BC) que contenía los anticuerpos dirigidos contra CD8, dirigidos contra CD16, dirigidos contra CD19, dirigidos contra CD36 y dirigidos contra CD56 usados para producir una población de linfocitos T CD4+ aislados. Los linfocitos T CD4+ aislados se activaron con un anticuerpo dirigido contra CD3 (usado a una concentración que no estimulaba proliferación) junto con ICAM-1 o el anticuerpo dirigido contra CD28. A las 24 o 72 horas, las células se cultivaron, se extrajo el ARN y se realizó el análisis en micromatrices Affimax™ (Affymetrix Inc. Santa Clara, CA). Las células no estimuladas (en reposo) se cultivaron inmediatamente después de la purificación y se sometieron al mismo análisis. Los genes se compararon, cuya expresión se reguló por aumento en cualquier de los dos puntos de tiempo en las células activadas frente a las células en reposo.

**[0191]** El resultado de estos experimentos, es que los polipéptidos PRO52254 de la presente divulgación se expresan en exceso de forma significativa en los linfocitos T CD4+ aislados activados por anti-CD3/ICAM-1 y anti-CD3/anti-CD28 en comparación con los linfocitos T CD4+ aislados en reposo. Como se ha descrito anteriormente, estos datos demuestran que los polipéptidos PRO52254 de la presente divulgación son útiles no solo como marcadores diagnósticos para la presencia de uno o más trastornos inmunes, sino que también sirve como dianas terapéuticas para el tratamiento de trastornos inmunes.

#### Ejemplo 3: Análisis de micromatrices de PRO52254 en Psoriasis

**[0192]** Se obtuvieron biopsias de piel de pacientes psoriásicos y de donantes sanos. Para cada paciente psoriásico, se tomaron muestras de piel de zonas afectadas y no afectadas. Todas las muestras de piel psoriásica se analizaron por tinción de queratina 16 a través de inmunohistoquímica y espesor epidérmico. Todas las muestras se almacenaron a -70°C hasta que estuvieron lista para someterse a aislamiento de ARN. Las biopsias de la piel se homogeneizaron en 600 µl de tampón RLT.



**[0193]** Se aisló (+ BME) y RNA usando columnas Qiagen™ Rneasy Mini (Qiagen) con tratamiento de ADNasa en columna siguiendo las directrices del fabricante. Tras el aislamiento de ARN, el ARN se cuantificó usando RiboGreen™ (Molecular Probes) siguiendo las directrices del fabricante y comprobando su integridad sobre gel de agarosa. Los rendimientos de ARN variaron de 19 a 54 µg para piel lesionada psoriásica, de 7,7 a 24 µg para piel de control apareada no lesionada y de 5,4 a 10 µg para piel normal. Se marcaron 4 µg de ARN para el análisis de micromatrices.

**[0194]** Las biopsias se obtuvieron a partir de piel lesionada y no lesionada de 11 pacientes psoriásicos para identificar los genes específicos de la enfermedad que se expresan de forma diferente en el tejido psoriásico. La piel normal de 6 donantes no psoriásicos también se obtuvo con fines comparativos. Para evaluar los perfiles de expresión génica en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de los mismos pacientes psoriásicos, se obtuvo la sangre y las PBMC se aislaron. Las PBMC de 16 donantes no psoriásicos también se obtuvieron para fines comparativos. El ARN aislado de la piel y las PBMC se hibridaron en micromatrices Affymetrix (que representaban aproximadamente 33.000 genes), así como en micromatrices propiedad de Genentech. Se identificaron alteraciones estadísticamente significativas en la expresión génica (más de 2 veces) en las muestras de piel lesionada frente a la no lesionada y normal y en las PBMC de pacientes normales y afectados por psoriasis. El resultado de este experimento es que PRO52254 se expresa en cantidades superiores en sangre psoriásica que en sangre normal. La identificación de genes expresados de forma diferente en piel lesionada y no lesionada y las PBMC de psoriásicos puede facilitar el entendimiento de la patogénesis de esta enfermedad a nivel molecular y conducir al descubrimiento de nuevos tratamientos terapéuticos para la psoriasis y otras dianas de enfermedades autoinmunes. Por lo tanto, los antagonistas de PRO52254 serán útiles en la mejora de la psoriasis.

#### Ejemplo 4: PRO52254 en Enfermedad Inflamatoria Intestinal

**[0195]** En este experimento, se usó un ensayo de micromatrices para encontrar genes que se expresen en exceso en la EII en comparación con tejidos intestinales normales. Se obtuvieron biopsias de pacientes con EII. De cada paciente con EII, se tomaron muestras del tejido de su enfermedad (CU o Crohn) y de intestino sano, a fin de que los patrones de expresión puedan compararse mejor. Todas las muestras se almacenaron a -70°C hasta que estuvieron listas para el aislamiento de ARN. Las biopsias se homogeneizaron en 600 µl tampón RLT (+ BME) y el ARN se aisló usando columnas Qiagen™ Rneasy Mini (Qiagen) con tratamiento de ADNasa en columna siguiendo las directrices del fabricante. Después del aislamiento del ARN, el ARN se cuantificó usando RiboGreen™ (Molecular Probes) siguiendo las directrices del fabricante y se comprobó su integridad sobre geles de agarosa. Se marcaron cantidades apropiadas de ARN para su análisis por micromatrices y se realizaron muestras en micromatrices propiedad de Genentech y micromatrices Affymetrix™. Se compararon los genes cuya expresión se reguló por aumento en tejido de EII frente a intestino normal, emparejando las biopsias del intestino normal y el tejido de EII del mismo paciente. Los resultados de este experimento mostraron que se había identificado PRO52254 expresada en exceso de forma significativa en muestras de EII en comparación con tejido intestinal normal.

#### Ejemplo 5: Expresión de PRO52254 en células NK

**[0196]** Las células asesinas naturales (NK) son una célula efectora importante del sistema inmune innato. Se especializan en tener un efecto letal frente a células hospedador que se han infectado por virus, parásitos o que se han vuelto cancerosas. Fenotípicamente, las células NK son linfocitos grandes granulosos que constituyen ~2% de la población de linfocitos circulantes. Se identifican comúnmente por una expresión superficial celular de CD56 y CD16. Maduran en la médula ósea de una célula precursora CD34+ que comparten con linfocitos T. La célula NK madura, comprende la expresión de CD8, maquinaria citolítica y algunos KIR, con linfocitos T, pero permanecen distintos de los linfocitos T por la pérdida de CD3 y los receptores de linfocitos T. Al igual que los linfocitos T citotóxicos, contienen gránulos cargados con proteínas de formación de poro, citotoxinas, serina esterasas y proteoglicanos que median la lisis de células diana. Tanto los linfocitos T citotóxicos como las células NK destruyen al entrar en contacto mediante la unión a sus dianas y la entrega de su estallido letal de productos químicos que produce orificios en la membrana de las células diana. A diferencia de los linfocitos T citotóxicos, las células NK no necesitan reconocer un antígeno específico antes de iniciar la lisis. Por el contrario, la activación de las células NK puede medirse por factores de crecimiento y citocinas (en particular, se ha mostrado que IL-2, IL-12 y IL-15 median actividades proliferativas y citotóxicas) o mediante un equilibrio delicado entre dos clases de receptores de células NK, uno que activa las células, y el otro que las inhibe. Los receptores asesinos similares a Ig (KIR) son receptores de células NK que transmiten una señal inhibitoria si se encuentran moléculas MHC de clase I sobre una superficie celular. Esto es importante para la destrucción de tanto células cancerosas como células infectadas por virus. Debido a que los virus a menudo suprimen la expresión de MHC de clase I en las células que infectan, la célula infectada con el virus se

vuelve susceptible para su destrucción por células NK. Asimismo, las células cancerosas ha reducido o no la expresión de MHC de clase I y además, se vuelven susceptibles de destruirse por células NK. Los receptores de citotoxicidad naturales (NCR) constituyen una familia de receptores de activación en células NK. En algunos sistemas efector-diana, la densidad superficial de los NCR se correlaciona con la actividad citolítica de las células NK, mientras que en otros sistemas la destrucción requiere la cooperación entre NCR, otro receptor de activación NKG2D y su polipéptido adaptador DAP10. Adicionalmente, la fuerza de las señales puede verse influenciada por acoplamiento de correceptores, tales como 2B4 y NTB-A. Los ligandos para NCR y NKG2D, hemoglutininas y MICA, MICB respectivamente no se expresan por las células más normales, pero se inducen en las líneas celulares más tumorales. La expresión de los ligandos por células tumorales activa una respuesta inmune dramática dando como resultado el rechazo de la célula tumoral. Se ha demostrado que la activación de las células NK con IL-15 o IL-12 induce tanto efectos citotóxicos como proliferativos. Se ha mostrado que la molécula de adhesión de unión 2 (JAM2) se une a células NK y se ha planteado la hipótesis de que juegue un papel en la extravasación de linfocitos a los sitios de inflamación.

15 **[0197]** Por lo tanto, un experimento de micromatrices de ADN que compara la expresión diferencial de genes de estos tres modos de activación frente a las células NK en reposo tiene el potencial de revelar nuevos genes o nuevas asociaciones génicas con la actividad de células NK. Pueden desarrollarse anticuerpos terapéuticos, péptidos o moléculas pequeñas para dirigir genes específicos revelados por estas micromatrices para el tratamiento enfermedades inflamatorias mediadas por mecanismos inmunes y tumores malignos. Se aislaron células NK de sangre periférica a partir de paquetes leucocitarios por selección negativa usando el kit de aislamiento de células NK con el sistema de clasificación de células magnéticas MACS™ (Miltenyi Biotec). La pureza celular se confirmó por tinción con PE anti-CD56 para análisis FACS. La pureza de las prep. celulares varió del 89% al 96%. Cultivo celular: Cultivos configurados *in vitro* en placas de 6 pocillos de 5 ml de cultivos/pocillo. Medio: RPMI 1640, FBS al 10% inactivado térmicamente, 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomycin, 2 mM de L-glutamina, y 5,5 x 25 10<sup>-5</sup> de Beta-mercaptoetanol. Tratamientos experimentales: Tiempo 0 h, Células CD56(+) no tratadas. Tiempo 16 h. Se estimuló IL2 (10 nM), IL15 (10 nM), JAM-IT (10 nM) no tratados. La activación de las células NK se controló por FACS para observar la expresión de la superficie celular de CD56 y CD69. En esta serie de experimentos, se determinó que PRO52254 se expresa tanto en células NK en reposo como activadas, pero la expresión no aumenta significativamente tras la estimulación que se ha descrito anteriormente.

30 Ejemplo 6: Expresión de PRO52254 en linfocitos T de memoria CD45RO+.

**[0198]** Los linfocitos T juegan una función central en la defensa del hospedador. Los linfocitos T son capaces de modular la respuesta inmune de otros linajes celulares a través de la producción de una diversidad de citocinas y moléculas inmunomoduladoras. Además, son las responsables de la supervivencia de las células por todo el organismo por la presencia de no propias. Este procedimiento altamente sofisticado utiliza el receptor de linfocitos T (TCR), que es capaz de reconocer y discriminar entre péptidos propios y no propios mostrados por el complejo MHC en otras células. Este procedimiento también integra señales coestimuladoras que proporcionan información adicional al linfocito T sobre la naturaleza de la amenaza potencial no propia. Estas dos señales, la señal TCR y la señal coestimuladora puede activarse de forma experimental por el uso de anticuerpos agonistas, tales como ciertos anticuerpos con respecto al componente de receptor de linfocitos T CD3, y el receptor coestimulador CD28. Aunque los linfocitos T son componentes básicos de la función inmune, se cree que la función inapropiada de los linfocitos T subyace en muchas dolencias médicas graves, incluyendo enfermedad autoinmune. Se cree que las enfermedades que se ven afectadas por la función de los linfocitos T patológicos incluyen asma, artritis, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal, diabetes, enfermedad injerto contra huésped y muchas otras. En estas enfermedades, se cree que la parte del repertorio de linfocitos T que tiene un fenotipo de "memoria" contribuye con la patología de la enfermedad. Por lo tanto, es de gran importancia entender los acontecimientos moleculares que suceden tras la activación de los linfocitos T de memoria. En los seres humanos, los linfocitos T de memoria pueden identificarse a través del uso del antígeno CD45RO que se expresa en linfocitos T de memoria pero no en linfocitos T en reposo vírgenes. El uso de micromatrices de ADN proporciona un potente enfoque experimental para identificar cambios moleculares que suceden tras la activación de esta población celular crítica. El entendimiento de la identidad de las moléculas cuya expresión se altera tras la activación de los linfocitos T de memoria puede permitir estrategias terapéuticas que se dirigen a las rutas impactadas por estas alteraciones en la expresión génica. Dichas estrategias terapéuticas pueden incluir el uso de proteínas recombinantes, receptores solubles, anticuerpos, péptidos o fármacos de molécula pequeña.

**[0199]** Se obtuvieron 100 ml de sangre recién extraída de donantes. Se aisló PBMC con LSM (ficol) (ICN Biomedicals) por separación de gradiente en etapas. Los monocitos se agotaron por adherencia al matraz de cultivo. Las células altas en CD45 RA y CD45 RO se clasificaron por FACS con apertura adicional en los linfocitos por

- dispersión hacia delante y lateral. Las células de expresión intermedia de CD45RA o CD45 RO no se recogieron. La clasificación se verificó sometiendo de nuevo a FACS las muestras de la población clasificada y se descubrió que estaban clasificadas correctamente aproximadamente el 99%. Las células durante 16 horas en RPMI 1640, FBS inactivado térmicamente al 10%, 100 unidades/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomina, 2 mM de L-glutamina e IL-2 (100 U/ml) y la presencia o ausencia de una placa unida a anti-CD3 (10 ug/ml) y anti-CD28 soluble (10 ug/ml).
- 5 El estado de activación de las células se controló por FACS para observar la expresión superficial celular de CD69 y CD25. A las 24 ó 72 horas, las células se recogieron, se extrajo el ARN por Qiagen™ miniprep y se realizó un análisis con micromatrices (Affymetrix Inc. Santa Clara, CA) y con micromatrices propiedad de Genentech. Las células no estimuladas (en reposo) se recogieron inmediatamente después de la purificación, y se sometieron al mismo análisis. Se compararon los genes cuya expresión se reguló en ascendente en cualquiera de los dos puntos de tiempo en células activadas frente en reposo, y se descubrió que PRO52254 se expresa en linfocitos T de memoria CD45RO+ tanto en el estado en reposo como activado, y la expresión de PRO52254 no se eleva tras la estimulación que se ha descrito anteriormente.
- 10
- 15 **Ejemplo 7: Uso de PRO52254 como una sonda de hibridación**
- [0200]** El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia nucleotídica que codifica PRO52254 como una sonda de hibridación.
- 20 **[0201]** El ADN que comprende la secuencia codificante PRO52254 de longitud completa o madura como se describe en este documento se emplea como una sonda para explorar los ADN homólogos (tales como los que codifican variantes de origen natural de PRO52254) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.
- 25 **[0202]** La hibridación y el lavado de los filtros que contienen cualquier biblioteca de ADN se realizan según las siguientes condiciones de alta rigurosidad. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada de PRO a los filtros se realiza en una solución de formamida al 50%, 5 x de SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato sódico al 0,1%, 50 mM de fosfato sódico, pH 6,8, 2 x de solución de Denhardt y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1 x de SSC y SDS al 0,1% a 42°C.
- 30 **[0203]** Después, pueden identificarse los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifica el PRO52254 de secuencia nativa de longitud completa usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.
- 35 **Ejemplo 8: Expresión de PRO52254 en *E. Coli***
- [0204]** Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de PRO52254 mediante expresión recombinante en *E. coli*.
- 40 **[0205]** La secuencia de ADN que codifica PRO52254 se amplifica inicialmente usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que se correspondan con los sitios de enzimas de restricción del vector de expresión seleccionado. Pueden emplearse una diversidad de vectores de expresión. Un ejemplo de vector adecuado es pBR322 (obtenido a partir de *E. coli*, véase Bolivar y col., Gene, 2: 95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se desfosforila. Después, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector incluirá preferentemente secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor trp, un líder polihis (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia polihis, y sitio de escisión de la enteroquinasa), la región codificante de PRO52254, el terminador transcripcional lambda y un gen argU.
- 45
- 50 **[0206]** Después, la mezcla de ligadura se usa para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* usando los procedimientos descritos en Sambrook y col., anteriormente. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y después se seleccionan las colonias resistentes a antibióticos. El ADN del plásmido puede aislarse y confirmarse mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.
- 55 **[0207]** Los clones seleccionados pueden desarrollarse durante una noche en un medio de cultivo líquido, tal como el caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche puede usarse posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. Después, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante lo cual el promotor de la expresión se activa.

**[0208]** Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células pueden recogerse mediante centrifugación. El sedimento de células obtenido mediante la centrifugación puede solubilizarse usando diversos agentes conocidos en la técnica y después la proteína PRO52254 solubilizada puede purificarse usando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión firme de la proteína.

5

**[0209]** El PRO52254 puede expresarse en *E. coli* en forma de marcador poli-His, usando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica PRO52254 se amplifica inicialmente usando los cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzimas de restricción que corresponden con los sitios de enzimas de restricción del vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan una iniciación de la traducción eficaz y fiable, una purificación rápida en una columna quelante de metal, y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Después, las secuencias marcadas de poli-His amplificadas por PCR se ligan en un vector de expresión que se usa para transformar un hospedador *E. coli* en base a la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se cultivan en primer lugar en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta alcanzar una D.O.600 de 3-5. Después, los cultivos se diluyen 50-100 veces en un medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,71 g de citrato sódico·2H<sub>2</sub>O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como 110 mM de MPOS, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y 7 mM de MgSO<sub>4</sub>) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se retiraron para verificar la expresión mediante un análisis SDS-PAGE, y el volumen del cultivo se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos de las células se congelan hasta la purificación y el repliegue.

**[0210]** La pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (sedimentos de 6-10 g) se suspenden de nuevo en 10 volúmenes (p/v) de 7 M de guanidina, 20 mM de Tris y tampón de pH 8. Se añade sulfito sódico sólido y tetratiónato sódico para hacer que las concentraciones finales sean de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante una noche a 4°C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en un Ultracentrifugador Beckman durante 30 minutos. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante de metal (6 M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrómetros para su aclarado. El extracto aclarado se carga en una columna quelante de metal Quiagen Ni-NTA de 5 ml equilibrada con el tampón de columna quelante de metal. La columna se lava con un tampón adicional que contiene 50 mM de imidazol (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con un tampón que contiene 250 mM de imidazol. Las fracciones que contienen la proteína de interés se combinan y se almacenan a 4°C. La concentración de la proteína se estima por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia aminoacídica.

**[0211]** Las proteínas se repliegan mediante la dilución lenta de la muestra en tampón de repliegue recién preparado que consiste en: 20 mM de Tris, pH 8,6, 0,3 M de NaCl, 2,5 M de urea, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina y 1 mM de EDTA. Los volúmenes de repliegue se escogen de manera que la concentración final de proteína esté entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de repliegue se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de repliegue se interrumpe la adición de TFA hasta una concentración final del 0,4% (pH de aproximadamente de 3). Antes de purificar de nuevo la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrómetros y se añade acetonitrilo hasta una concentración final del 2-10%. La proteína replegada se somete a cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H usando un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución en un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Las alícuotas de fracciones con una absorbancia A280 se analizan en geles de poliacrilamida SDS y las fracciones que contienen proteína replegada homogénea se combinan. Generalmente, las especies replegadas correctamente de la mayor parte de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que esas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de solucionar las formas desplegadas de proteínas de la manera deseada, la etapa de la fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

50

**[0212]** Las fracciones que contienen el polipéptido PRO52254 plegado deseado se combinan y el acetonitrilo se elimina usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en 20 mM de Hepes, pH 6,8 con 0,14 M de cloruro sódico y manitol al 4% por diálisis o por filtración en gel usando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas estériles.

55

**[0213]** Los polipéptidos PRO52254 descritos en este documento se expresaron de forma satisfactoria como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 9: Expresión de PRO52254 en células de mamíferos

**[0214]** Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de PRO52254 mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

5 **[0215]** El vector pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989) se emplea como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de PRO52254 está ligado en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO52254 usando procedimientos de ligamiento tales como los descritos en Sambrook y col., anteriormente. El vector resultante se denomina pRK5-PRO52254.

10 **[0216]** En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan para unirse en placas de cultivo tisular en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-PRO52254 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de

15 EDTA y 0,227 M de CaCl<sub>2</sub>. A esta mezcla se le añaden gota a gota 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO<sub>4</sub>, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se retira por aspiración y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. Después, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio recién preparado y las células se incuban durante aproximadamente 5  
20 días.

**[0217]** Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se elimina y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de <sup>35</sup>S-cisteína y 200 µCi/ml de <sup>35</sup>S-metionina. Después de 12 horas de incubación, el medio acondicionado se recoge, se concentra en un filtro de giro y se carga  
25 en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido PRO52254. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se muestrea en bioensayos concretos.

30 **[0218]** En una técnica alternativa, puede introducirse PRO52254 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Las células 293 se cultivan hasta la máxima densidad en un matraz de agitación y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-PRO52254. En primer lugar, las células se concentran en el matraz de agitación por centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el sedimento celular durante cuatro horas. Las células se tratan  
35 con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo tisular y se introducen de nuevo en el matraz de agitación que contiene el medio de cultivo tisular, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los residuos. Después, la muestra que contiene el PRO52254 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

40 **[0219]** En otra realización, puede expresarse PRO52254 en células CHO. El pRK5-PRO52254 puede transfectarse en células CHO usando reactivos conocidos, tales como CaPO<sub>4</sub> o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio puede remplazarse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como <sup>35</sup>S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido  
45 PRO52254, el medio de cultivo puede remplazarse por medio sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y después se recoge el medio acondicionado. Después, el medio que contiene el PRO52254 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

**[0220]** El PRO52254 marcado con epítipo también puede expresarse en células CHO hospedadoras. El  
50 PRO52254 puede subclonarse fuera del vector pRK5. La inserción del subclon puede someterse a PCR para fusionarse en la fase con un marcador de epítipo seleccionado, tal como un marcador de poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. Después, el inserto de PRO52254 marcado con poli-his puede subclonarse en un vector que contiene un promotor/potenciador SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR para la selección de clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (como se ha descrito anteriormente)  
55 con el vector que contiene el promotor/potenciador SV40. El marcaje puede realizarse, como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. Después, el medio de cultivo que contiene el PRO52254 marcado con poli-His expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como por cromatografía de afinidad por quelación de Ni<sup>2+</sup>.

**[0221]** También puede expresarse PRO52254 en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

**[0222]** La expresión estable en células CHO se realiza usando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, CH2 y los dominios de CH2 y/o es una forma marcada de poli-his.

**[0223]** Tras la amplificación por PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO usando las técnicas convencionales descritas en Ausubel y col., Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el traslado adecuado de los de ADNc. El vector usado en la expresión en las células CHO es como se describe en Lucas y col., Nucl. Acid Res. 24: 9 (1774-1779 (1996), y usa el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

**[0224]** Se introducen doce microgramos del ADN plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando reactivos de transfección Superfect® (Quiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se cultivan como se describe en Lucas y col., anteriormente. Aproximadamente se congelan  $3 \times 10^7$  células en una ampolla para un crecimiento y producción adicional como se describe a continuación.

**[0225]** Las ampollas que contienen el ADN plásmido se descongelan en un baño de agua y se mezclan por agitación vorticial. El contenido se pipetea en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se suspenden el nuevo en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a  $0,2 \mu\text{m}$  con suero bovino fetal dialfiltrado a  $0,2 \mu\text{m}$  al 5%). Después, las células se distribuyeron en alícuotas en un centrifugador de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 2-3 días, las células se transfieren a un centrifugador de 250 ml cargado con 150 ml de medio de cultivo selectivo y se incuban a  $37^\circ\text{C}$ . Después de 2-3 días más, se siembran centrifugadores de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con  $3 \times 10^5$  células/ml. El medio celular se cambia por medio nuevo mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque puede utilizarse cualquier medio de CHO adecuado, en realidad puede usarse un medio de producción descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.122.469, expedida el 16 de junio de 1992. Un centrifugador de producción de 3 l se siembra a  $1,2 \times 10^6$  células/ml. El día 0, se determina el pH. El día 1, el centrifugador se muestrea y se inicia el burbujeo con aire filtrado. El día 2, el centrifugador se muestrea, la temperatura se cambia a  $33^\circ\text{C}$ , y se toman 30 ml de 500g/l de glucosa y 0,6 ml de antiespumante al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajusta según sea necesario manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad caiga por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge por centrifugación y se filtra a través de un filtro de  $0,22 \mu\text{m}$ . El filtrado se almacena a  $4^\circ\text{C}$  o se carga inmediatamente en columnas para su purificación.

**[0226]** Para las construcciones marcadas de poli-his, las proteínas se purifican usando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni-NTA equilibrada en 20 mM de Hepes, pH 7,4, tampón que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a un caudal de 4-5 ml/min a  $4^\circ\text{C}$ . Después de cargarse, la columna se lava con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con el tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM de Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se almacena a  $-80^\circ\text{C}$ .

**[0227]** Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir del medio acondicionado como se indica a continuación. El medio acondicionado se bombea a una columna de Proteína A (Pharmacia) de 5 ml que se ha equilibrado en un tampón de fosfato sódico 20 mM, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen  $275 \mu\text{l}$  de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento, como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli-his. La homogeneidad se calcula mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales mediante degradación de Edman.

**[0228]** Muchos de los polipéptidos PRO descritos en este documento se expresaron de forma satisfactoria como

se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 10: Expresión de PRO52254 en Levadura

- 5 **[0229]** El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO52254 en levadura.
- [0230]** En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de PRO52254 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO52254 y el promotor se insertan en los sitios de enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO52254. Para la secreción, el ADN que codifica PRO52254 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de PRO52254 nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, un factor alfa de levadura o la secuencia señal/líder secretora de la invertasa, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de PRO52254.
- 10
- 15 **[0231]** Después, las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en los medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación por SDS-PAGE seguido de la tinción de los geles con tinte azul de Coomassie.
- 20 **[0232]** El PRO52254 recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la eliminación de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y después concentrando del medio usando los filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene PRO52254 puede purificarse adicionalmente usando las resinas de cromatografía en columna seleccionadas.
- 25 **[0233]** Muchos de los polipéptidos PRO52254 descritos en este documento se expresaron de forma satisfactoria como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 11: Expresión de PRO52254 en Células de Insecto Infectadas con Baculovirus

- 30 **[0234]** El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO52554 en células de insecto infectadas con Baculovirus.
- [0235]** La secuencia que codifica PRO52254 se fusiona en la dirección 5' de un epítipo marcador contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichos epítipo marcadores incluyen marcadores de poli-his y marcadores de inmunoglobulina (como las regiones Fc de 1gG). Pueden emplearse una diversidad de plásmidos, incluyendo plásmidos obtenidos a partir de los plásmidos disponibles en el mercado, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica PRO52254 o la parte deseada de la secuencia codificante de PRO52254, tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular se amplifica por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). Después, el producto se digiere con todas las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.
- 35
- 40
- [0236]** El baculovirus recombinante se genera mediante la transfección simultánea del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (disponible en el mercado en GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se usan para amplificaciones adicionales. La infección vírica y la expresión de la proteína se realizan como describe en O'Reilley y col., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).
- 45
- 50
- [0237]** Después, el PRO52254 marcado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, por cromatografía de afinidad por quelado de Ni<sup>2+</sup> como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas con el virus como se describe en Rupert y col., Nature, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se suspenden de nuevo en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl) y se sonican dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se aclaran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 μm. Se prepara una columna de agarosa de Ni<sup>2+</sup>-NTA (disponible en el mercado en Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se
- 55

carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la medida inicial  $A_{280}$  con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM de fosfato; 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína unida no específicamente. Después de alcanzar la medida inicial  $A_{280}$  de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 5 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan por SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia de Western con  $Ni^{2+}$ -NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el PRO52254 marcado con His<sub>10</sub> eluido se combinan y se dializan contra el tampón de carga.

10 **[0238]** Alternativamente, la purificación del PRO52254 marcado con IgG (o marcado con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

15 **[0239]** Muchos de los polipéptidos PRO52254 dados a conocer en este documento se expresaron de forma satisfactoria como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 12: Preparación de Anticuerpos que se Unen a PRO52254

20 **[0240]** Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a PRO52254.

25 **[0241]** Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en Goding, anteriormente. Los inmunógenos que pueden emplearse incluyen PRO52254 purificado, proteínas de fusión que contienen PRO52254 y células que expresan PRO52254 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse por el experto en la materia sin excesiva experimentación.

30 **[0242]** Los ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de PRO52254 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta por vía subcutánea o por vía intraperitoneal en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras del animal. Después, los ratones inmunizados se estimulan 10 a 12 días después con más cantidad de inmunógeno emulsionado en el adyuvante seleccionado. A partir de entonces, durante diversas semanas, los ratones también pueden estimularse con inyecciones de inmunización adicionales. Pueden obtenerse periódicamente muestras de suero de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-35 PRO52254.

40 **[0243]** Después de que se detecte un título de anticuerpo adecuado, a los animales "positivos" para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de PRO52254. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y las células del bazo se recogen. Después, las células del bazo se condensan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como P3X63AgU.1, disponible de ATCC, N° CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que después pueden colocarse en placas de cultivo tisular de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no condensadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

45 **[0244]** Las células de hibridomas se exploran en un ELISA para obtener su reactividad frente a PRO52254. La determinación de células de hibridomas "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados frente a PRO52254 está dentro de las capacidades del experto en la materia.

50 **[0245]** Las células de hibridomas positivas pueden inyectarse por vía intraperitoneal en ratones singenéticos Balb/c para producir ascitis que contienen los anticuerpos monoclonales anti-PRO52254. Alternativamente, las células de hibridomas pueden crecer en matraces de cultivos de tejidos o en botellas de cultivo rotatorias. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis puede realizarse usando precipitación de sulfato de amonio seguido de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

55 Ejemplo 13: Purificación de Polipéptidos PRO52254 Usando Anticuerpos Específicos

**[0246]** Los polipéptidos PRO52254 nativos o recombinantes pueden purificarse mediante una diversidad de técnicas convencionales en la técnica de la purificación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido pro-PRO52254, el



polipéptido PRO52254 maduro o el polipéptido pre-PRO52254 se purifican por cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO52254 de interés. En general, una columna de inmunoafinidad se construye acoplado covalentemente el anticuerpo dirigido contra el polipéptido PRO52254 a una resina cromatográfica activada.

5

**[0247]** Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes por precipitación con sulfato de amonio o por purificación de Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). De manera análoga, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de líquido ascítico de ratón por precipitación de sulfato de amonio o por purificación cromatográfica de la Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada

10 se une covalentemente a una resina cromatográfica, tal como SEPHAROSE™ CnBr-activada (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava según las instrucciones del fabricante.

**[0248]** Una columna de inmunoafinidad de este tipo se utiliza en la purificación del polipéptido PRO52254 mediante la preparación de una fracción de células que contienen el polipéptido PRO52254 en una forma soluble. Esta preparación se obtiene mediante la solubilización de todo el conjunto celular o de una fracción subcelular obtenida a través de centrifugación diferencial mediante la adición de un detergente o mediante otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido PRO52254 soluble que contiene una secuencia señal puede secretarse en una cantidad útil en el medio en el que las células crecen.

20

**[0249]** Una preparación que contiene el polipéptido PRO52254 soluble se pasa a través de la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorción preferencial del polipéptido PRO52254 (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). Después, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión anti-cuerpo/polipéptido PRO52254 (por ejemplo, un tampón de bajo pH, tal como aproximadamente pH 2-3, o una concentración mayor de un caótropro, tal como urea o ión tiocianato), y el polipéptido PRO52254 se recoge.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad inmunorelacionada seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal o psoriasis en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 80% con una secuencia de aminoácidos del polipéptido mostrado en la figura 2 (a) en una muestra de ensayo de células tisulares obtenidas a partir del mamífero, y (b) en una muestra de control de células tisulares normales conocidas del mismo tipo celular, en el que un nivel más alto de expresión de dicho gen en la muestra de ensayo que cuando se compara con la muestra de control es indicativa de la presencia de la enfermedad inmunorelacionada en el mamífero a partir del cual se obtuvieron las células tisulares del ensayo.
2. Un procedimiento según la reivindicación 1, el que la enfermedad inmunorelacionada es enfermedad inflamatoria intestinal.
3. Un procedimiento según la reivindicación 1, en el que la enfermedad inmunorelacionada es psoriasis.
4. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2.
5. Un procedimiento para el diagnóstico de una enfermedad inmunorelacionada seleccionada entre enfermedad inflamatoria intestinal o psoriasis en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento (a) poner en contacto un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que tiene al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 80% con una secuencia de aminoácidos del polipéptido mostrado en la figura 2 con una muestra de ensayo de células tisulares obtenidas a partir de dicho mamífero y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo y el polipéptido en la muestra de ensayo, en la que una gran cantidad de complejos formados en la muestra de ensayo es indicativa de la presencia de la enfermedad inmunorelacionada en el mamífero a partir del cual se obtuvieron las células tisulares de ensayo.
6. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que enfermedad inmunorelacionada es enfermedad inflamatoria intestinal.
7. Un procedimiento según la reivindicación 5, en el que la enfermedad inmunorelacionada es psoriasis.
8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el anticuerpo se une específicamente un polipéptido con la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro mostrado en la figura 2.

**FIGURA 1**

CGTCCTATCTGCAGTCGGCTACTTTCAGTGGCAGAAGAGGCCACATCTGCTTCCTGTAGG  
CCCTCTGGGCAGAAAGCATGCGCTGGTGTCTCCTCCTGATCTGGGCCAGGGGCTGAGGCA  
GGCTCCCCTCGCCTCAGGAATGATGACAGGCACAATAGAAACAACGGGGAACATTTCTGC  
AGAGAAAGGTGGCTCTATCATCTTACAATGTCACCTCTCCTCCACCACGGCACAAGTGAC  
CCAGGTCAACTGGGAGCAGCAGGACCAGCTTCTGGCCATTTGTAATGCTGACTTGGGGTG  
GCACATCTCCCATCCTTCAAGGATCGAGTGGCCCCAGGTCCCAGGCCTGGGCCTCACCTT  
CCAGTCGCTGACCGTGAACGATACAGGGGAGTACTTCTGCATCTATCACACCTACCCTGA  
TGGGACGTACACTGGGAGAATCTTCCCTGGAGGTCCTAGAAAGCTCAGTGGCTGAGCACGG  
TGCCAGGTTCCAGATTCCATTGCTTGGAGCCATGGCCGCGACGCTGGTGGTCATCTGCAC  
AGCAGTCATCGTGGTGGTTCGCGTTGACTAGAAAGAAGAAAGCCCTCAGAATCCATTCTGT  
GGAAGGTGACCTCAGGAGAAAATCAGCTGGACAGGAGGAATGGAGCCCCAGTGCTCCCTC  
ACCCCCAGGAAGCTGTGTCCAGGCAGAAGCTGCACCTGCTGGGCTCTGTGGAGAGCAGCG  
GGGAGAGGACTGTGCCGAGCTGCATGACTACTTCAATGTCTGAGTTACAGAAGCCTGGG  
TAACTGCAGCTTCTTACAGAGACTGGTTAGCAACCAGAGGCATCTTCTGG

## FIGURA 2

MRWCLLLIWAQGLRQAPLASGMMTGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWE  
QQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTG  
RIFLEVLESSVAEHGARFQIPLLGAMAATLVVICTAVIVVVALTRKKKALRIHSVEGDLR  
RKSAGQEEWSPSAPSPPGSCVQAEAAPAGLCGEQRGEDCAELHDYFNVLSYRSLGNCSSF  
TETG

Secuencia señal

1-15

Dominio transmembrana

140-160

Sitio de N-glicosilación

32-35

101-104

236-239

Sitio de fosforilación de proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP

180-183

Sitio de N-miristoilación

21-26

25-30

31-36

90-95

116-121

144-149

Dominio de inmunoglobulina

38-110

Dominio ITIM

218-228

**FIGURA 3**

GCCAGTTTCAGTTGGAGGAGAGGCCACATCCACTTTGCTGTAGGCCTCTGGTTAGAAGCA  
TGCATGGCTGGCTGCTCCTGGTCTGGGTCCAGGGGCTGATACAGGCTGCCTTCCTCGCTA  
CAGGAGCCACAGCAGGCACGATAGATACAAAGAGGAACATCTCTGCAGAGGAAGGTGGCT  
CTGTCATCTTACAGTGTCACTTCTCCCTGACACAGCTGAAGTGACCCAAGTCGACTGGA  
AGCAGCAGGACCAGCTTCTGGCCATTTATAGTGTGACCTGGGGTGGCATGTCGCTTCAG  
TCTTCAGTGATCGGGTGGTCCCAGGCCCCAGCCTAGGCCTCACCTTCCAGTCTCTGACAA  
TGAATGACACGGGAGAGTACTTCTGTACCTATCATACGTATCCTGGTGGGATTTACAAGG  
GGAGAATATTCCTGAAGGTCCAAGAAAGCTCAGTGGCTCAGTTCAGACTGCCCGCTTG  
GAGGAACCATGGCTGCTGTGCTGGGACTCATTGCTTAATGGTCACAGGAGTGACTGTAC  
TGGCTAGAAAGAAGTCTATTAGAATGCATTCTATAGAAAAGTGGCCTTGGGAGAACAGAAG  
CGGAGCCACAGGAATGGAACCTGAGGAGTCTCTCATCCCCTGGAAGCCCTGTCCAGACAC  
AAACTGCCCTGCTGGTCCCTGTGGAGAGCAGGCAGAAAGATGACTATGCTGACCCACAGG  
AATACTTTAATGTCCTGAGCTACAGAAGCCTAGAGAGCTTCATTGCTGTATCGAAGACTG  
GCTAACGACAGCTCTATCCCTCTCCCTATGTCTCTCTCTGTCTCTCTGTCTCTCT  
TCTGTCTCTGTCTCTGTCTCTGTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT  
TGTGTGTATGTGTGTATACATCATTAAATGTTCAATTAACACTAACTGCATATGGTGGAGGA  
CCAGGAAATAAAAAGTTTGTGTTGCTAATAAAAATTAAGTGCTAACTT

## **FIGURA 4**

MHGWLLLVVWVQGLIQAAFLATGATAGTIDTKRNISAEEGGSVILQCHFSSDTAEVTQVDW  
KQDQDLLAIYSVDLGWHVASVFSRVPVPGPSLGLTFQSLTMNDTGEYFCTYHTYPPGGIYK  
GRIFLKVQESSVAQFQTAPLGGTMAAVLGLICLMVTGVTVLARKKSIRMHSIESGLGRTE  
AEPQEWNLRLSSPGSPVQQTAPAGPCGGEQAEDDYADPQEYFNVLSSYRSLESFIAVSKT  
G

Secuencia señal

1-16

Dominio transmembrana

138-158

Sitio de N-glicosilación

33-36  
102-105

Sitio de unión a glicosaminoglicano

174-177

Sitio de fosforilación de proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP

163-166

Sitio de N-miristoilación

12-17  
22-27  
26-31  
117-122  
141-146  
142-147  
175-180

Dominio de inmunoglobulina

39-111

Dominio ITIM

221-230