



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 798**

51 Int. Cl.:
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/18 (2006.01)
C12N 15/19 (2006.01)
C07K 14/495 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **95921317 .4**
96 Fecha de presentación : **19.05.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **0826041**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.03.1998**

54 Título: **Factor de crecimiento transformante alfa HII.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.04.2011

73 Titular/es: **HUMAN GENOME SCIENCES, Inc.**
14200 Shady Grove Road
Rockville, Maryland 20850, US

72 Inventor/es: **Wei, Ying-Fei;**
Meissner, Paul, S. y
Ni, Jian

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 357 798 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

Esta invención se refiere a polinucleótidos recién identificados, a los polipéptidos codificados por tales polinucleótidos, así como a la producción de tales polinucleótidos y polipéptidos. El polipéptido de la presente invención se ha identificado supuestamente como un homólogo del factor de crecimiento transformante alfa humano. Más en particular, el polipéptido de la presente invención se ha identificado supuestamente como el factor de crecimiento transformante alfa HII, a veces denominado más adelante en la presente memoria "TGF α -HII". La invención se refiere también a la inhibición de la acción de tales polipéptidos.

El crecimiento y la diferenciación celular parecen ser iniciados, estimulados, mantenidos y regulados por una diversidad de factores y hormonas estimuladoras, inhibitoras y sinérgicas. La alteración y/o el fracaso del mecanismo de homeostasis celular parece ser una causa fundamental de las enfermedades relacionadas con el crecimiento, que incluyen las neoplasias. Los factores moduladores del crecimiento están implicados en una amplia diversidad de procesos patológicos y fisiológicos que incluyen la transducción de señales, la comunicación, el crecimiento y el desarrollo celular, la embriogénesis, la respuesta inmunitaria, la supervivencia y la diferenciación de las células hematopoyéticas, la inflamación, la reparación y la remodelación tisular, la aterosclerosis y el cáncer. El factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), la betacelulina, la anfirregulina, y el factor de crecimiento de vaccinia, entre otros factores, son proteínas moduladoras del crecimiento y la diferenciación producidas por una diversidad de tipos celulares en condiciones fisiológicas normales o en respuesta a estímulos exógenos, y son miembros de la familia de EGF.

Estos factores de crecimiento peptídicos influyen en las células de las heridas por medio de mecanismos autocrinos y paracrinos. También desempeñan papeles importantes en la cicatrización normal de heridas en tejidos tales como la piel, la córnea y el tracto gastrointestinal, y todos comparten una homología sustancial de secuencias de aminoácidos, lo que incluye la colocación conservada de tres enlaces disulfuro intracatenarios. Además, los tres factores de esta familia se unen a un receptor glicoproteico transmembrana que tiene un peso molecular de 170.000 y activan la actividad de tirosina quinasa en el dominio citoplasmático del receptor (Buhrow, S.A. et al., J. Bio. Chem., 258:7824-7826 (1983)).

Los receptores se expresan en muchos tipos de células, que incluyen los queratinocitos cutáneos, los fibroblastos, las células endoteliales vasculares, y las células epiteliales del tracto GI. Estos factores de crecimiento peptídicos son sintetizados por diversas células implicadas en la cicatrización de heridas, que incluyen plaquetas, queratinocitos, y macrófagos activados. Estos factores de crecimiento se han implicado también tanto en la estimulación del crecimiento y la diferenciación de ciertas células, por ejemplo, en neoplasias, como en la inhibición de otros tipos de células.

La betacelulina es una glicoproteína de 32 kilodaltons que parece procesarse desde un precursor transmembrana mayor mediante escisión proteolítica. El dominio carboxiterminal de la betacelulina tiene una similitud de secuencias del 50% con el del factor de crecimiento transformante α de rata. La betacelulina es un mitógeno potente para las células epiteliales pigmentadas de la retina y las células musculares lisas vasculares.

La anfirregulina es un factor regulador del crecimiento celular bifuncional que exhibe una actividad inhibitora potente sobre la síntesis de ADN en las células neoplásicas, y sin embargo estimula el crecimiento de ciertas células normales. Se ha asignado una amplia diversidad de usos para la anfirregulina, que incluyen el tratamiento de heridas y cánceres. Por ejemplo, la anfirregulina tiene efectos antiproliferativos potentes *in vitro* en varias líneas celulares de cáncer humano de origen epitelial. La anfirregulina también induce la proliferación de fibroblastos de prepucio humano, tal como se muestra en la solicitud de patente de Estados Unidos nº 5.115.096.

TGF α tiene efectos biológicos pleiotrópicos. La producción de ciertos miembros de TGF α es sintetizada por varios fibroblastos transformados de manera oncogénica (Ciardiello et al., J. Cell. Biochem., 42:45-57 (1990)), así como por una diversidad de tumores, que incluyen carcinomas renales, de mama y escamosos, melanomas y glioblastomas (Derynck, R. et al., Cancer Res., 47:707-712 (1987)). Existen pruebas directas de que la expresión de TGF α puede ser un factor contribuyente en la conversión de una célula normal en su homólogo tumorigénico mediante el análisis de ratones transgénicos en los que las células tumorales expresan niveles elevados de TGF α . Los animales transgénicos para TGF α exhiben una diversidad de lesiones neoplásicas, dependiendo de la cepa del ratón y de la elección del promotor que regula la expresión de TGF α (Sandgren, et al., Cell, 61:1121-1135 (1990)).

TGF α también desempeña un papel en el desarrollo embrionario normal y en la fisiología del adulto (Derynck, R. Adv. Cancer Res., 58:27-5 (1992)). TGF α se ha expresado en muchos tejidos, que incluyen la piel, cerebro, mucosa gastrointestinal y macrófagos activados. Por lo tanto, TGF α es un factor importante en el control del crecimiento de las células epiteliales, y desempeña un papel en la cicatrización de heridas. También se ha descubierto que TGF α es angiogénico (Schreiber, et al., Science, 232:1250-1253 (1986)).

El polipéptido de la presente invención se ha identificado supuestamente como el factor de crecimiento transformante TGF α - HII. Esta identificación se ha realizado como resultado de la homología de secuencias de aminoácidos respecto de TGF α humano.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporcionan polipéptidos nuevos codificados por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en

(a) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en Seq. ID No. 2;

(b) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 1 a 329 tal como se representa en Seq. ID No. 2;

5 y

(c) una variante alélica del polinucleótido de (a) o (b).

Los polipéptidos de la presente invención son de origen humano.

10 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan polinucleótidos aislados tal como se definieron anteriormente que codifican los polipéptidos de la presente invención, que incluyen mARNs, ADNs, cADNs y ADNs genómicos.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan procedimientos para la producción de tal polipéptido mediante técnicas recombinantes que comprenden cultivar células hospedadoras procarióticas y/o eucarióticas recombinantes, que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención.

15 Tales polipéptidos, o los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, se pueden utilizar para fines terapéuticos, por ejemplo, para estimular la cicatrización de heridas, para restablecer el funcionamiento neurológico normal tras un traumatismo o por demencia asociada al SIDA, para tratar trastornos oculares, para seleccionar como objetivo ciertas células, para tratar trastornos renales y hepáticos y para estimular el desarrollo folicular del pelo, para estimular la angiogénesis para el tratamiento de quemaduras, úlceras e incisiones en la córnea, y para estimular la embriogénesis.

20 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, también se proporcionan sondas de ácidos nucleicos que comprenden moléculas de ácidos nucleicos de longitud suficiente para hibridar en condiciones rigurosas a las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención mencionadas anteriormente.

25 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se proporcionan anticuerpos hacia tales polipéptidos.

30 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporcionan antagonistas hacia tales polipéptidos, que se pueden usar para inhibir la acción de tales polipéptidos, por ejemplo, en el tratamiento de la inflamación de la córnea, neoplasias, por ejemplo, tumores y cánceres, y para la psoriasis, en el que dicho antagonista es un anticuerpo hacia tal polipéptido o una construcción antisentido que hibrida a un polinucleótido que codifica dicho polipéptido.

Las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas se pueden usar en ensayos de diagnóstico para la detección de enfermedades relacionadas con la sobreexpresión del polipéptido de la presente invención y las mutaciones de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican tal polipéptido.

35 Tales polipéptidos, o los polinucleótidos que codifican tales polipéptidos, se pueden usar para fines *in vitro* relacionados con la investigación científica, la síntesis de ADN y la fabricación de vectores de ADN.

Estos y otros aspectos de la presente invención deberían ser evidentes para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Los siguientes dibujos son ilustrativos de las realizaciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones.

40 La Figura 1 representa la secuencia de cADN en la secuencia de aminoácidos deducida correspondiente de TGF α -HII. Se usan las abreviaturas de una letra estándar para los aminoácidos. Se ha subrayado la secuencia señal supuesta.

45 La Figura 2 es una ilustración de la homología de secuencias de aminoácidos comparativa entre la betacelulina humana, TGF α humano y TGF α -HII humano (tercera fila). Un * indica el motivo de EGF conservado que se demuestra que está conservado en el polipéptido de la presente invención. El subrayado indica la secuencia madura del TGF α humano.

50 De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un ácido nucleico aislado (polinucleótido) que codifica el polipéptido maduro que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de la Figura 1 (SEQ ID NO:2) el polipéptido maduro está codificado por el cADN del clon depositado como el depósito de la ATCC n° 97160, el 24 de mayo de 1995.

Se puede obtener un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención a partir de cerebro humano y tejido cerebral en una etapa temprana. El polinucleótido de esta invención se descubrió en una biblioteca de cADN procedente de un embrión de dos semanas. Está relacionado estructuralmente con la familia de EGF.

5 Contiene un marco de lectura abierto que codifica una proteína de 374 residuos de aminoácidos, de los cuales aproximadamente 45 residuos de aminoácidos son la secuencia líder supuesta. La proteína exhibe el mayor grado de homología hacia TGF α humano, con una identidad del 26 % y una similitud del 46 % a lo largo de un tramo de 236 aminoácidos. TGF α -HII contiene los seis residuos de cisteína conservados hallados en todos los miembros de la familia de EGF.

10 El polinucleótido de la presente invención puede estar en forma de ARN o en forma de ADN, y dicho ADN incluye el cADN, el ADN genómico, y el ADN sintético. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, y si es monocatenario puede ser la cadena codificante o la no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica el polipéptido maduro puede ser idéntica a la secuencia codificante mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1) o la del clon depositado, o puede ser una secuencia codificante diferente la cual, como resultado de la redundancia o la degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido maduro que el ADN de la Figura 1 (SEQ ID NO:1) o el cADN depositado.

15 El polinucleótido que codifica el polipéptido maduro de la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o el polipéptido maduro codificado por el cADN depositado puede incluir, pero sin limitación: solamente la secuencia codificante del polipéptido maduro; la secuencia codificante del polipéptido maduro y una secuencia codificante adicional tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia de proproteína; la secuencia codificante del polipéptido maduro (y opcionalmente la secuencia codificante adicional) y una secuencia no codificante, tal como intrones o secuencia no codificante en 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido maduro.

20 Así, la expresión "polinucleótido que codifica un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye solamente la secuencia codificante del polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias codificantes y/o no codificantes adicionales.

La presente invención se refiere además a las variantes alélicas naturales de los polinucleótidos anteriormente descritos en la presente memoria que codifican el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o el polipéptido codificado por el cADN del clon depositado.

25 Así, la presente invención incluye los polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido maduro mostrado en la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o el mismo polipéptido maduro codificado por el cADN del clon depositado, así como las variantes alélicas de tales polinucleótidos. Tales variantes nucleotídicas incluyen las variantes por delección, las variantes por sustitución y las variantes por adición o inserción.

30 Como se indicó anteriormente en la presente memoria, el polinucleótido puede tener una secuencia codificante que es una variante alélica natural de la secuencia codificante mostrada en la Figura 1 (SEQ ID NO:1) o de la secuencia codificante del clon depositado. Tal como se conoce en la técnica, una variante alélica es una forma alternativa de una secuencia polinucleotídica que puede tener una sustitución, delección o adición de uno o más nucleótidos, lo que no altera sustancialmente la función del polipéptido codificado.

35 La presente invención incluye también polinucleótidos; en los que la secuencia codificante del polipéptido maduro puede estar fusionada en el mismo marco de lectura a una secuencia polinucleotídica que ayuda en la expresión y la secreción de un polipéptido de una célula hospedadora, por ejemplo, una secuencia líder que funciona como una secuencia secretora para controlar el transporte de un polipéptido desde la célula. El polipéptido que tiene una secuencia líder es una proproteína, y la secuencia líder puede ser escindida por la célula hospedadora para formar la forma madura del polipéptido. Los polinucleótidos pueden codificar también una proproteína que es la proteína madura, más residuos de aminoácidos adicionales en 5'. Una proteína madura que tiene una prosequencia es una proproteína, y es una forma inactiva de la proteína. Una vez que la prosequencia se escinde, queda una proteína madura activa.

40 Así, por ejemplo, el polinucleótido de la presente invención puede codificar una proteína madura, o una proteína que tiene una prosequencia o una proteína que tiene tanto una prosequencia como una presequencia (secuencia líder).

45 Los polinucleótidos de la presente invención pueden tener también la secuencia codificante fusionada en el marco de lectura a una secuencia marcadora que permite la purificación del polipéptido de la presente invención. La secuencia marcadora puede ser un marcador de hexahistidina aportado por un vector pQE-9 para facilitar la purificación del polipéptido maduro fusionado al marcador en el caso de un hospedador bacteriano, o, por ejemplo, la secuencia marcadora puede ser un marcador de hemaglutinina (HA) cuando se utiliza un hospedador mamífero, p.ej. células COS-7. El marcador de HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe (Wilson, I., et al., Cell, 37:767 (1984)).

50 El término "gen" significa un segmento de ADN implicado en la producción de una cadena polipeptídica; incluye las regiones anteriores y posteriores a la región codificante (líder y tráiler), así como las secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).

55 Se pueden usar fragmentos del gen de TGF α -HII de tamaño completo como sonda de hibridación para una biblioteca de cADN para aislar el gen de tamaño completo y para aislar otros genes que pueden tener una similitud de secuencias elevada hacia el gen o una actividad biológica similar. Las sondas de este tipo tienen preferiblemente

al menos 30 bases y pueden contener, por ejemplo, 50 o más bases. La sonda se puede usar también para identificar un clon de cADN que corresponde al transcrito de tamaño completo y un clon o clones genómicos que contienen el gen de TGF α -HII completo que incluye regiones reguladoras y promotoras, exones, e intrones. Un ejemplo de un cribado comprende aislar la región codificante del gen mediante el uso de la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda oligonucleotídica. Se usan oligonucleótidos marcados que tienen una secuencia complementaria a la del gen de la presente invención para cribar una biblioteca de cADN humano, ADN genómico o mRNA para determinar a qué miembros de la biblioteca híbrida la sonda.

La presente invención se refiere además a polinucleótidos que hibridan en condiciones rigurosas a los polinucleótidos anteriormente descritos en la presente memoria. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "condiciones rigurosas" significa que la hibridación se dará solamente si existe una identidad de al menos un 95%, y preferiblemente al menos un 97% entre las secuencias. Los polinucleótidos que hibridan a los polinucleótidos anteriormente descritos en la presente memoria codifican polipéptidos que mantienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por los cADNs de la Figura 1 (SEQ ID NO:1) o el/los cADN(s) depositado(s).

De manera alternativa, el polinucleótido puede tener al menos 20 bases, preferiblemente 30 bases, y más preferiblemente al menos 50 que hibridan a un polinucleótido de la presente invención, y que tiene una identidad hacia él, como se describió anteriormente en la presente memoria, y que puede o no mantener la actividad. Por ejemplo, tales polinucleótidos se pueden emplear como sondas para el polinucleótido de SEQ ID NO:1, por ejemplo, para la recuperación del polinucleótido o como sonda diagnóstica o como cebador de PCR.

Así, la presente invención se dirige a polinucleótidos que tienen una identidad de al menos un 95% hacia un polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:2 así como los fragmentos del mismo, cuyos fragmentos tienen al menos 30 bases y preferiblemente al menos 50 bases, y a polipéptidos codificados por tales polinucleótidos.

El/los depósito(s) a los que se hace referencia en la presente memoria se mantendrá(n) conforme al Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes. Estos depósitos se proporcionan simplemente como comodidad para los expertos en la técnica, y no son un reconocimiento de que sea necesario un depósito de acuerdo con 35 U.S.C. §112. La secuencia de los polinucleótidos contenidos en los materiales depositados, así como la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos codificados por ellos, se incorporan en la presente memoria como referencia, y son determinantes en caso de cualquier conflicto con cualquier descripción de secuencias en la presente memoria. Puede ser necesaria una licencia para fabricar, usar o comercializar los materiales depositados, y tal licencia no es concedida por la presente memoria.

La presente invención se refiere además a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por el cADN depositado, así como los fragmentos que comprenden los residuos de aminoácidos 1 a 329 de SEQ ID NO:2.

Las expresiones "fragmento," "derivado" y "análogo", cuando se refieren al polipéptido de la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o al codificado por el cADN depositado, significan un polipéptido que mantiene esencialmente la misma función o actividad biológica que tal polipéptido. Así, un análogo incluye una proproteína que se puede activar mediante la escisión de la porción de proproteína para producir un polipéptido maduro activo.

El polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido recombinante, un polipéptido natural o un polipéptido sintético, preferiblemente un polipéptido recombinante.

Se describe un fragmento, derivado o análogo del polipéptido de la Figura 1 (SEQ ID NO:2) o del codificado por el cADN depositado que puede ser (i) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado), y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético, o (ii) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (iii) uno en el que el polipéptido maduro está fusionado a otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietileno glicol), o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales están fusionados al polipéptido maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Se considera que tales fragmentos, derivados y análogos están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

Los polipéptidos y polinucleótidos de la presente invención se proporcionan preferiblemente en una forma aislada, y preferiblemente se purifican hasta homogeneidad.

El término "aislado" significa que el material se elimina de su medio original (p.ej., el medio natural si se da de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de algunos o de todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector, y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y todavía estar aislados ya que tal vector o composición no es parte de su medio natural.

Los polipéptidos de la presente invención incluyen el polipéptido de SEQ ID NO:2 (en particular el polipéptido maduro) así como los polipéptidos codificados por las variantes alélicas del polinucleótido que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:2 (o el polipéptido maduro).

5 Tal como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido respecto de la secuencia de un segundo polipéptido.

10 Los fragmentos o las porciones de los polipéptidos de la presente invención se pueden emplear para producir el polipéptido de tamaño completo correspondiente mediante síntesis peptídica; por lo tanto, los fragmentos se pueden emplear como intermedios para producir los polipéptidos de tamaño completo. Los fragmentos o las porciones de los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para sintetizar los polinucleótidos de tamaño completo de la presente invención.

La presente invención se refiere también a los vectores que incluyen los polinucleótidos de la presente invención, a las células hospedadoras que se modifican mediante ingeniería genética con los vectores de la invención y a la producción de los polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes.

15 Las células hospedadoras se modifican mediante ingeniería genética (transducidas o transformadas o transfectadas) con los vectores de esta invención que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células hospedadoras modificadas se pueden cultivar en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes de la presente invención. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son los usados previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expansión, y serán evidentes para el técnico experto.

20 Los polinucleótidos de la presente invención se pueden emplear para producir polipéptidos mediante técnicas recombinantes. Así, por ejemplo, el polinucleótido se puede incluir en cualquiera de una diversidad de vectores de expresión para expresar un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, p.ej., derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levaduras; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, viruela aviar, y pseudorrabia. Sin embargo, se puede usar cualquier otro vector con tal de que sea replicable y viable en el hospedador.

25 Se puede insertar la secuencia de ADN adecuada en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un/varios sitio(s) de endonucleasa de restricción adecuado(s) mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se considera que tales procedimientos y otros están dentro del alcance de los expertos en la técnica.

30 La secuencia de ADN en el vector de expresión está unida de manera operable a una/varias secuencia(s) de control de la expresión adecuada(s) (promotor) para dirigir la síntesis del mRNA. Como ejemplos representativos de tales promotores se pueden mencionar: LTR o promotor de SV40, el lac o trp de E. coli, el promotor de fago λ P_L y otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector puede incluir también secuencias adecuadas para amplificar la expresión.

35 Además, los vectores de expresión contienen preferiblemente uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células hospedadoras transformadas, tal como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucarióticas, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en E. coli.

40 El vector que contiene la secuencia de ADN adecuada como se describió anteriormente en la presente memoria, así como una secuencia promotora o de control, se pueden emplear para transformar un hospedador adecuado para permitir que el hospedador exprese la proteína.

45 Como ejemplos representativos de los hospedadores adecuados, se pueden mencionar: células bacterianas, tales como E. coli, Streptomyces, Salmonella typhimurium; células fúngicas, tales como levaduras; células de insectos, tales como Drosophila S2 y Spodoptera Sf9; células animales, tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; células vegetales, etc. Se considera que la selección de un hospedador adecuado está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria.

50 Más en particular, la presente invención incluye también construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias tal como se describieron anteriormente en líneas generales. Las construcciones comprenden un vector, tal como un vector plasmídico o viral, en el que se ha insertado una secuencia de la invención, en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende además secuencias reguladoras, que incluyen, por ejemplo, un promotor, unidas de manera operable a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo; Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, pD10, phagescript, psiX174, pbluescript SK, pbsks, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A

(Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia); Eucarióticos: pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, pSVL (Pharmacia). Sin embargo, se puede usar otro plásmido o vector con tal de que sea replicable y viable en el hospedador.

5 Las regiones promotoras se pueden seleccionar de cualquier gen deseado mediante el uso de vectores de CAT (cloranfenicol transferasa) o de otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores adecuados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos nombrados particulares incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P_R, P_L y trp. Los promotores eucarióticos incluyen el temprano inmediato de CMV, timidina quinasa de HSV, temprano y tardío de SV40, LTRs de retrovirus, y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y promotor adecuado está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica.

10 En una realización adicional, la presente invención se refiere a células hospedadoras que contienen las construcciones anteriormente descritas. La célula hospedadora puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariótica inferior, tal como una célula de levadura, o la célula hospedadora puede ser una célula procariótica, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula hospedadora se puede llevar a cabo mediante transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-Dextrano, o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

15 Las construcciones en las células hospedadoras se pueden usar de una manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. De manera alternativa, los polipéptidos de la invención se pueden producir de forma sintética mediante sintetizadores convencionales de péptidos.

20 Las proteínas maduras se pueden expresar en células de mamífero, de levadura, bacterianas o en células de otro tipo bajo el control de los promotores adecuados. También se pueden emplear sistemas de traducción sin células para producir tales proteínas mediante el uso de los ARNs derivados de las construcciones de ADN de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión adecuados para el uso con los hospedadores procarióticos y eucarióticos se describen en Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), cuya descripción se incorpora en la presente memoria como referencia.

25 La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por los eucariotas superiores se incrementa insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, normalmente de alrededor de 10 a 300 pb que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en los pb 100 a 270 del lado retrasado del origen de replicación, un potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado retrasado del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus.

30 En general, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedadora, p.ej., el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen muy expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en posición 3'. Tales promotores pueden proceder de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), factor α , fosfatasa ácida, o proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se construye en una fase adecuada con secuencias de iniciación y terminación de la traducción, y, preferiblemente, una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida al espacio periplásmico o al medio extracelular. Opcionalmente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación N-terminal que confiere características deseadas, p.ej., estabilización o purificación simplificada del producto recombinante expresado.

35 Los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales adecuadas de iniciación y terminación de la traducción en una fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, si es deseable, para posibilitar la amplificación dentro del hospedador. Los hospedadores procarióticos adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, aunque también se pueden emplear otros a voluntad.

40 Como ejemplo representativo pero no limitante, los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del vector de clonación conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EE.UU.). Estas secciones "estructurales" de pBR322 se combinan con un promotor adecuado y la secuencia estructural a expresar.

45 Tras la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el cultivo de la cepa hospedadora hasta una densidad celular adecuada, el promotor seleccionado se induce por medios adecuados (p.ej., cambio de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un período adicional.

55 Las células se recogen generalmente mediante centrifugación, se rompen por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se conserva para su purificación posterior.

Las células microbianas empleadas en la expresión de las proteínas se pueden romper mediante cualquier método adecuado, que incluye ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica, o el uso de agentes de lisis de células, y los expertos en la técnica conocen bien tales métodos.

5 También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos renales de mono, descritos por Gluzman, *Cell*, 23: 175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor adecuado y un potenciador, y también cualquier sitio necesario de unión al ribosoma, sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias no transcritas flanqueantes en 5'. Se pueden usar secuencias de ADN derivadas del corte y empalme de SV40 y sitios de poliadenilación para proporcionar los elementos genéticos no transcritos necesarios.

15 Los polipéptidos se pueden recuperar y purificar de los cultivos de células recombinantes mediante métodos que incluyen la precipitación con sulfato amónico o etanol, la extracción con ácidos, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxipatito y cromatografía con lectina. Se pueden usar etapas de plegamiento de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas finales de purificación.

20 Los polipéptidos de la presente invención pueden ser un producto purificado de manera natural, o un producto de procedimientos de síntesis química, o se pueden producir mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariótico o eucariótico (por ejemplo, mediante células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos en cultivo). Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o sin glicosilar. Los polipéptidos de la invención pueden incluir también un residuo de aminoácido de metionina inicial.

25 Los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención se pueden emplear como reactivos de investigación y materiales para el descubrimiento de tratamientos y diagnósticos para enfermedades humanas.

30 El polipéptido de la presente invención se puede emplear para la caracterización de receptores. Los receptores de la familia de EGF incluyen actualmente cuatro receptores de EGF, denominados EGFR1, EGFR2, EGFR3 y EGFR4. El receptor EGFR2 se puede denominar también ERB-2, y esta molécula es útil para una diversidad de indicaciones diagnósticas y terapéuticas (Prigent, S.A., y Lemoine, N.R., *Prog Growth Factor Res.*, 4:1-24 (1992)). El polipéptido TGF α -HII es probablemente un ligando para uno o más de estos receptores, así como para un receptor de tipo EGF nuevo identificado. El uso de TGF α -HII puede ayudar a la identificación, caracterización y clonación de tales receptores. Por ejemplo, el gen del receptor de EGF representa el homólogo celular del oncogén v-erb-B del virus de la eritroblastosis aviar. La sobreexpresión del receptor de EGF o la delección de los segmentos reguladores de la quinasa de la proteína puede provocar la transformación tumorigénica de las células (Manjusri, D. et al., *Human Cytokines*, 364 y 381 (1991)).

35 Los polipéptidos de la presente invención se pueden emplear también para el restablecimiento o la mejora de las funciones neurológicas disminuidas como resultado de un traumatismo o de otras patologías dañinas (tales como la demencia asociada al SIDA, demencia senil, etc.). Se ha descubierto que TGF α y sus homólogos son los ligandos más abundantes para el receptor EGF/TGF α en la mayor parte del cerebro (Kaser, et al., *Brain Res Mol Brain Res*: 16:316-322, (1992)). Parece existir una distribución generalizada de TGF α en diversas regiones del cerebro en contraste con EGF, que está presente solamente en áreas más pequeñas y más discretas, lo que indica que TGF-alfa podría desempeñar un papel fisiológico en los tejidos cerebrales. Estos sitios receptores numerosos para TGF α en el cerebro sugieren que TGF tiene una utilidad importante en la estimulación de la diferenciación y la función de las células cerebrales normales. Por lo tanto, en los casos en los que el funcionamiento neurológico está disminuido, la administración del polipéptido de la presente invención puede estimular el cerebro y mejorar las funciones fisiológicas adecuadas.

40 TGF α -HII o su forma soluble se puede emplear también para tratar trastornos oculares, por ejemplo, la inflamación de la córnea. Una diversidad de experimentos ha implicado a miembros de la familia de genes de TGF α en tales patologías. Un artículo reciente resume algunos de los datos relacionados con el papel que estos factores de crecimiento desempeñan en la enfermedad ocular (Mann et al *Cell* 73:249-261 (1993)). Los experimentos recientes han demostrado que varios ratones que carecían del gen de TGF α exhibieron inflamación de la córnea debida a una infiltración de leucocitos y otras células en la sustancia propia de los ojos.

45 Además, la especificidad de los factores de crecimiento de TGF α por sus células objetivo se puede aprovechar como un mecanismo para destruir la célula objetivo. Por ejemplo, TGF α -HII o las formas solubles del mismo se pueden acoplar (por medio de una diversidad de métodos) a moléculas tóxicas: por ejemplo, un producto radiofarmacéutico que inactiva las células objetivo. Estas fusiones factor de crecimiento-toxina destruyen la célula objetivo (y en ciertos casos las células vecinas mediante una diversidad de efectos "circunstantes"). Un ejemplo reciente de tales genes de fusión a toxinas ha sido publicado por Mesri, et al., *J. Biol. Chem.* 268:4853-62 (1993).
60 TGF α -HII y las moléculas relacionadas también se pueden encapsular en liposomas y se pueden conjugar a

anticuerpos que reconocen y se unen a antígenos específicos de tumores o de células, por lo que se proporciona un medio para "seleccionar como objetivo" las células.

De esta misma manera, TGF α -HII se puede emplear como un compuesto antineoplásico, ya que los miembros de la familia de EGF muestran efectos antiproliferativos sobre las células transformadas. Para el uso *in vivo*, el polipéptido en cuestión se puede administrar de una diversidad de maneras, que incluyen, pero sin limitación, inyección, infusión, de manera tópica, parenteral, etc. La administración puede ser en cualquier vehículo fisiológicamente aceptable, que incluye solución salina tamponada con fosfato, solución salina, agua esterilizada, etc.

El fragmento de polipéptido TGF α -HII se puede emplear también para tratar ciertos trastornos renales, ya que se ha descubierto que existe expresión de estos factores de crecimiento en el riñón. Así, estos factores pueden ser necesarios para el mantenimiento fisiológico adecuado de este órgano.

Los tratamientos pueden estar relacionados también con la regeneración hepática o la disfunción hepática, ya que TGF α y sus homólogos y el factor de crecimiento de hepatocitos desencadenan la regeneración de los hepatocitos tras una hepatectomía parcial y tras necrosis de hepatocitos aguda (Masuhara, M. et al, Hepatology 16:1241-1249 (1992)).

Un tratamiento importante que implica a TGF α -HII se refiere a la cicatrización de heridas. Las composiciones de la presente invención se pueden emplear para el tratamiento de una amplia diversidad de heridas, que incluyen prácticamente todas las heridas cutáneas, las heridas corneales, y las lesiones de las vísceras huecas con un tapiz epitelial. Las heridas adecuadas para el tratamiento incluyen las resultantes de traumatismos tales como quemaduras, abrasiones y cortes, así como las de procedimientos quirúrgicos tales como incisiones quirúrgicas e injertos de piel. Otras afecciones adecuadas para el tratamiento con el polipéptido de la presente invención incluyen las afecciones crónicas, tales como úlceras crónicas, úlceras diabéticas, y otras afecciones no cicatrizantes (tróficas).

TGF α -HII o un fragmento soluble del mismo se puede incorporar en vehículos fisiológicamente aceptables para la aplicación al área afectada. La naturaleza de los vehículos puede variar ampliamente, y dependerá de la localización de la aplicación deseada. Para la aplicación en la piel, se prefiere normalmente una base de crema o pomada; las bases adecuadas incluyen lanolina, Silvadene (Marion) (en particular para el tratamiento de quemaduras), Aquaphor (Duke Laboratories, South Norwalk, Conn.), y similares. Si se desea, será posible incorporar composiciones que contienen TGF α -HII en vendas y otros vendajes para heridas para posibilitar la exposición continua de la herida al péptido. También pueden tener uso las aplicaciones en aerosol.

La concentración de TGF α -HII en la composición de tratamiento no es crítica, pero debería ser suficiente para inducir la proliferación de las células epiteliales. Las composiciones se pueden aplicar de manera tópica en el área afectada, generalmente en forma de gotas oculares para el ojo o en forma de cremas, pomadas o lociones para la piel. En el caso de los ojos, es deseable un tratamiento frecuente, que se aplica normalmente a intervalos de 4 horas o menos. En la piel, es deseable mantener continuamente la composición de tratamiento sobre el área afectada durante la cicatrización, con aplicaciones de la composición de tratamiento de dos a cuatro veces al día, o con más frecuencia.

La cantidad empleada del polipéptido en cuestión variará con la forma de administración, el empleo de otros compuestos activos, y similares, que están en general en el intervalo de alrededor de 1 μ g a 100 μ g. El polipéptido en cuestión se puede emplear con un vehículo fisiológicamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato, o similares. La cantidad de compuesto empleada se determinará de forma empírica, basándose en la respuesta de las células *in vitro* y en la respuesta de los animales experimentales a los polipéptidos o formulaciones en cuestión que contienen los polipéptidos en cuestión.

El TGF α -HII o un fragmento soluble del mismo se puede emplear en la modulación de la angiogénesis, la resorción ósea, la respuesta inmunitaria, y las funciones efectoras sinápticas y neuronales. TGF α -HII se puede usar también en la modulación de la cascada del ácido araquidónico.

TGF α -HII o un fragmento soluble del mismo se puede emplear también para aplicaciones relacionadas con la diferenciación terminal. Muchos factores TGF α , y sus homólogos, inducen la diferenciación terminal en sus células objetivo. Esta propiedad se puede aprovechar *in vivo* administrando el factor e induciendo la muerte de la célula objetivo. Este régimen se está considerando para trastornos relacionados con la hiper-proliferación de tipos celulares médicamente indeseables, tales como cánceres y otros trastornos proliferativos (p.ej., inflamación, psoriasis, etc.). Además de la administración *in vivo*, existe una diversidad de situaciones en las que puede estar justificada la administración *in vitro*. Por ejemplo, la médula ósea se puede purgar de poblaciones celulares indeseables *in vitro* tratando las células con factores de crecimiento y/o derivados de los mismos.

Las aplicaciones también están relacionadas con la alopecia, la caída del pelo y otras afecciones cutáneas que pueden afectar al desarrollo folicular del pelo. Varias series de pruebas implican la participación de los factores de crecimiento TGF α en tales afecciones. Tal como se describió anteriormente, los ratones "con inactivación de genes" modificados para contener una mutación nula en el gen de TGF α exhiben anomalías relacionadas con la síntesis de pelo cuantitativa y cualitativa. Además, los estudios de cartografía en ratones han demostrado que

ciertas mutaciones que afectan al crecimiento del pelo se hallan en el locus del gen de TGF α (Mann et al, Cell 73:249-261(1993)). Las aplicaciones tópicas o sistémicas de TGF α -HII o de los derivados del mismo se pueden emplear para tratar ciertas formas de alopecia y pérdida del pelo, y estas reivindicaciones se hallan dentro del alcance de esta invención.

5 Ciertas patologías de enfermedades se pueden mejorar parcialmente o completamente mediante la administración clínica sistémica del factor de crecimiento TGF α -HII. Esta administración puede ser en forma de terapia génica (véase más adelante); o por medio de la administración de péptidos o proteínas sintetizadas a partir de construcciones recombinantes de ADN de TGF α -HII o a partir de la síntesis química de péptidos (Woo, et al., Protein Engineering 3:29-37 (1989)).

10 Esta descripción proporciona un método de cribado de compuestos para identificar compuestos agonistas o antagonistas para el polipéptido de la presente invención. Como ejemplo, se incubaba una célula de mamífero o una preparación de membranas que expresan un receptor TGF α -HII con un compuesto potencial, y se mide la capacidad del compuesto de generar una segunda señal a partir del receptor para determinar si es un agonista eficaz. Tales sistemas de segundos mensajeros incluyen, pero sin limitación, cAMP guanilato ciclasa, canales de iones o hidrólisis de fosfoinositol. Los antagonistas eficaces se determinan mediante el método anterior, en el que se detecta que un compuesto antagonista se une al receptor, pero no provoca una respuesta de segundo mensajero para bloquear con
15 ello el receptor de TGF α -HII.

Otro ensayo para la identificación de antagonistas potenciales específicos para los receptores para el polipéptido de la presente invención es un ensayo competitivo que comprende aislar membranas plasmáticas que sobreexpresan un receptor para el polipéptido de la presente invención, por ejemplo, células de carcinoma A431 humano. Se añade una muestra de ensayo diluida en serie en un medio (el volumen es de aproximadamente 10 microlitros) que contiene ¹²⁵I-TGF α -HII 10 nM a 5 microgramos de la membrana plasmática en presencia del compuesto antagonista potencial y se incubaba durante 4 horas a 4 °C. Las mezclas de reacción se diluyen y se pasan inmediatamente a través de un filtro millipore. Después los filtros se lavan rápidamente y se mide la radiactividad unida en un contador gamma. Entonces se mide la cantidad de TGF α -HII unido. También se lleva a cabo un ensayo de control en ausencia del compuesto para determinar si los antagonistas reducen la cantidad de TGF α -HII unido.
20
25

Los compuestos antagonistas potenciales incluyen un anticuerpo, o en ciertos casos, un oligopéptido, que se une al polipéptido. De manera alternativa, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada que se une al receptor que es una forma inactiva del polipéptido, y por lo tanto impide la acción del polipéptido de la presente invención.
30

Otro compuesto antagonista es una construcción antisentido preparada mediante el uso de la tecnología antisentido. Se puede usar la tecnología antisentido para controlar la expresión génica por medio de la formación de hélices triples o ADN o ARN antisentido, y ambos métodos se basan en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la porción codificante de 5' de la secuencia polinucleotídica, que codifica los polipéptidos maduros de la presente invención, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de una longitud de alrededor de 10 a 40 pares de bases. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice - véase Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney et al, Science, 241:456 (1988); y Dervan et al., Science, 251: 1360 (1991)), por lo que se impide la transcripción y la producción del polipéptido de la presente invención. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida al mRNA *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de mRNA hasta el polipéptido de la presente invención (Antisentido - Okano, J. Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Los oligonucleótidos anteriormente descritos también se pueden administrar a las células de forma que el ARN o ADN antisentido se puede expresar *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido de la presente invención.
35
40

Los compuestos antagonistas incluyen una pequeña molécula que se une al polipéptido de la presente invención y bloquea su acción en el receptor, de forma que se impide la actividad biológica normal. Las moléculas pequeñas también se pueden unir al receptor del polipéptido para impedir la unión. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, péptidos pequeños o moléculas pequeñas similares a péptidos.
45

Los antagonistas se pueden emplear para tratar una neoplasia, por ejemplo, cánceres y tumores. Se sabe que la inhibición de la secreción o de la producción de los miembros de la familia de EGF en las células tumorales en ratones provoca la regresión de los tumores.
50

Los antagonistas para los polipéptidos de la presente invención también se pueden usar terapéuticamente para el tratamiento de ciertos trastornos cutáneos, por ejemplo, psoriasis. Se ha descubierto que los niveles de expresión elevados de los miembros de esta familia de factores de crecimiento en biopsias de piel tomadas de enfermedades, tales como las lesiones psoriásicas, están elevados (Cook, et al., Cancer Research, 52:3224-3227 (1992)). Los antagonistas se pueden emplear en una composición con un vehículo farmacéuticamente aceptable, p.ej., como se describe más adelante en la presente memoria.
55

Los polipéptidos de la presente invención o los compuestos agonistas o antagonistas se pueden emplear en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido o compuesto, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal
60

vehículo incluye, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y las combinaciones de los mismos. La formulación debería ajustarse al modo de administración.

Los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden proporcionar en un paquete o equipo farmacéutico que comprende uno o más recipientes rellenos con uno o más de los ingredientes. Puede haber asociado a tal(es) recipiente(s) una advertencia en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la comercialización de productos farmacéuticos o productos biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la comercialización para la administración en seres humanos. Además, los polipéptidos o los compuestos de la presente invención se pueden emplear junto con otros compuestos terapéuticos.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar de una manera adecuada, tal como mediante la vía oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad que es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de la indicación específica. En general, se administran en una cantidad de al menos alrededor de 10 µg/kg de peso corporal, y en la mayoría de los casos se administrarán en una cantidad que no exceda de alrededor de 8 mg/kg de peso corporal por día. En la mayoría de los casos, la dosis es de alrededor de 10 µg/kg a alrededor de 1 mg/kg de peso corporal por día, teniendo en cuenta la vía de administración, los síntomas, etc.

Los polipéptidos, y los agonistas y antagonistas que son polipéptidos, se pueden emplear también de acuerdo con la presente invención mediante la expresión de tales polipéptidos *in vivo*, lo que a menudo se denomina "terapia génica".

Así, por ejemplo, las células de un paciente se pueden modificar con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica un polipéptido *ex vivo*, y después las células modificadas se proporcionan a un paciente a tratar con el polipéptido. Tales métodos se conocen bien en la técnica, y son evidentes a partir de las enseñanzas de la presente memoria. Por ejemplo, las células se pueden modificar mediante el uso de un vector plasmídico retroviral que contiene ARN que codifica un polipéptido de la presente invención.

De manera similar, las células se pueden modificar *in vivo* para la expresión de un polipéptido *in vivo*, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se transduce una célula de empaquetamiento con un vector plasmídico retroviral que contiene ARN que codifica un polipéptido de la presente invención, de forma que la célula de empaquetamiento produce ahora partículas virales infecciosas que contienen el gen de interés. Estas células productoras se pueden administrar a un paciente para la modificación de células *in vivo* y la expresión del polipéptido *in vivo*. Estos y otros métodos para administrar un polipéptido de la presente invención mediante tal método deberían ser evidentes para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente invención.

Los retrovirus a partir de los cuales pueden proceder los vectores plasmídicos retrovirales mencionados anteriormente en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, el virus de la leucemia murina de Moloney, virus de la necrosis esplénica, retrovirus tales como virus del sarcoma de Rous, virus del sarcoma de Harvey, virus de leucosis aviar, virus de la leucemia del mono gibón, virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus de sarcoma mieloproliferativo, y virus de tumor mamario. En una realización, el vector plasmídico retroviral deriva del virus de la leucemia murina de Moloney.

El vector incluye uno o más promotores. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, LTR retroviral; el promotor de SV40; y el promotor de citomegalovirus (CMV) humano descrito en Miller, et al., *Biotechniques*, Vol. 7, N° 9, 980-990 (1989), o cualquier otro promotor (p.ej., promotores celulares tales como los promotores celulares eucarióticos que incluyen, pero sin limitación, los promotores de histona, pol III, y β-actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, promotores de adenovirus, promotores de timidina quinasa (TK), y promotores de parvovirus B19. La selección de un promotor adecuado será evidente para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas contenidas en la presente memoria.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente invención está bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral; o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor de virus sincitial respiratorio (RSV); promotores inducibles, tales como el promotor de MMT, el promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1; promotores de globinas humanas; promotores de timidina quinasa virales, tales como el promotor de timidina quinasa de herpes simple; LTRs retrovirales (que incluyen las LTRs retrovirales modificadas anteriormente descritas en la presente memoria); el promotor de β-actina; y los promotores de hormona del crecimiento humana. El promotor puede ser también el promotor nativo que controla el gen que codifica el polipéptido.

El vector plasmídico retroviral se emplea para transducir líneas de células de empaquetamiento para formar líneas de células productoras. Los ejemplos de las células de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, pero sin limitación, las líneas celulares PE501, PA317, ψ-2, ψ-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ψCRE, ψCRIP, GP+E-86, GP+envAm12, y DAN descritas en Miller, *Human Gene Therapy*, Vol. 1, págs. 5-14 (1990), que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad. El vector puede transducir las células de

empaquetamiento por cualquier medio conocido en la técnica. Tales medios incluyen, pero sin limitación, la electroporación, el uso de liposomas, y la precipitación con CaPO₄. En una alternativa, el vector plasmídico retroviral se puede encapsular en un liposoma, o acoplarlo a un lípido, y después administrarlo a un hospedador.

5 La línea celular productora genera partículas de vectores retrovirales infecciosas que incluyen la(s) secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) los polipéptidos. Tales partículas de vectores retrovirales se pueden emplear después para transducir células eucarióticas, *in vitro* o *in vivo*. Las células eucarióticas transducidas expresarán la(s) secuencia(s) de ácido(s) nucleico(s) que codifica(n) el polipéptido. Las células eucarióticas que se pueden transducir incluyen, pero sin limitación, células pluripotenciales embrionarias, células de carcinoma embrionario, así como células pluripotenciales hematopoyéticas, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales, y células epiteliales bronquiales.

10 Esta invención se refiere también al uso del gen de la presente invención como diagnóstico. La detección de una forma mutada del gen de la presente invención permitirá un diagnóstico de una enfermedad o una susceptibilidad a una enfermedad que resulta de la expresión insuficiente del polipéptido de la presente invención, por ejemplo, la cicatrización inadecuada de heridas, la función neurológica inadecuada, trastornos oculares, trastornos renales y hepáticos, desarrollo folicular del pelo, angiogénesis y embriogénesis.

15 Los individuos que portan mutaciones en el gen humano de la presente invención se pueden detectar a nivel del ADN mediante una diversidad de técnicas. Se pueden obtener ácidos nucleicos para el diagnóstico a partir de las células de un paciente, tal como de sangre, orina, saliva, biopsia de tejidos y material de autopsia. El ADN genómico se puede usar directamente para la detección, o se puede amplificar enzimáticamente mediante el uso de PCR (Saiki et al., Nature, 324:163-166 (1986)) antes del análisis. También se puede usar ARN o cADN para el mismo fin. Como ejemplo, se pueden usar cebadores de PCR complementarios al ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención para identificar y analizar las mutaciones del mismo. Por ejemplo, se pueden detectar deleciones e inserciones mediante un cambio del tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Se pueden identificar mutaciones puntuales hibridando el ADN amplificado a ARN radiomarcado, o de manera alternativa, a secuencias de ADN antisentido radiomarcadas. Las secuencias perfectamente coincidentes se pueden distinguir de las moléculas bicatenarias emparejadas de manera incorrecta mediante una digestión con RNasa A o por las diferencias en las temperaturas de fusión.

20 Las diferencias de secuencia entre el gen de referencia y los genes que tienen mutaciones se pueden revelar mediante el método de secuenciación directa de ADN. Además, se pueden emplear segmentos de ADN clonados como sondas para detectar segmentos de ADN específicos. La sensibilidad de este método aumenta enormemente cuando se combina con la PCR. Por ejemplo, se usa un cebador de secuenciación con un producto de PCR bicatenario o una molécula molde monocatenaria generada mediante una PCR modificada. La determinación de la secuencia se lleva a cabo mediante procedimientos convencionales con nucleótidos radiomarcados o mediante procedimientos de secuenciación automáticos con marcadores fluorescentes.

25 Los ensayos genéticos basados en las diferencias de secuencias de ADN se pueden llevar a cabo mediante la detección de la alteración de la movilidad electroforética de los fragmentos de ADN en geles con o sin agentes desnaturizantes. Las deleciones e inserciones de secuencias pequeñas se pueden visualizar mediante electroforesis en gel de alta resolución. Los fragmentos de ADN de las diferentes secuencias se pueden distinguir en geles con gradiente de formamida desnaturizantes en los que las movilidades de los diferentes fragmentos de ADN se retrasan en el gel en diferentes posiciones según sus temperaturas de fusión específicas o sus temperaturas de fusión parcial (véase, p.ej., Myers et al., Science, 230:1242 (1985)).

30 Los cambios de secuencia en lugares específicos se puede revelar también mediante ensayos de protección de nucleasas, tales como la protección de RNasa y S1 o el método de escisión química (p.ej., Cotton et al., PNAS, USA, 85:4397-4401 (1985)).

35 Así, la detección de una secuencia de ADN específica se puede llevar a cabo mediante métodos tales como hibridación, protección de RNasa, escisión química, secuenciación directa de ADN o el uso de enzimas de restricción (p.ej., polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)) y transferencia de Southern de ADN genómico.

40 Además de la electroforesis en gel y la secuenciación de ADN más convencionales, las mutaciones se pueden detectar también mediante análisis *in situ*.

45 La presente descripción se refiere además a ensayos diagnósticos para la detección de niveles alterados del polipéptido de la presente invención en diversos tejidos, ya que la sobreexpresión de las proteínas en comparación con las muestras de tejidos normales de control puede detectar la presencia de ciertos estados patológicos, tales como neoplasia, trastornos cutáneos, trastornos oculares e inflamación. Los ensayos usados para detectar los niveles del polipéptido de la presente invención en una muestra derivada de un hospedador son muy conocidos para los expertos en la técnica, e incluyen los radioinmunoensayos, ensayos de unión competitiva, análisis de transferencia de Western y preferiblemente un ensayo ELISA. Un ensayo ELISA comprende inicialmente preparar un anticuerpo específico hacia un antígeno del polipéptido de la presente invención, preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Además, se prepara un anticuerpo indicador hacia el anticuerpo monoclonal. Se une un reactivo detectable al anticuerpo indicador, tal como radiactividad, fluorescencia o en este ejemplo una enzima

peroxidasa de rábano. A continuación se extrae una muestra de un hospedador y se incuba en un soporte sólido, p.ej. una placa de poliestireno, que une las proteínas de la muestra. Cualquier sitio de unión de proteína libre de la placa se cubre después mediante la incubación con una proteína inespecífica tal como albúmina de suero bovino. A continuación, el anticuerpo monoclonal se incuba en la placa, durante cuyo tiempo los anticuerpos monoclonales se unen a los polipéptidos de la presente invención unidos a la placa de poliestireno. Todo el anticuerpo monoclonal sin unir se elimina mediante lavado con tampón. El anticuerpo indicador unido a peroxidasa de rábano se coloca a continuación en la placa, lo que da como resultado la unión del anticuerpo indicador al anticuerpo monoclonal unido a los polipéptidos de la presente invención. El anticuerpo indicador sin unir se elimina después mediante lavado. Después se añaden los sustratos de la peroxidasa a la placa, y la cantidad de color desarrollada en un período de tiempo dado es una medida de la cantidad de proteína presente en un volumen dado de muestra del paciente en comparación con una curva patrón.

También se puede emplear un ensayo competitivo para determinar los niveles del polipéptido de la presente invención en una muestra procedente del hospedador. Tal ensayo comprende aislar membranas plasmáticas que sobreexpresan el receptor del polipéptido de la presente invención. Después se añade una muestra de ensayo que contiene los polipéptidos de la presente invención que se han marcado a las membranas plasmáticas y después se incuba durante un período de tiempo determinado. También se añade a la mezcla de reacción una muestra procedente de un hospedador que se sospecha que contiene el polipéptido de la presente invención. Las mezclas de reacción se pasan después a través de un filtro que se lava rápidamente, y después se mide la radiactividad unida para determinar la cantidad de competición por los receptores, y por lo tanto la cantidad de los polipéptidos de la presente invención en la muestra.

Se pueden usar anticuerpos específicos hacia TGF α -HII para el diagnóstico y la terapia del cáncer, ya que muchos tipos de células cancerosas tienen niveles elevados de diversos miembros de la familia de TGF α durante el proceso de la neoplasia o hiperplasia. Estos anticuerpos se unen e inactivan TGF α -HII. Los anticuerpos monoclonales hacia TGF α -HII (y/o los miembros de su familia) tienen uso clínico para el diagnóstico y la terapia de ciertos trastornos que incluyen (pero sin limitación) las anomalías del crecimiento hiperplásico y neoplásico. El aumento de la expresión del factor de crecimiento por los tejidos neoplásicos constituye la base de una diversidad de ensayos en suero que detectan los incrementos del factor de crecimiento en la sangre de los pacientes afectados. Estos ensayos se aplican en general no solamente en situaciones de diagnóstico, sino que se aplican también en situaciones de pronóstico (para detectar la presencia de células tumorales ocultas tras la cirugía, quimioterapia, etc.).

Además, las células malignas que expresan el receptor de TGF α -HII se pueden detectar mediante el uso de TGF α -HII marcado en un ensayo de unión a receptor, o mediante el uso de anticuerpos hacia el propio receptor de TGF α -HII. Las células se pueden distinguir de acuerdo con la presencia y la densidad de receptores para TGF α -HII, por lo que se proporciona un medio para predecir la susceptibilidad de tales células a las actividades biológicas de TGF α -HII.

Las secuencias de la presente invención también son valiosas para la identificación de cromosomas. La secuencia se dirige específicamente y puede hibridar con una localización particular en un cromosoma humano individual. Además, actualmente existe la necesidad de identificar sitios particulares en el cromosoma. Actualmente están disponibles unos cuantos reactivos que marcan los cromosomas basados en datos de secuencia reales (polimorfismos de repeticiones) para marcar las localizaciones cromosómicas. La cartografía de los ADN en los cromosomas según la presente invención es una primera etapa importante en correlacionar esas secuencias con los genes asociados a una enfermedad.

Brevemente, las secuencias se pueden cartografiar en cromosomas preparando cebadores de PCR (preferiblemente 15-25 pb) a partir del cADN. El análisis informático de la región sin traducir de 3' del gen se usa para seleccionar rápidamente los cebadores que no abarcan más de un exón del ADN genómico, complicando así el procedimiento de amplificación. Estos cebadores se usan después para el cribado mediante PCR de híbridos de células somáticas que contienen cromosomas humanos individuales. Solamente aquellos híbridos que contienen el gen humano correspondiente al cebador producirán un fragmento amplificado.

La cartografía mediante PCR de los híbridos de células somáticas es un procedimiento rápido para asignar un ADN particular a un cromosoma particular. Mediante el uso de la presente invención con los mismos cebadores oligonucleotídicos, se puede llevar a cabo la sublocalización con paneles de fragmentos de cromosomas específicos o mezclas de grandes clones genómicos de una manera análoga. Otras estrategias de cartografía que se pueden usar de manera similar para cartografiar el cromosoma incluyen la hibridación *in situ*, precibando con cromosomas marcados clasificados mediante citometría de flujo y la preselección mediante hibridación para construir bibliotecas de cADN específicas del cromosoma.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de un clon de cADN en una extensión cromosómica en metafase se puede usar para proporcionar una localización cromosómica precisa en una etapa. Esta técnica se puede usar con un cADN corto de 50 ó 60 bases. Para una revisión de esta técnica, véase Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988).

Una vez que se ha cartografiado una secuencia en una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma se puede correlacionar con datos de cartografía genética. Tales datos se hallan,

por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en línea a través de la Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre genes y enfermedades que se han cartografiado en la misma región cromosómica se identifica después por medio del análisis de ligamiento (herencia conjunta de genes físicamente adyacentes).

5 A continuación, es necesario determinar las diferencias del cADN o la secuencia genómica entre los individuos afectados y no afectados. Si se observa una mutación en algunos o en todos los individuos afectados pero no en ningún individuo normal, entonces es probable que la mutación sea el agente causante de la enfermedad.

10 Con la resolución actual de las técnicas de cartografía física y cartografía genética, un cADN localizado con precisión en una región cromosómica asociada a la enfermedad podría ser uno de entre 50 y 500 genes causantes potenciales (esto supone una resolución de cartografía de 1 megabase y un gen por cada 20 kb).

15 Los polipéptidos, sus fragmentos u otros derivados, o los análogos de los mismos, o las células que los expresan se pueden usar como inmunógenos para producir anticuerpos hacia ellos. Estos anticuerpos pueden ser, por ejemplo, anticuerpos policlonales o monoclonales. La presente invención incluye también anticuerpos quiméricos, de cadena simple, y anticuerpos humanizados, así como fragmentos Fab, o el producto de una biblioteca de expresión de Fab. Se pueden usar diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de tales anticuerpos y fragmentos.

20 Los anticuerpos generados contra los polipéptidos que corresponden a una secuencia de la presente invención se pueden obtener mediante inyección directa de los polipéptidos en un animal o administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal que no es un ser humano. El anticuerpo así obtenido se unirá después a los polipéptidos propiamente dichos. De esta manera, se puede usar incluso una secuencia que codifique solamente un fragmento de los polipéptidos para generar anticuerpos que se unen a los polipéptidos nativos completos. Tales anticuerpos se pueden usar para aislar el polipéptido a partir del tejido que expresa ese polipéptido.

25 Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos de líneas celulares continuos. Los ejemplos incluyen la técnica de hibridomas (Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497), la técnica de triomas, la técnica de hibridomas de células B humanas (Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72), y la técnica de hibridomas de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole, et al., 1985, en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96).

30 Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena simple (patente de EE.UU. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena simple hacia productos polipeptídicos inmunógenos de esta invención. Además, se pueden usar ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados hacia productos polipeptídicos inmunógenos de esta invención.

35 La presente invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos; sin embargo, se debe entender que la presente invención no se limita a tales ejemplos. Todas las partes o cantidades, a menos que se especifique de otra manera, están en peso.

Para facilitar la comprensión de los siguientes ejemplos, se describirán métodos y/o expresiones que se dan con frecuencia.

40 Los "plásmidos" se designan mediante una p minúscula precedida y/o seguida por letras mayúsculas y/o números. Los plásmidos de partida de la presente memoria están disponibles comercialmente, disponibles públicamente sin restricciones, o se pueden construir a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con los procedimientos publicados. Además, se conocen en la técnica plásmidos equivalentes a los descritos, y serán evidentes para el técnico experto.

45 La "digestión" de ADN se refiere a la escisión catalítica del ADN con una enzima de restricción que actúa solamente en ciertas secuencias del ADN. Las diversas enzimas de restricción usadas en la presente memoria están disponibles comercialmente, y sus condiciones de reacción, cofactores y otros requerimientos se usaron de la forma que conocería el técnico experto. Para fines analíticos, se usa en general 1 µg de plásmido o de fragmento de ADN con alrededor de 2 unidades de enzima en alrededor de 20 µl de disolución tampón. Con el fin de aislar los fragmentos de ADN para la construcción del plásmido, se digieren en general 5 a 50 µg de ADN con 20 a 250 unidades de enzima en un volumen mayor. El fabricante especifica los tampones adecuados y las cantidades de sustrato para las enzimas de restricción particulares. Normalmente se usan tiempos de incubación de alrededor de 1 hora a 37 °C, pero pueden variar de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Tras la digestión, la reacción se somete a electroforesis directamente en un gel de poliacrilamida para aislar el fragmento deseado.

55 La separación por tamaños de los fragmentos escindidos se lleva a cabo mediante el uso de un gel de poliacrilamida al 8% descrito por Goeddel, D. et al., Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980).

Los "oligonucleótidos" se refieren a un polidesoxinucleótido monocatenario o dos cadenas complementarias de polidesoxinucleótidos que se pueden sintetizar químicamente. Tales oligonucleótidos sintéticos no tienen fosfato en 5', y así no se ligarán a otro oligonucleótido sin añadir un fosfato con un ATP en presencia de una quinasa. Un oligonucleótido sintético se ligará a un fragmento que no haya sido desfosforilado.

5 La "ligadura" se refiere al proceso de formar enlaces fosfodiéster entre dos fragmentos de ácidos nucleicos bicatenarios (Maniatis, T., et al., Id., p. 146). A menos que se indique de otra manera, la ligadura se puede llevar a cabo mediante el uso de tampones y condiciones conocidas con 10 unidades de ADN ligasa de T4 ("ligasa") por 0,5 µg de aproximadamente cantidades equimolares de los fragmentos de ADN a ligar.

10 A menos que se indique de otra manera, la transformación se llevó a cabo como se describió en el método de Graham, F. y Van der Eb, A., Virology, 52:456-457 (1973).

Ejemplo 1

Expresión Bacteriana y Purificación de la Forma Soluble de TGFα-HII

15 La secuencia de ADN que codifica TGFα-HII, ATCC n° 97160, se amplificó inicialmente mediante el uso de cebadores oligonucleotídicos de PCR que correspondían a las secuencias de 5' de la proteína TGFα-HII procesada (menos la secuencia del péptido señal) y las secuencias del vector en 3' del gen de TGFα-HII. Se añadieron nucleótidos adicionales que correspondían a TGFα-HII a las secuencias de 5' y 3', respectivamente. El cebador oligonucleotídico de 5' tiene la secuencia 5' CCCGGATCCGCACGAGACATACCTTGTCCG 3' (SEQ ID NO:3) y contiene un sitio de enzima de restricción BamHI (en negrita) seguido por 21 nucleótidos de la secuencia codificante de TGFα-HII que comienza a partir del aminoácido terminal supuesto del codón de la proteína procesada. La secuencia de 3', 5' GGGAAGCTTTAATACTGAAATCGTACAGGAC 3', (SEQ ID NO:4) contiene secuencias complementarias a un sitio de Hind III y va seguida por 23 nucleótidos de TGFα-HII. Los sitios de enzimas de restricción corresponden a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión bacteriano pQE-9 (Qiagen, Inc. Chatsworth, CA, 91311), pQE-9 codifica una resistencia a antibióticos (Amp^r), un origen de replicación bacteriano (ori), un operador promotor (P/O) regulable de IPTG, un sitio de unión al ribosoma (RES), un marcador 6-His y sitios de enzimas de restricción, pQE-9 se digirió después con BamHI y HindIII. Las secuencias amplificadas se ligaron en pQE-9 y se insertaron en el marco de lectura con la secuencia que codifica el marcador de histidinas y el RBS. La mezcla de ligadura se usó después para transformar la cepa de *E. coli* M15/rep 4 (Qiagen, Inc.) mediante el procedimiento descrito en Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989). M15/rep4 contiene múltiples copias del plásmido pREP4, que expresa el represor lacI y también confiere resistencia a kanamicina (Kan^r). Los transformantes se identificaron por su capacidad de crecer en placas LB y se seleccionaron las colonias resistentes a ampicilina/kanamicina. Se aisló el ADN plasmídico y se confirmó mediante análisis de restricción. Los clones que contenían las construcciones deseadas se cultivaron durante la noche (O/N) en cultivo líquido en medios LB complementados tanto con Amp (100 µg/ml) como con Kan (25 µg/ml). El cultivo O/N se usó para inocular un gran cultivo en una proporción de 1:100 a 1:250. Las células se cultivaron a una densidad óptica a 600 (D.O. 600) de entre 0,4 y 0,6. Después se añadió IPTG ("Isopropil-B-D-tiogalacto piranósido") a una concentración final de 1 mM. IPTG induce inactivando el represor lacI, liberando el P/O, lo que conduce a una expresión génica incrementada. Las células se cultivaron durante otras 3 a 4 horas. Después las células se recogieron mediante centrifugación. El sedimento celular se solubilizó en el agente caotrópico Guanidina-HCl 6 Molar. Tras el aclarado, se purificó el TGFα-HII solubilizado a partir de esta disolución mediante cromatografía en una columna de quelato de níquel en condiciones que permiten la unión fuerte de las proteínas que contienen el marcador de 6-His (Hochuli, E. et al., J. Chromatography 411:177-184 (1984)). TGFα-HII (85% puro) se eluyó de la columna en guanidina-HCl 6 molar de pH 5,0, y para la renaturalización se ajustó a guanidina-HCl 3 molar, fosfato sódico 100 mM, glutatión 10 molar (reducido) y glutatión 2 molar (oxidado). Tras la incubación en esta disolución durante 12 horas, la proteína se dializó con fosfato sódico 10 molar.

Ejemplo 2

Clonación y Expresión de TGFα-HII Mediante el Uso del Sistema de Expresión de Baculovirus

La secuencia de ADN que codifica las proteínas TGFα-HII de tamaño completo, ATCC n° 97160, se amplificó mediante el uso de cebadores oligonucleotídicos de PCR que correspondían a las secuencias de 5' y 3' del gen:

50 Se usaron tres grupos de cebadores:

El primer grupo de cebadores es

5' CGCGGATCGCCATCATGGTGCTGTGGGAGTCC 3' (SEQ ID NO: 5)

y 5' GCGTCTAGACTAGTATAGAACACTGTAGTCC 3' (SEQ ID NO:6), esta construcción comienza en el nucleótido 321 y termina en el nucleótido 1248 de SEQ ID NO:1, e incluye la secuencia líder supuesta;

55 El segundo grupo de cebadores es

5' CGCGGATCGCCATCATGCTACTCATCGTAGCC 3' (SEQ ID NO:7)

5' GCGTCTAGACTAGTATAGAACACTGTAGTCC 3' (SEQ ID NO:8), esta construcción comienza en el nucleótido 402 y termina en el nucleótido 1248 de SEQ ID NO:1, y excluye la secuencia líder supuesta;

El tercer grupo de cebadores es

5' CGCGGATCCAGAACCACACATACCTTGTCCG 3' (SEQ ID NO:9)

5 5' GCGTCTAGACTAGTATAGAACACTGTAGTCC 3' (SEQ ID NO:10), esta construcción comienza en el nucleótido 1100 y termina en el nucleótido 1248 de SEQ ID NO:1, y es la porción soluble supuesta del polipéptido. Los tres cebadores de 5' tienen un sitio para la enzima de restricción BamHI (en negrita) seguido por nucleótidos que se parecen a una señal eficaz de iniciación de la traducción en las células eucarióticas (Kozak, M., J. Mol. Biol., 196:947-950 (1987) (el codón de iniciación para la traducción "ATG" está subrayado). Para el tercer grupo de cebadores, se construyó la secuencia del péptido señal de baculovirus en el vector pA2GP.

15 Las secuencias cebadoras de 3' contienen el sitio de escisión para la endonucleasa de restricción XbaI, y tienen nucleótidos complementarios al dominio de 3' de TGF α del gen de TGF α -HII. Las secuencias amplificadas se aislaron de un gel de agarosa al 1% mediante el uso de un equipo disponible comercialmente ("GeneClean", BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). El fragmento se digirió después con las endonucleasas BamHI y XbaI y después se purificó de nuevo en un gel de agarosa al 1%. Este fragmento se denominó F2.

20 El vector pA2 se usó para los primeros dos grupos de cebadores y el vector pA2GP se usó con el tercer grupo de cebadores. El vector pA2 (modificación del vector pVL941, discutido más adelante) se usó para la expresión de la proteína TGF α -HII mediante el uso del sistema de expresión de baculovirus (para una revisión, véase: Summers, M.D. y Smith, G.E. 1987, A manual of methods for baculovirus vectors and inspect cell culture procedures, Texas Agricultural Experimental Station Bulletin No. 1555). Este vector de expresión contiene el promotor potente de polihedrina del virus de la polihedrosis nuclear de Autographa californica (AcMNPV) seguido por los sitios de reconocimiento para las endonucleasas de restricción. Se usó el sitio de poliadenilación del virus simio (SV)40 para una poliadenilación eficaz. Para la selección sencilla del virus recombinante, se insertó el gen de β -galactosidasa de E. coli en la misma orientación que el promotor de polihedrina seguido por la señal de poliadenilación del gen de polihedrina. Las secuencias de polihedrina estaban flanqueadas a ambos lados por secuencias virales para la recombinación homóloga mediada por células de ADN viral de tipo natural co-transfectado. Se podrían usar otros muchos vectores de baculovirus en lugar de pRG1, tales como pAc373, pVL941 y pAcIMI (Luckow, V.A. y Summers, M.D., Virology, 170: 31-39).

30 El plásmido se digirió con las enzimas de restricción BamHI y XbaI y después se desfosforiló mediante el uso de fosfatasa intestinal bovina mediante procedimientos conocidos en la técnica. El ADN se aisló después de un gel de agarosa al 1% mediante el uso del equipo disponible comercialmente ("GeneClean" BIO 101 Inc., La Jolla, Ca.). Este ADN vector se denominó V2.

35 El fragmento F2 y el plásmido V2 desfosforilado se ligaron con ADN ligasa de T4. Las células de E. coli HB101 se transformaron después y se identificaron las bacterias que contenían el plásmido (pBacTGF α -HII) con el gen TGF α -HII mediante el uso de las enzimas de restricción BamHI y XbaI. La secuencia del fragmento clonado se confirmó mediante la secuenciación del ADN.

40 Se co-transfectaron 5 μ g del plásmido pBacTGF α -HII con 1,0 μ g de un baculovirus linealizado disponible comercialmente ("BaculoGold™ baculovirus DNA", Pharmingen, San Diego, CA.) mediante el uso del método de lipofección (Felgner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7413-7417 (1987)).

45 Se mezcló 1 μ g de ADN de virus BaculoGold™ y 5 μ g del plásmido pBacTGF α -HII en un pocillo estéril de una placa de microtitulación que contenía 50 μ l de medio de Grace exento de suero (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). Después, se añadieron 10 μ l de Lipofectina más 90 μ l de medio de Grace, se mezclaron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después se añadió la mezcla de transfección gota a gota a las células de insecto Sf9 (ATCC CRL 1711) sembradas en una placa de cultivo de tejidos de 35 mm con 1 ml de medio de Grace sin suero. La placa se balanceó hacia atrás y hacia adelante para mezclar la disolución recién añadida. Después se incubó la placa durante 5 horas a 27 °C. Después de 5 horas, la disolución de transfección se eliminó de la placa y se añadió 1 ml de medio de insecto de Grace complementado con un 10% de suero bovino fetal. La placa se volvió a colocar en un incubador y se continuó con el cultivo a 27 °C durante cuatro días.

50 Después de cuatro días, se recogió el sobrenadante y se llevó a cabo un ensayo de placas similar al descrito por Summers y Smith (anteriormente mencionados). Como modificación, se usó un gel de agarosa con "Blue Gal" (Life Technologies Inc., Gaithersburg) que permite el aislamiento sencillo de las placas teñidas de azul (también se puede hallar una descripción detallada de un "ensayo de placas" en la guía del usuario para el cultivo de células de insecto y baculovirología distribuido por Life Technologies Inc., Gaithersburg, páginas 9-10).

55 Cuatro días tras la dilución en serie, el virus se añadió a las células y las placas teñidas de azul se recogieron con la punta de una pipeta Eppendorf. El agar que contenía los virus recombinantes se resuspendió después en un tubo Eppendorf que contenía 200 μ l de medio de Grace. El agar se eliminó mediante una centrifugación breve y el sobrenadante que contenía el baculovirus recombinante se usó para infectar células Sf9

sembradas en placas de 35 mm. Cuatro días más tarde, los sobrenadantes de estas placas de cultivo se recogieron y se almacenaron a 4 °C.

Se cultivaron células Sf9 en medio de Grace complementado con un 10% de FBS inactivado térmicamente. Las células se infectaron con el baculovirus recombinante V-TGF α -HII a una multiplicidad de infección (MOI) de 2. Seis horas más tarde, se eliminó el medio y se sustituyó con medio SF900 II menos metionina y cisteína (Life Technologies Inc., Gaithersburg). 42 horas más tarde, se añadieron 5 μ Ci de 35 S-metionina y 5 μ Ci de 35 S-cisteína (Amersham). Las células se incubaron adicionalmente durante 16 horas antes de recogerlas mediante centrifugación, y las proteínas marcadas se visualizaron mediante SDS-PAGE y autorradiografía.

Ejemplo 3

10 Expresión de TGF α -HII Recombinante en Células COS

La expresión del plásmido de TGF α -HII HA procedió de un vector pcADN3/Amp (Invitrogen) que contenía: 1) origen de replicación de SV40, 2) gen de resistencia a ampicilina, 3) origen de replicación de E. coli, 4) promotor de CMV seguido por una región poliligadora, un intrón de SV40 y un sitio de poliadenilación. Se clonó un ADN, un fragmento que codifica el precursor de TGF α -HII completo y un marcador de HA en el marco de lectura a su extremo 3' en la región del poliligador del vector, por lo tanto, la expresión de la proteína recombinante estaba dirigida por el promotor de CMV. El marcador de HA corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe tal como se describió previamente (I. Wilson, H. Niman, R. Heighten, A. Cherenson, M. Connolly, y R. Lerner, 1984, Cell 37:767, (1984)). La infusión del marcador de HA a la proteína objetivo permite la detección sencilla de la proteína recombinante con un anticuerpo que reconoce el epítipo de HA.

20 La estrategia de construcción del plásmido se describe como sigue:

La secuencia de ADN que codifica TGF α -HII, ATCC n° 97160, se construyó mediante PCR del EST original clonado mediante el uso de dos cebadores: el cebador de 5', 5' CGCGGATCCGCCATCATGGTGCTGTGGGAGTCC 3' (SEQ ID NO:11) contiene un sitio BamHI (en negrita) seguido de 18 nucleótidos de TGF α -HII que codifican la secuencia que comienza a partir del codón de iniciación; la secuencia de 3', 5' GCGTCGAGGTATAGAAC ACTGTAGTCC 3' (SEQ ID NO:12) contiene secuencias complementarias a un sitio XhoI, los últimos 19 nucleótidos del dominio de TGF α y un sitio XhoI. El vector pcADN3/Amp contiene sitios de clonación BamHI/XhoI que llevan al inserto de PCR en el marco de lectura del marcador de HA de 3' seguido por un codón de parada. Por lo tanto, el producto de PCR contiene un sitio BamHI, una secuencia codificante de 936 pares de bases y un sitio XhoI. El fragmento de ADN amplificado mediante PCR y el vector, pcADN3/Amp, se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y XhoI y se ligaron. La mezcla de ligadura se transformó en la cepa de E. coli SURE (disponible de Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037), el cultivo transformado se colocó en placas con medio de ampicilina y se seleccionaron las colonias resistentes. Se aisló el ADN plasmídico de los transformantes y se examinó mediante análisis de restricción en busca de la presencia del fragmento correcto. Para la expresión del TGF α -HII recombinante, se transfectaron células COS con el vector de expresión mediante el método de DEAE-DEXTRANO (J. Sambrook, E. Fritsch, T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Laboratory Press, (1989)). Se detectó la expresión de la proteína TGF α -HII HA mediante un método de radiomarcado e inmunoprecipitación (E. Harlow, D. Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1988)). Las células se marcaron durante 8 horas con 35 S-cisteína dos días tras la transfección. Los medios de cultivo se recogieron después y las células se lisaron con detergente (tampón RIPA (NaCl 150 mM, 1% de NP-40, 0,1% de SDS, 1% de NP-40, 0,5% de DOC, Tris 50 mM, pH 7,5) (Wilson, I. et al., Id. 37:767 (1984)). Tanto el lisado de células como los medios de cultivo se precipitaron con un anticuerpo monoclonal específico de HA. Las proteínas precipitadas se analizaron en geles de SDS-PAGE del 15%.

45 Ejemplo 4

Expresión por Medio de Terapia Génica

Se obtienen fibroblastos de un sujeto mediante biopsia de piel. El tejido resultante se coloca en un medio de cultivo de tejidos y se separa en pequeños trozos. Los pedazos pequeños de tejido se colocan en una superficie húmeda de un matraz de cultivo de tejidos, y se colocan aproximadamente diez trozos en cada matraz. El matraz se coloca boca abajo, se cierra herméticamente y se deja a temperatura ambiente durante la noche. Después de 24 horas a temperatura ambiente, el matraz se invierte y los pedazos de tejido permanecen fijos en el fondo del matraz, y se añade medio reciente (p.ej., medio F12 de Ham, con un 10% de FBS, penicilina y estreptomycin). Esto se incubó después a 37 °C durante aproximadamente una semana. En ese momento, se añade medio reciente y posteriormente se cambia cada varios días. Después de otras dos semanas de cultivo, surge una monocapa de fibroblastos. La monocapa se digiere con tripsina y se transfiere a matraces mayores.

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

5 El cADN que codifica un polipéptido de la presente invención se amplifica mediante el uso de cebadores de PCR que corresponden a las secuencias de los extremos 5' y 3', respectivamente. El cebador de 5' que contiene un sitio EcoRI y el cebador de 3' incluyen además un sitio HindIII. Se añaden cantidades iguales del esqueleto lineal del virus de sarcoma murino de Moloney y el fragmento EcoRI y HindIII amplificado, en presencia de la ADN ligasa de T4. La mezcla resultante se mantiene en condiciones adecuadas para la ligadura de los dos fragmentos. La mezcla de ligadura se usa para transformar bacterias HB101, que después se colocan en placas de agar que contienen kanamicina con el fin de confirmar que el vector tenía el gen de interés insertado de manera adecuada.

10 Las células de empaquetamiento pA317 o GP+am12 anfotrópicas se cultivan en un cultivo de tejidos hasta una densidad confluyente en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con un 10% de suero bovino (SB), penicilina y estreptomina. El vector MSV que contiene el gen se añade después a los medios y las células de empaquetamiento se transducen con el vector. Las células de empaquetamiento producen ahora partículas virales infecciosas que contienen el gen (las células de empaquetamiento se denominan ahora células productoras).

15 Se añade medio fresco a las células productoras transducidas, y posteriormente, el medio se recoge de una placa de 10 cm de células productoras confluentes. El medio gastado, que contiene las partículas virales infecciosas, se filtra a través de un filtro millipore para eliminar las células productoras sueltas, y este medio se usa después para infectar fibroblastos. El medio se elimina de una placa sub-confluyente de fibroblastos, y se sustituye rápidamente con el medio de las células productoras. Este medio se elimina y se sustituye con medio reciente. Si el título de virus es elevado, entonces prácticamente todos los fibroblastos están infectados, y no es necesaria su selección. Si el título es muy bajo, entonces es necesario usar un vector retroviral que tenga un marcador seleccionable, tal como neo o his.

20 Los fibroblastos modificados se inyectan después en el hospedador, solos o después de haber sido cultivados hasta la confluencia con esferas microportadoras cytodex 3. Los fibroblastos producen ahora el producto de proteína.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: WEI, ET AL.
(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Factor de Crecimiento Transformante Alfa HII
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 12
(iv) DIRECCIÓN POSTAL:
(A) DESTINATARIO: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI, STEWART & OLSTEIN
(B) CALLE: 6 BECKER FARM ROAD
(C) CIUDAD: ROSELAND
10 (D) ESTADO: NEW JERSEY
(E) PAÍS: EE.UU.
(F) CÓDIGO POSTAL: 07068
(v) FORMATO LEGIBLE POR ORDENADOR:
(A) TIPO DE MEDIO: DISCO DE 3,5 PULGADAS
15 (B) ORDENADOR: IBM PS/2
(C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS
(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: WORD PERFECT 5.1
(vi) DATOS DE LA SOLICITUD EN CURSO:
20 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
(B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
(C) CLASIFICACIÓN:
(vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:
(A) NÚMERO DE SOLICITUD: NINGUNO
25 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: NINGUNO
(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:
(A) NOMBRE: FERRARO, GREGORY D.
(B) NÚMERO DE REGISTRO: 36.134
(C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 325800-351
30 (ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:
(A) TELÉFONO: 201-994-1700
(B) TELEFAX: 201-994-1744
(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:
(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
35 (A) LONGITUD: 1695 PARES DE BASES
(B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
(C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
(D) TOPOLOGÍA: LINEAL
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

CACTCGTCTG	CCCCTGGACT	CCCGTCTCCT	CCTGTCCCTCC	GGCTTCCCAG	AGCTCCCTCC	60
TTATGGCAGC	AGCTTCCCGC	GTCTCCGGCG	CAGTTCTCAG	CGGACGACCC	TCTCGCTCCG	120
GGGCTGAGCC	CAGTCCCTGG	ATGTTGCTGA	AACTCTCGAG	ATCATGCGCG	GGTTTGGCTG	180
CTGCTTCCCC	GCCGGGTGCC	ACTGCCACCG	CCGCCGCCTC	TGCTGCCGCC	GTCCGCGGGA	240
TGCTCAGTAG	CCGCTGCCC	GGCCCCGCG	ATCCTGTGTT	CCTCGGAAGC	CGTTTGCTGC	300
TGCAGAGTTG	CACGAACTAG	TCATGGTGCT	GTGGGAGTCC	CCGCGGCAGT	GCAGCAGCTG	360
GACACTTTGC	GAGGGCTTTT	GCTGGCTGCT	GCTGCTGCCC	GTCATGCTAC	TCATCGTAGC	420
CCGCCCGGTG	AAGCTCGCTG	CTTTCCCTAC	CTCCTTAAGT	GACTGCCAAA	CGCCCACCGG	480
CTGGAATTGC	TCTGGTTATG	ATGACAGAGA	AAATGATCTC	TTCCCTGTG	ACACCAACAC	540
CTGTAAATTT	GATGGGGAAT	GTTTAAGAAAT	TGGAGACACT	GTGACTTGCG	TCTGTCAAGT	600
CAAGTGCAAC	AATGACTATG	TGCCTGTGTG	TGGCTCCAAT	GGGGAGAGCT	ACCAGAATGA	660
GTGTTACCTG	CGACAGCTG	CATGCAAACA	GCAGAGTGAG	ATACTTGTGG	TGTCAGAAGG	720
ATCATGTGCC	ACAGATGCAG	GATCAGGATC	TGGAGATGGA	GTCCATGAAG	GCTCTGGAGA	780
AACTAGTCAA	AAGGAGACAT	CCACCTGTGA	TATTTGCCAG	TTTGGTGCAG	AATGTGACGA	840
AGATGCCGAG	GATGTCTGGT	GTGTGTGTAA	TATTGACTGT	TCTCAAACCA	ACTTCAATCC	900
CCTCTGCGCT	TCTGATGGGA	AATCTTATGA	TAATGCATGC	CAAATCAAAG	AAGCATCGTG	960
TCAGAAACAG	GAGAAAATTG	AAGTCATGTC	TTTGGGTGCG	TGTCAGATA	ACACAACCTAC	1020
AACTACTAAG	TCTGAAGATG	GGCATTATGC	AAGAACAGAT	TATGCAGAGA	ATGCTAACAA	1080
ATTAGAAGAA	AGTCCAGAG	AACACCACAT	ACCTTGTCGG	GAACATTACA	ATGGCTTCTG	1140
CATGCATGGG	AAGTGTGAGC	ATTCTATCAA	TATGCAGGAG	CCATCTTGCA	GGTGTGATGC	1200
TGGTTATACT	GGACAACACT	GTGAAAAAAA	GGACTACAGT	GTTCTATACG	TTGTTCCCGG	1260
TCCTGTACGA	TTTCAGTATG	TCTTAATCGC	AGCTGTGATT	GGAACAATTC	AGATTGCTGT	1320
CATCTGTGTG	GTGGTCCCTC	GCATCACAAG	GAAATGCCCC	AGAAGCAACA	GAATTCACAG	1380
ACAGAAGCAA	AATACAGGGC	ACTACAGTTC	GGACAATACA	ACAAGAGCGT	CCACGAGGTT	1440
AATCTAAAGG	GAGCATGTTT	CACAGTGGCT	GGACTACCGA	GAGCTTGGAG	TACACAATAC	1500
AGTATTATAG	ACAAAAGAAT	AAGACAAGAG	ATCTACACAT	GTTGCCTTGC	ATTTGTGGTA	1560
ATCTACACCA	ATGAAAACAT	GTACTACAGC	TATATTTGAT	TATGTATGGA	TATATTTGAA	1620
ATAGTATACA	TTGTCTTGAT	GTTTTTTCTG	TAATGTAAAT	AACTATTTTA	TATCACACAA	1680
AAAAAAAAAA	AAAAA					1695

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 374 AMINOÁCIDOS
- (B) TIPO: AMINOÁCIDO
- (C) TIPO DE CADENA:
- (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: PROTEÍNA

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

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

Cys	Lys	Gln	Gln	Ser	Glu	Ile	Leu	Val	Val	Ser	Glu	Gly	Ser	Cys
				125					130					135
Ala	Thr	Asp	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Asp	Gly	Val	His	Glu	Gly
				140					145					150
Ser	Gly	Glu	Thr	Ser	Gln	Lys	Glu	Thr	Ser	Thr	Cys	Asp	Ile	Cys
				155					160					165
Gln	Phe	Gly	Ala	Glu	Cys	Asp	Glu	Asp	Ala	Glu	Asp	Val	Trp	Cys
				170					175					180
Val	Cys	Asn	Ile	Asp	Cys	Ser	Gln	Thr	Asn	Phe	Asn	Pro	Leu	Cys
				185					190					195
Ala	Ser	Asp	Gly	Lys	Ser	Tyr	Asp	Asn	Ala	Cys	Gln	Ile	Lys	Glu
				200					205					210
Ala	Ser	Cys	Gln	Lys	Gln	Glu	Lys	Ile	Glu	Val	Met	Ser	Leu	Gly
				215					220					225
Arg	Cys	Gln	Asp	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Ser	Glu	Asp	Gly
				230					235					240
His	Tyr	Ala	Arg	Thr	Asp	Tyr	Ala	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Leu	Glu
				245					250					255
Glu	Ser	Ala	Arg	Glu	His	His	Ile	Pro	Cys	Pro	Glu	His	Tyr	Asn
				260					265					270
Gly	Phe	Cys	Met	His	Gly	Lys	Cys	Glu	His	Ser	Ile	Asn	Met	Gln
				275					280					285
Glu	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Asp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Gly	Gln	His	Cys
				290					295					300
Glu	Lys	Lys	Asp	Tyr	Ser	Val	Leu	Tyr	Val	Val	Pro	Gly	Pro	Val
				305					310					315
Arg	Phe	Gln	Tyr	Val	Leu	Ile	Ala	Ala	Val	Ile	Gly	Thr	Ile	Gln
				320					325					330
Ile	Ala	Val	Ile	Cys	Val	Val	Val	Leu	Cys	Ile	Thr	Arg	Lys	Cys
				335					340					345
Pro	Arg	Ser	Asn	Arg	Ile	His	Arg	Gln	Lys	Gln	Asn	Thr	Gly	His
				350					355					360
Tyr	Ser	Ser	Asp	Asn	Thr	Thr	Arg	Ala	Ser	Thr	Arg	Leu	Ile	
				365					370					

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 30 PARES DE BASES
- (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
- (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

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

CCCGGATCCG CACGAGACAT ACCTTGTCGG
30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- (A) LONGITUD: 32 PARES DE BASES
- (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO

- (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:
- 5 GGGGAAGCTTT TAATACTGAA ATCGTACAGG AC 32
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 33 PARES DE BASES
 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
- 10 (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:
- CGCGGATCCG CCATCATGGT GCTGTGGGAG TCC 33
- 15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:
- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 31 PARES DE BASES
 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
- 20 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:
- GCGTCTAGAC TAGTATAGAA CACTGTAGTC C 31
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:
- 25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 33 PARES DE BASES
 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
- 30 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:
- CGCGGATCCG CCATCATGCT ACTCATCGTA GCC 33
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:
- 35 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA
- (A) LONGITUD: 31 PARES DE BASES
 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
- (D) TOPOLOGÍA: LINEAL
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

CGGTCTAGAC TAGTATAGAA CACTGTAGTC C 31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 5 (A) LONGITUD: 31 PARES DE BASES
 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

CGCGGATCCA GAACACCACA TACCTTGTCC G 31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 15 (A) LONGITUD: 31 PARES DE BASES
 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

20 CGGTCTAGAC TAGTATAGAA CACTGTAGTC C 31

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 25 (A) LONGITUD: 33 PARES DE BASES
 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

CGCGGATCCG CCATCATGGT GCTGTGGGAG TCC 33

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

- 35 (A) LONGITUD: 28 PARES DE BASES
 (B) TIPO: ÁCIDO NUCLEICO
 (C) TIPO DE CADENA: MONOCATENARIA
 (D) TOPOLOGÍA: LINEAL

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: Oligonucleótido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

GCGCTCGAGG TATAGAACAC TGTAGTCC 28

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en
- (a) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en Seq. ID No. 2;
- 5 (b) polinucleótidos que codifican un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de los residuos 1 a 329 como se representa en Seq. ID No. 2; y
- (c) una variante alélica del polinucleótido de (a) o (b);
- o la cadena complementaria de tal polinucleótido.
2. El polinucleótido de la reivindicación 1 que es ADN.
3. El ADN de la reivindicación 2 que es ADN genómico.
- 10 4. El polinucleótido de la reivindicación 1 que es ARN.
5. Un vector que contiene el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
6. El vector de la reivindicación 5 en el que el polinucleótido está unido de manera operable a secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células hospedadoras procarióticas o eucarióticas.
- 15 7. Una célula hospedadora modificada mediante ingeniería genética con el vector de la reivindicación 5 ó 6.
8. Un procedimiento para producir un polipéptido TGF α -HII que comprende: cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 7 y recuperar el polipéptido codificado por dicho polinucleótido del cultivo.
- 20 9. Un procedimiento para producir células capaces de expresar un polipéptido TGF α -HII que comprende modificar mediante ingeniería genética células con el vector de la reivindicación 5 ó 6.
10. Un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 u obtenible mediante el procedimiento de la reivindicación 8.
11. Un anticuerpo hacia el polipéptido de la reivindicación 10.
- 25 12. El anticuerpo de la reivindicación 11 que es un anticuerpo policlonal, monoclonal, quimérico, de cadena simple o humanizado o un fragmento Fab.
13. El anticuerpo de la reivindicación 12, que es un anticuerpo monoclonal.
14. El anticuerpo de la reivindicación 13, que es un anticuerpo monoclonal humano o humanizado.
15. El anticuerpo de la reivindicación 13, que es un fragmento Fab.
- 30 16. Un compuesto que inhibe la activación del polipéptido de la reivindicación 10, y dicho compuesto es un anticuerpo hacia el polipéptido de la reivindicación 10 o una construcción antisentido que hibrida al polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
17. Una molécula de ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 18. Una composición farmacéutica que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el vector de la reivindicación 5 ó 6, la célula hospedadora de la reivindicación 7, el polipéptido de la reivindicación 10, el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 o el compuesto de la reivindicación 16 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 40 19. Una composición de diagnóstico que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, el polipéptido de la reivindicación 10, el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 o la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 17.

FIG. 1B

COINCIDE CON LA FIG. 1A

TGCAGAGTTGCACGAACTAGTTCATGTTGTTGGAGTCCCGGGCAGTGCAGCAGCTG
 ACGTCTCAACGGTGCITGATCAGTACCACGACACCCCTCAGGGGGCCGTCACGTCGTCGAC
 M V L W E S P R Q C S S W
 40 60 80

GACACITTTGGAGGGCTTTTGGCTGGCTGCTGCTGCCCGTCACTACTCATCGTAGC
 CTGTSAAACGCTCCCGAAACGACCCGACCGACGACGACCGGGCAGTACGATGAGTAGCATCG
 T L C E G F C W L L L L L L P V M L L L I V A
 100 120 140

CCGCCCCGTTGAAGCTCGCTGCTTTCCCTACCTCCTTAAGTACTGCCAAACGCCCCACCCGG
 GCGGGCCACTTCGAGCGACGAAAGGATGGAGGAATTCACTGACGGTTGCGGGTGGCC
 R P V K L A A F P T S L S D C Q T P T G
 160 180 200

CTGGAAITGCTCTGGTTATGATGACAGAGAAAATGATCTCTTCTCTGTGACACCAACAC
 GACCTTAACGAGACCAATACTACTGTCTCTTTTACTAGAGAAGGAGACACTGTGGTTGTG
 W N C S G Y D D R E N D L F L C D T N T
 220 240 260

CTGTAATTTGATGGGGAAATGTTAAGAATGGAGACACTGTGACTTGGCTCTGTCAGTT
 COINCIDE CON LA FIG. 1C

FIG. 1C

COINCIDE CON LA FIG. 1B

```

+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GACATTTAAACTACCCCTTACAAAATCTTAACTCTGTGACACTGAAGCGCAGACAGTCAA
C K F D G E C L R I G D T V T C V C Q F
280                               300                               320
.
CAAGTGCAACAATGACTATGTGCCCTGTGTGGCTCCAATGGGAGAGCTACCAGAATGA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTACCGTTGTTACTGATACACGGACACACACCCGAGGTTACCCCTCTCGATGGTCTTACT
K C N N D Y V P V C G S N G E S Y Q N E
340                               360                               380
.
GTGTTACCTGCGACAGGCTGCATGCAAAACAGCAGAGTGAGATACTTGTGGTGCAGAAGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACAAATGGACGCTGTCCGACGTACGTTGTGCTCCTCACTCTATGAACACCACAGTCTTCC
C Y L R Q A A C K Q Q S E I L V V S E G
400                               420                               440
.
ATCATGTGCCACAGATGCAGGATCAGGATCTGGAGATGGAGTCCATGAAGGCTCTGGAGA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGTACACGGTGTCTACGTCCTAGTCCCTAGACCTCTACCTCAGGTACTTCCGAGACCTCT
S C A T D A G S G S G D G V H E G S G E
460                               480                               500
.
AACTAGTCAAAAAGGAGACATCCACCTGTGATATTTGCCAGTTTGGTGCAGAAATGTGACGA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGATCAGTTTTCCTCTGTAGGTGGACACTATAAACGGTCAAAACCACCGTCTTACACTGCT
COINCIDE CON LA FIG. 1D

```


FIG. 1E

COINCIDE CON LA FIG. 1D

```

ATTAGAAAGTCCAGAGAACACCACATACCTTGTCGGAACATTACAATGGCTCTG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAATCTTCTTTACGGTCTCTGTGGTGAAGAACAGGCCCTTGTAATGTTACCGAAGAC
L E E S A R E H H I P C P E H Y N G F C
820                               840 860

CATGCATGGGAAGTGTGAGCATTCATCAATATGCAGAGCCATCTTGCAGGTGTGATGC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTAGTACCCCTTCACACTCGTAAGATAGTTATACGTCCTCGGTAGAACGTCCACACTACG
M H G K C E H S I N M Q E P S C R C D A
880                               900 920

TGGTTATACTGGACACACTGTGAAAAAAGGACTACAGTGTCTATACGTTGTTCCCGG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACCAATATGACCTGTGTGACACTTTTTTTCCTGATGTCACAAGATATGCCAACAGGGCC
G Y T G Q H C E K K D Y S V L Y V V P G
940                               960 980

TCCGTACGATTTTCAGTATGTCCTTAATCGCAGCTGTGATTGGAAACAATTCAGATTGCTGT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGGACATGCTAAAGTCATACAGAATTAGCGTCGACACTAACCTTGTTAAGTCTAACGACA
P V R F Q Y V L I A A V I G T I Q I A V
1000                               1020 1040

CATCTGTGTGGTCCCTCTGCCATCACAGGAAATGCCCCAGAACACAGAATTCACAG
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTAGACACACCCAGGAGCGTAGTGTTCCTTTACGGGTCCTTCGTTGCTTAAGTGTG
COINCIDE CON LA FIG. 1F

```

COINCIDE CON LA FIG. 1E

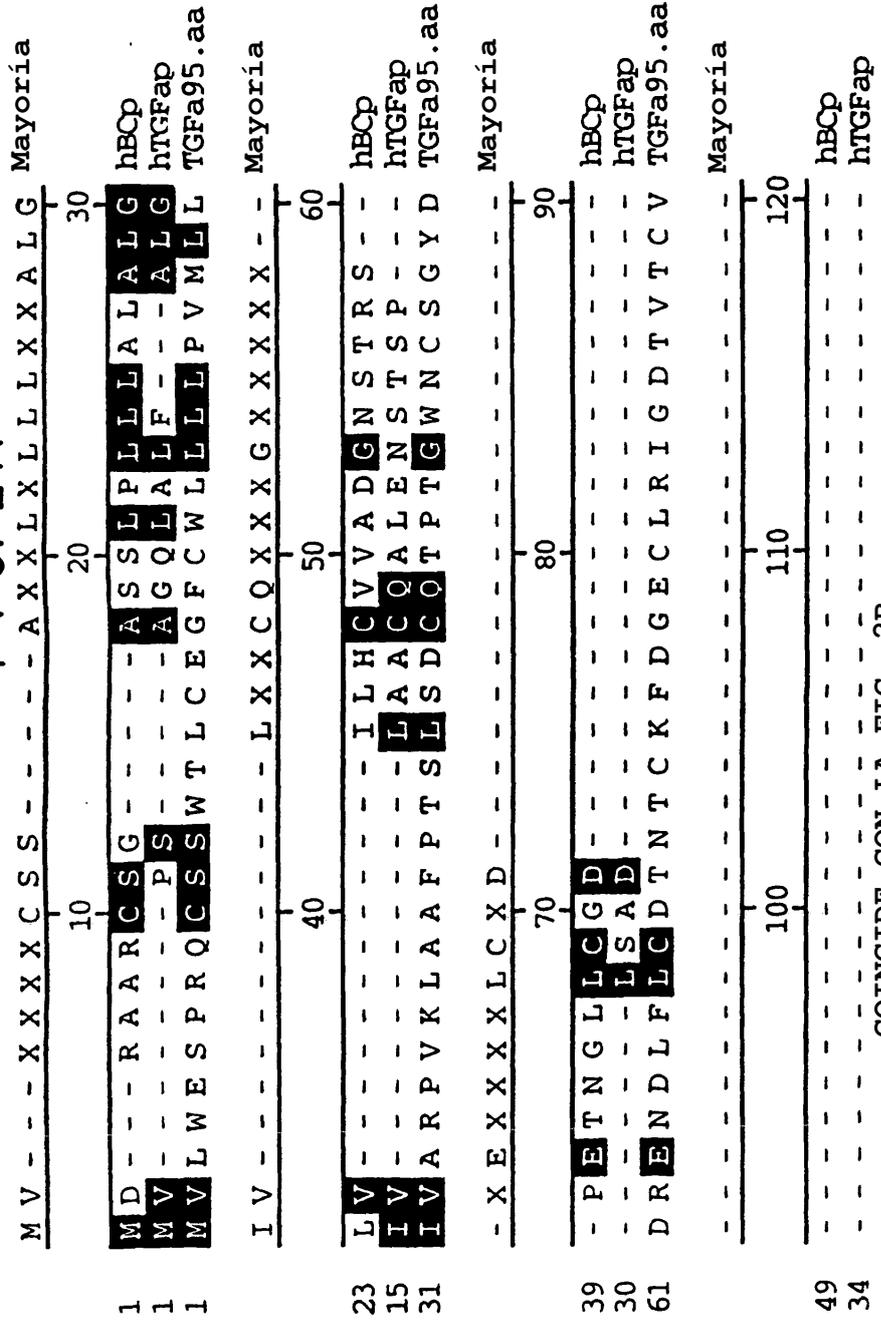
```

I C V V L C I T R K C P R S N R I H R
1060 . 1080 1100
ACAGAAGCAAATAACAGGGCACTACAGTTCCGGACAATACAACAAGAGCGTCCACGAGGTT
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TGCTTCGTTTTAIGTCCCGIGATGTCAAGCCGTGTTATGTGTCTGCAGGTGCTCCAA
Q K Q N T G H Y S S D N T T R A S T R L
1120 . 1140 1160
AATCTAAAGGGAGCATGTTTCACAGTGGCTGGACTACCGAGAGCTTGGACTACACAATAC
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAGATTTCCCTCGTACAAGTGTCAACCGACCTGATGGCTCTCGAACCTGATGTGTTATG
I *
1180 . 1200 1220
AGTATTATAGACAAAAGAATAAGACAAGAGATCTACACATGTTGCCCTTGCATTTGTGGTA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCATAATATCTGTTTTCTTATTCTGTTCTCTAGATGTGTACAAACGGAAACGTAACACCCAT
1240 . 1260 1280
ATCTACACCAATGAAAACATGTACTACAGCTATATTTGATTATGTATGGATATATTTGAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAGATGTGGTTACTTTTGTACATGATGTGCGATATAAACTAATAACATACATACCTATATAAACTT
1300 . 1320 1340
ATAGTATACATTGCTTGTATGTTTTTTCTGTAATGTAAATAAACTATTTTATATCACACAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATCATATGTAACAGAACTACAAAAAAGACATTACATTTTATTTGATAAAATATAGTGTGTT
1360 .
AAAAAAAAAAAAAAA
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTTTTTTTTTTTTT

```

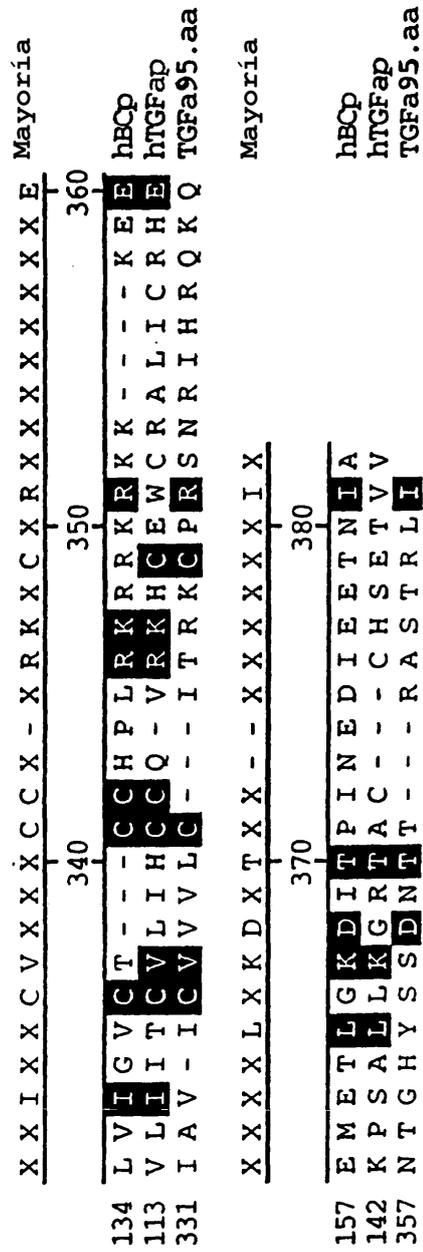
FIG. 1F

FIG. 2A



COINCIDE CON LA FIG. 2B

COINCIDE CON LA FIG. 2C **FIG. 2D**



Decoración "Decoración n° 1": Sombra con residuos continuos que coinciden exactamente con el consenso