



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 297**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **97953438 .5**

(96) Fecha de presentación : **22.12.1997**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0946725**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.1999**

(54) Título: **Activador del receptor de NF- κ B, el receptor es miembro de la superfamilia del receptor TNF.**

(30) Prioridad: **23.12.1996 US 59978 P**
07.03.1997 US 77181 P
14.10.1997 US 64671 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.05.2011

(73) Titular/es: **IMMUNEX CORPORATION**
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US

(72) Inventor/es: **Anderson, Dirk, M.;**
Galibert, Laurent, J. y
Maraskovsky, Eugene

(74) Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere, en general, al campo de los receptores de citocinas y, más específicamente, a pares de receptor de citocinas/ligando que tienen actividad inmunorreguladora.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El funcionamiento eficaz del sistema inmune requiere un buen equilibrio entre la proliferación y diferenciación celular y la muerte celular, para asegurar que el sistema inmune es capaz de reaccionar con antígenos extraños pero no con autoantígenos. Son esenciales para el procedimiento de regulación de la respuesta inmune e inflamatoria diversos miembros de la superfamilia del Receptor del Factor de Necrosis Tumoral (TNF)/Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso (Smith et al., *Science* 248: 1019; 1990). Esta familia de receptores incluye dos receptores de TNF diferentes (Tipo I y Tipo II; Smith et al., mencionado anteriormente; y Schall et al., *Cell* 61: 361, 1990), receptor del factor de crecimiento nervioso (Johnson et al., *Cell* 47:545, 1986), antígeno CD40 de células B (Stamenkovic et al., *EMBO J.* 8: 1403, 1989), CD27 (Camerini et al., *J. Immunol.* 147: 3165, 1991), CD30 (Durkop et al., *Cell* 68: 421, 1992), antígeno OX40 de células T (Mallett et al., *EMBO J.* 9: 1063, 1990), antígeno Fas humano (Itoh et al., *Cell* 66: 233, 1991), receptor 4-1BB murino (Kwon et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1963, 1989) y un receptor denominado Receptor de Inducción de Apoptosis (AIR; documento USSN 08/720.864, presentado el 4 de octubre de 1996).

[0003] CD40 es un receptor presente en los linfocitos B, células epiteliales y algunas líneas celulares de carcinoma, que interacciona con un ligando que se encuentra en células T activadas, CD40L (documento USSN 08/249.189, presentado el 24 de mayo de 1994). La interacción de este par de ligando/receptor es esencial para la respuesta inmune tanto celular como humoral. La transducción de señales a través de CD40 está mediada por la asociación del dominio citoplásmico de esta molécula con miembros de los factores asociados al receptor de TNF (TRAFs; Baker y Reddy, *Oncogene* 12: 1, 1996). Recientemente se ha descubierto que ratones que son defectuosos en la expresión de TRAF3 debido a una alteración dirigida en el gen que codifica TRAF3, parecen normales en el nacimiento, pero desarrollan hipoglucemia progresiva y reducción de glóbulos blancos periféricos, y mueren aproximadamente a los diez días de edad (Xu et al., *Immunity* 5: 407, 1996). Las respuestas inmunes de ratones quiméricos reconstituidos con células de hígado fetal TRAF3^{-/-} se parecen a las de los ratones deficientes en CD40, aunque las células B TRAF3^{-/-} parecen ser funcionalmente normales.

[0004] El papel crítico de TRAF3 en la transducción de señales puede estar en su interacción con uno de los otros miembros de la superfamilia de receptores de TNF, por ejemplo, CD30 o CD27, que están presentes en células T. Como alternativa, puede haber otros miembros, aunque aún no identificados, de esta familia de receptores que interaccionan con TRAF3 y juegan un papel importante en el desarrollo postnatal así como en el desarrollo de un sistema inmune competente. La identificación de miembros adicionales de la superfamilia de receptores de TNF proporcionaría un medio adicional para regular la respuesta inmune e inflamatoria, y además podría proporcionar una perspectiva adicional del desarrollo postnatal en mamíferos.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0005] La presente invención proporciona un nuevo receptor, denominado RANK (activador del receptor de NF-κB, por sus siglas en inglés), que es un miembro de la superfamilia del receptor de TNF. RANK es una proteína transmembrana de Tipo I que tiene 616 restos aminoácídicos, que interacciona con TRAF3. La inducción de RANK por sobre-expresión, co-expresión de RANK y ligando de RANK unido a la membrana (RANKL), y por la adición de RANKL soluble o anticuerpos agonistas a RANK, tiene como resultado la regulación positiva del factor de transcripción NF-κB, un factor de transcripción ubicuo que se utiliza mucho en células del sistema inmune.

[0006] Pueden prepararse formas solubles del receptor y usarse para interferir con la transducción de señales a través de RANK unido a la membrana, y por lo tanto la regulación positiva de NF-κB; por consiguiente, también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden formas solubles del nuevo receptor. La inhibición de NF-κB por antagonistas de RANK puede ser útil para mejorar los efectos negativos de una respuesta inflamatoria que resulta de la inducción de RANK, por ejemplo en el tratamiento del choque tóxico o septicemia, reacciones de injerto contra hospedador o reacciones inflamatorias agudas. Las formas solubles del receptor también serán útiles *in vitro* para seleccionar agonistas o antagonistas de la actividad de RANK.

[0007] El dominio citoplásmico de RANK será útil para desarrollar ensayos para inhibidores de la transducción de señales, por ejemplo, para seleccionar moléculas que inhiban la interacción de RANK con TRAF2 o TRAF3. También se describen formas delecionadas y proteínas de fusión que comprenden el nuevo receptor.

[0008] La presente invención también identifica una contraestructura, o ligando, para RANK, denominada RANKL. RANKL es una proteína transmembrana de Tipo 2 con un dominio intracelular de menos de aproximadamente 50 aminoácidos, un dominio transmembrana y un dominio extracelular de aproximadamente 240 a 250 aminoácidos. De forma similar a otros miembros de la familia del TNF a la que pertenece, RANKL tiene una región "espaciadora" entre el dominio transmembrana y el dominio de unión al receptor que no es necesaria para la unión al receptor. Por consiguiente, las formas solubles de RANKL pueden comprender el dominio extracelular entero o fragmentos del mismo

que incluyen la región de unión al receptor.

[0009] Estos y otros aspectos de la presente invención se harán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 **[0010]** La Figura 1 demuestra la influencia de RANK.Fc y hRANKL sobre el crecimiento de células T activadas. Se cultivaron células T de sangre periférica humana como se describe en el Ejemplo 12; la recuperación de las células T viables se determinó por recuentos por triplicado con azul tripan.

10 La Figura 2 ilustra la capacidad de RANKL de inducir la formación de agrupamientos de DC humanas. Se generaron células dendríticas (DC) funcionalmente maduras *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea (BM) CD34+ y se cultivaron como se describe en el Ejemplo 13. Se cultivaron DC CD1a+ en un cóctel de citocinas solo (Figura 2A), en cóctel más CD40L (Figura 2B), RANKL (Figura 2C) o RANKL inactivado con calor (Δ H) (Figura 2D), y después se fotografiaron usando un microscopio de inversión.

15 La Figura 3 demuestra que RANKL potencia la capacidad alo-estimuladora de DC. Se incubaron células T alogénicas con números variables de DC irradiadas cultivadas como se describe en el Ejemplo 13. Los cultivos se sometieron a pulsos con [3 H]-timidina y las células se recogieron en láminas de fibra de vidrio para el recuento. Los valores representan la media $\pm$ desviación típica (SD) de cultivos por triplicado.

20 La Figura 4 presenta un alineamiento de RANK humano con otros miembros de la familia del TNFR en la región de pseudo-repeticiones ricas en cisteína extracelulares conservadas estructuralmente. Se indican los enlaces disulfuro previstos (DS1-DS3). RANK y CD40 contienen sustituciones de aminoácidos idénticas (C^H, C^G) que eliminan DS2 en la segunda pseudo-repetición.

La Figura 5 representa un alineamiento de RANKL humano con otros miembros de la familia del TNF.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 **[0011]** Se identificó un nuevo inserto de ADNc parcial con una fase de lectura abierta prevista que tenía alguna similitud con CD40 en una base de datos que contenía información de secuencia de ADNc generados a partir de células dendríticas (DC) derivadas de médula ósea humana. El inserto se usó para hibridar con manchas de transferencia de colonias generadas a partir de una biblioteca de ADNc de DC que contenía ADNc de longitud completa. Se realizaron varias hibridaciones de colonias y se aislaron dos clones (SEC ID N°: 1 y 3). La SEC ID N°: 5 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de una proteína de longitud completa prevista basándose en el alineamiento de las secuencias solapantes de las SEC ID N°: 1 y 3.

30 **[0012]** RANK es un miembro de la superfamilia de receptores de TNF; se parece mucho a CD40 en la región extracelular. De forma similar a CD40, RANK se asocia con TRAF2 y TRAF3 (como se determina por ensayos de co-inmunoprecipitación sustancialmente como se describe por Rothe et al., *Cell* 83: 1243, 1995). Los TRAF son críticamente importantes en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Mediante su asociación con diversos miembros de la superfamilia de receptores de TNF, una señal se transduce a una célula. Esta señal da como resultado la proliferación, diferenciación o apoptosis de la célula, dependiendo del receptor que se induzca y del TRAF que se asocie con el receptor o receptores; pueden transducirse diferentes señales a una célula mediante la coordinación de diversos acontecimientos de señalización. De esta manera, una señal transducida a través de un miembro de esta familia puede ser proliferativa, de diferenciación o apoptótica, dependiendo de otras señales que se transducen a la célula, y/o del estado de diferenciación de la célula. Esta exquisita regulación de esta ruta proliferativa/apoptótica es necesaria para desarrollar y mantener protección contra patógenos; los desequilibrios pueden dar como resultado una enfermedad autoinmune.

45 **[0013]** RANK se expresa en células epiteliales, algunas líneas de células B y en células T activadas. Sin embargo, su expresión en células T activadas es tardía, aproximadamente cuatro días después de la activación. Este transcurso de tiempo de la expresión coincide con la expresión de Fas, un agente conocido de apoptosis. RANK puede actuar como una señal anti-apoptótica, rescatando a las células que expresan RANK de la apoptosis como se sabe que hace CD40. Como alternativa, RANK puede confirmar una señal apoptótica en las circunstancias apropiadas, de nuevo de forma similar a CD40. RANK y su ligando probablemente juegan un papel esencial en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria.

50 **[0014]** Además, la letalidad postnatal de ratones que tienen una alteración dirigida del gen TRAF3 demuestra la importancia de esta molécula no sólo en la respuesta inmune, sino también en el desarrollo. El aislamiento de RANK, como una proteína que se asocia con TRAF3, y de su ligando permitirá una definición adicional de esta ruta de señalización y el desarrollo de modalidades de diagnóstico y terapéuticas para uso en el área de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias.

ADN, Proteínas y Análogos

[0015] La presente invención proporciona polipéptidos de RANK humano aislados y análogos (o muteínas) de los mismos que tienen una actividad mostrada por la molécula nativa (es decir, muteínas de RANK que se unen específicamente a un ligando de RANK expresado en células o inmovilizado en una superficie o a anticuerpos específicos para RANK; formas solubles de los mismos que inhiben la señalización inducida por el ligando de RANK a través de RANK). Dichas proteínas carecen sustancialmente de materiales endógenos contaminantes y, opcionalmente, no tienen glicosilación de patrón nativo asociada. Los derivados de RANK dentro del alcance de la invención también incluyen diversas formas estructurales de las proteínas primarias que retienen actividad biológica. Debido a la presencia de grupos amino y carboxilo ionizables, por ejemplo, una proteína RANK puede estar en forma de sales ácidas o básicas, o puede estar en forma neutra. También pueden modificarse restos aminoacídicos individuales por oxidación o reducción. La estructura primaria del aminoácido puede modificarse formando conjugados covalentes o agregativos con otros restos químicos, tales como grupos glicosilo, lípidos, fosfato, grupos acetilo y similares, o creando mutantes de la secuencia de aminoácidos. Los derivados covalentes se preparan uniendo grupos funcionales particulares a cadenas laterales de aminoácidos o al extremo N o C.

[0016] También pueden obtenerse derivados de RANK por la acción de agentes de entrecruzamiento tales como éster de M-maleimidobenzoil succinimida y N-hidroxisuccinimida, en los restos de cisteína y lisina. Las proteínas de la invención también pueden unirse covalentemente a través de grupos laterales reactivos a diversos sustratos insolubles, tales como estructuras de agarosa activadas con bromuro de cianógeno, activadas con bisoxirano, activadas con carbonildiimidazol o activadas con tosilo, o por adsorción en superficies de poliolefina (con o sin entrecruzamiento con glutaraldehído). Una vez unidas a un sustrato, las proteínas pueden usarse para unirse selectivamente (con fines de ensayo o purificación) a anticuerpos inducidos contra las proteínas o contra otras proteínas que son similares a RANK o RANKL, así como otras proteínas que se unen a RANK o RANKL u homólogos de las mismas.

[0017] También están dentro del alcance de la invención formas solubles de RANK. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos prevista de RANK se muestran en las SEC ID N° 1 a 6. El análisis informático indicó que la proteína tiene un péptido señal N-terminal; el sitio de escisión previsto sigue al resto 24. Los expertos en la materia reconocerán que el sitio de escisión real puede ser diferente del previsto por análisis informático. De esta manera, es de esperar que el aminoácido N-terminal del péptido escindido esté dentro de aproximadamente los cinco aminoácidos de cualquier lado del sitio de escisión previsto preferido después del resto 24. Además, se preparó una forma soluble que empezaba con el aminoácido 33; esta forma soluble se unía a RANKL. El péptido señal, según se predice, va seguido de un dominio extracelular de 188 aminoácidos, un dominio transmembrana de 21 aminoácidos y una cola citoplásmica de 383 aminoácidos.

[0018] RANK soluble comprende el péptido señal y el dominio extracelular (restos 1 a 213 de la SEC ID N°: 6) o un fragmento del mismo. Como alternativa, el líder nativo puede sustituirse por un péptido señal diferente, empezando con el resto 1 y continuando hasta un resto seleccionado del grupo que consiste en los aminoácidos 24 a 33 (inclusive) de la SEC ID N°: 6. Además, los fragmentos del dominio extracelular también proporcionarán formas solubles de RANK. Pueden prepararse fragmentos usando técnicas conocidas para aislar una parte deseada de la región extracelular, y pueden prepararse, por ejemplo, comparando la región extracelular con las de otros miembros de la familia de TNFR y seleccionando formas similares a las preparadas para otros miembros de la familia. Como alternativa, pueden usarse sitios de restricción únicos o técnicas de PCR que se conocen en este campo para preparar numerosas formas truncadas que pueden expresarse y analizarse con respecto a la actividad.

[0019] Pueden prepararse fragmentos usando técnicas conocidas para aislar una parte deseada de la región extracelular, y pueden prepararse, por ejemplo, comparando la región extracelular con las de otros miembros de la familia de TNFR (de la que RANK es un miembro) y seleccionando formas similares a las preparadas para otros miembros de la familia. Como alternativa, pueden usarse sitios de restricción únicos o técnicas de PCR que se conocen en este campo para preparar numerosas formas truncadas que pueden expresarse y analizarse con respecto a la actividad.

[0020] Otros derivados de las proteínas RANK dentro del alcance de esta invención incluyen conjugados covalentes o agregativos de las proteínas o sus fragmentos con otras proteínas o polipéptidos, tales como los obtenidos por síntesis en cultivo recombinante como fusiones N-terminales o C terminales. Por ejemplo, el péptido conjugado puede ser una secuencia de polipéptido señal (o líder) en la región N-terminal de la proteína, que dirige de forma cotraduccional o postraduccional la transferencia de la proteína desde su sitio de síntesis a su sitio de función dentro o fuera de la membrana o pared celular (por ejemplo, el líder del factor α de levadura).

[0021] Las fusiones de proteínas pueden comprender péptidos añadidos para facilitar la purificación o identificación de proteínas RANK y homólogos (por ejemplo poli-His). La secuencia de aminoácidos de las proteínas de la invención también puede unirse a un péptido de identificación tal como el descrito por Hopp et al., *Bio/Technology* 6: 1204 (1988). Dicho péptido altamente antigénico proporciona un epítipo unido reversiblemente por un anticuerpo monoclonal específico, que permite un rápido ensayo y una purificación fácil de la proteína recombinante expresada. La secuencia de Hopp et al. también se escinde específicamente por la enteroquinasa de la mucosa bovina, permitiendo la separación del péptido de la proteína purificada. Las proteínas de fusión protegidas con dichos péptidos también pueden ser resistentes a la degradación intracelular en *E. coli*.

[0022] Las proteínas de fusión comprenden además la secuencia de aminoácidos de un RANK unido a una región Fc de inmunoglobulina. Una región Fc ejemplar es una IgG₁ humana que tiene una secuencia de nucleótidos y de aminoácidos expuesta en la SEC ID N°: 8. También pueden usarse fragmentos de una región Fc, así como muteínas de Fc. Por ejemplo, ciertos restos dentro de la región de bisagra de una región Fc son críticos para la unión de alta afinidad a FcγRI. Canfield y Morrison (*J. Exp. Med.* 173:1483; 1991) notificaron que la Leu₍₂₃₄₎ y la Leu₍₂₃₅₎ eran críticas para la unión de alta afinidad de IgG₃ a FcγRI presente en células U937. Se obtuvieron resultados similares por Lund et al. (*J. Immunol.* 147: 2657, 1991; *Molecular Immunol.* 29:53, 1991). Estas mutaciones, solas o en combinación, pueden realizarse en una región Fc de IgG₁ para reducir la afinidad de IgG₁ por FcR. Dependiendo de la parte de la región Fc usada, una proteína de fusión puede expresarse como un dímero, mediante la formación de enlaces disulfuro intercatenarios. Si las proteínas de fusión se realizan con cadenas tanto pesadas como ligeras de un anticuerpo, es posible formar un oligómero de proteína con hasta cuatro regiones RANK.

[0023] En otra realización, las proteínas RANK comprenden además un péptido de oligomerización tal como un dominio de cremallera de leucina. Las cremalleras de leucina se identificaron originalmente en varias proteínas de unión al ADN (Landschulz et al., *Science* 240: 1759, 1988). El dominio de cremallera de leucina es un término usado para hacer referencia a un dominio de péptido conservado presente en estas (y otras) proteínas, que es responsable de la dimerización de las proteínas. El dominio de cremallera de leucina (también denominado en el presente documento dominio de oligomerización o de formación de oligómeros) comprende una héptada repetitiva, con cuatro o cinco restos de leucina intercalados con otros aminoácidos. Son ejemplos de dominios de cremallera de leucina los encontrados en el factor de transcripción de levadura GCN4 y en una proteína de unión al ADN termoestable encontrada en hígado de rata (C/EBP; Landschulz et al., *Science* 243: 1681, 1989). Dos proteínas de transformación nuclear, *fos* y *jun*, también presentan dominios de cremallera de leucina, así como el producto génico del proto-oncogén murino *c-myc* (Landschulz et al., *Science* 240: 1759, 1988). Los productos de los oncogenes nucleares *fos* y *jun* comprenden dominios de cremallera de leucina preferentemente de un heterodímero (O'Shea et al., *Science* 245:646, 1989; Turner y Tjian, *Science* 243:1689, 1989). El dominio de cremallera de leucina es necesario para la actividad biológica (unión al ADN) de estas proteínas.

[0024] Las proteínas fusogénicas de varios virus diferentes, incluyendo paramixovirus, coronavirus, virus del sarampión y muchos retrovirus, también poseen dominios de cremallera de leucina (Buckland y Wild, *Nature* 338: 547, 1989; Britton, *Nature* 353: 394, 1991; Delwart y Mosialos, *AIDS Research and Human Retroviruses* 6:703, 1990). Los dominios de cremallera de leucina en estas proteínas virales fusogénicas están cerca de la región transmembrana de las proteínas; se ha sugerido que los dominios de cremallera de leucina podrían contribuir a la estructura oligomérica de las proteínas fusogénicas. La oligomerización de proteínas virales fusogénicas está implicada en la formación de poros de fusión (Spruce et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3523, 1991). Recientemente también se ha notificado que los dominios de cremallera de leucina juegan un papel en la oligomerización de factores de transcripción del golpe de calor (Rabindran et al., *Science* 259: 230, 1993).

[0025] Los dominios de cremallera de leucina se pliegan como empaquetamientos de hélices alfa paralelos cortos (O'Shea et al., *Science* 254: 539; 1991). La arquitectura general del empaquetamiento de hélices alfa paralelo está bien caracterizada, con un empaquetamiento de "botón en ojal" ("knobs-into-holes") como se propuso por Crick en 1953 (*Acta Crystallogr.* 6: 689). El dímero formado por un dominio de cremallera de leucina se estabiliza por la héptada repetida, denominada $(abcdefg)_n$, de acuerdo con la notación de McLachlan y Stewart (*J. Mol. Biol.* 98: 293; 1975), en la que los restos *a* y *d* son generalmente restos hidrófobos, siendo *d* una leucina, que están alineados en la misma cara de una hélice. Los restos cargados de forma opuesta comúnmente aparecen en las posiciones *g* y *e*. De esta manera, en un empaquetamiento de hélices alfa paralelo formado a partir de dos dominios de cremallera de leucina helicoidales, los "botones" formados por las cadenas laterales hidrófobas de la primera hélice se empaquetan en los "ojales" formados entre las cadenas laterales de la segunda hélice.

[0026] Los restos de leucina en la posición *d* aportan grandes energías de estabilización hidrófoba y son importantes para la formación de dímeros (Krystek et al., *Int. J. Peptide Res.* 38: 229, 1991). Lovejoy et al. notificaron recientemente la síntesis de un haz α -helicoidal de triple cadena en el que las hélices van arriba-arriba-abajo (*Science* 259: 1288, 1993). Sus estudios confirmaron que la energía de estabilización hidrófoba proporciona la fuerza motriz principal para la formación de empaquetamientos de hélices alfa a partir de monómeros helicoidales. Estos estudios también indican que las interacciones electrostáticas contribuyen a la estequiometría y geometría de los empaquetamientos de hélices alfa.

[0027] Varios estudios han indicado que restos de leucina individuales pueden sustituirse por aminoácidos conservativos con una reducción mínima en la capacidad de dimerizar; sin embargo, múltiples cambios normalmente dan como resultado una pérdida de esta capacidad (Landschulz et al., *Science* 243:1681, 1989; Turner y Tjian, *Science* 243:1689, 1989; Hu et al., *Science* 250:1400, 1990). Van Heekeren et al. notificaron que varios aminoácidos diferentes pueden sustituir a los restos de leucina en el dominio de cremallera de leucina de GCN4, y además descubrieron que algunas proteínas GCN4 que contenían dos sustituciones de leucina eran débilmente activas (*Nucl. Acids Res.* 20:3721, 1992). La mutación de la primera y la segunda leucinas heptádicas del dominio de cremallera de leucina de la proteína de fusión del virus del sarampión (MVF) no afectó a la formación del sincitio (una medida de la fusión celular inducida viralmente); sin embargo, la mutación de los cuatro restos de leucina impidió totalmente la fusión (Buckland et al., *J. Gen. Virol.* 73:1703 1992). Ninguna de las mutaciones afectó a la capacidad de MVF de formar un tetrámero.

[0028] Se ha descubierto que las sustituciones de aminoácidos en los restos *a* y *d* de un péptido sintético que

representa el dominio de cremallera de leucina de GCN4 cambia las propiedades de oligomerización del dominio de cremallera de leucina (Alber, Sixth Symposium of the Protein Society, San Diego CA). Cuando todos los restos en la posición *a* se cambian por isoleucina, la cremallera de leucina sigue formando un dímero paralelo. Cuando, además de este cambio, todos los restos de leucina en la posición *d* también se cambian por isoleucina, el péptido resultante forma espontáneamente un empaquetamiento de hélices alfa paralelo trimérico en solución. La sustitución de todos los aminoácidos en la posición *d* con isoleucina y en la posición *a* con leucina da como resultado un péptido que tetrameriza. Los péptidos que contienen estas sustituciones aún se denominan dominios de cremallera de leucina.

[0029] También se incluyen dentro del alcance de la invención fragmentos o derivados del dominio intracelular de RANK. Dichos fragmentos se preparan por cualquiera de las técnicas mencionadas en el presente documento e incluyen péptidos que son idénticos al dominio citoplásmico de RANK como se muestra en la SEC ID N°: 6, y los que comprenden una parte de la región citoplásmica. Todas las técnicas usadas en la preparación de formas solubles también pueden usarse en la preparación de fragmentos o análogos del dominio citoplásmico (es decir, técnicas RT-PCR o uso de enzimas de restricción seleccionadas para preparar truncamientos). Los ADN que codifican todo o un fragmento del dominio intracitoplásmico serán útiles para identificar otras proteínas que están asociadas con la señalización de RANK, por ejemplo, usando las técnicas de inmunoprecipitación descritas en el presente documento u otra técnica tal como un sistema doble híbrido de levadura (Rothe et al., mencionado anteriormente).

[0030] La presente invención también incluye RANK con o sin glicosilación de patrón nativo asociada. Las proteínas expresadas en sistemas de expresión de levadura o mamífero, por ejemplo, células COS-7, pueden ser similares o ligeramente diferentes en peso molecular y patrón de glicosilación que las moléculas nativas, dependiendo del sistema de expresión. La expresión de ADN que codifican las proteínas de la invención en bacterias tales como *E. coli* proporciona moléculas no glicosiladas. Pueden producirse análogos de mutantes funcionales de la proteína RANK que tienen sitios de N-glicosilación inactivados por síntesis y ligamiento de oligonucleótidos o por técnicas de mutagénesis con especificidad de sitio. Estas proteínas análogas pueden producirse en una forma homogénea de carbohidratos reducidos con un buen rendimiento usando sistemas de expresión de levadura. Los sitios de N-glicosilación en las proteínas eucariotas se caracterizan por el triplete de aminoácidos Asn-A₁-Z, donde A₁ es cualquier aminoácido excepto Pro y Z es Ser o Thr. En esta secuencia, la asparagina proporciona un grupo amino de cadena lateral para la unión covalente de un carbohidrato. Dicho sitio puede eliminarse por la sustitución de Asn o el resto Z por otro aminoácido, la delección de Asn o Z, o la inserción de un aminoácido que no sea Z entre A₁ y Z, o un aminoácido distinto de Asn entre Asn y A₁.

[0031] También pueden obtenerse derivados de proteína RANK por mutaciones de la proteína RANK nativa o subunidades de la misma. Una proteína RANK mutada, como se menciona en el presente documento, es un polipéptido homólogo a una proteína RANK nativa, respectivamente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos diferente a la de la proteína nativa debido a una o una pluralidad de delecciones, inserciones o sustituciones. El efecto de cualquier mutación realizada en un ADN que codifica un péptido mutado puede determinarse fácilmente analizando la capacidad del péptido mutado de unirse a su contraestructura de una manera específica. Además, la actividad de análogos, muteínas o derivados de RANK puede determinarse por cualquiera de los ensayos descritos en el presente documento (por ejemplo, inhibición de la capacidad de RANK de activar la transcripción).

[0032] Pueden construirse análogos de las proteínas de la invención, por ejemplo, realizando diversas sustituciones de restos o secuencias o deleccionando restos terminales o internos o secuencias que no se necesitan para la actividad biológica. Por ejemplo, pueden deleccionarse restos de cisteína o reemplazarse con otros aminoácidos para prevenir la formación de enlaces disulfuro intramoleculares incorrectos después de la renaturalización. Otros enfoques para la mutagénesis implican la modificación de restos aminoácidos débiles adyacentes para aumentar la expresión en sistemas de levadura en los que está presente la actividad proteasa de KEX2.

[0033] Cuando se adopta una estrategia de delección o inserción, debe considerarse el efecto potencial de la delección o inserción sobre la actividad biológica. Pueden construirse subunidades de las proteínas de la invención por delección de restos o secuencias terminales o internas. Pueden prepararse fácilmente formas solubles de RANK y ensayarse con respecto a su capacidad de inhibir la activación de NF-κB inducida por RANK. Pueden prepararse polipéptidos correspondientes a las regiones citoplásmicas y fragmentos de los mismos (por ejemplo, un dominio de muerte) por técnicas similares. Se proporcionan pautas adicionales en cuanto a los tipos de mutaciones que pueden realizarse por una comparación de la secuencia de RANK con proteínas que tienen estructuras similares, así como realizando un análisis estructural de las proteínas RANK de la invención.

[0034] En general, las sustituciones deben realizarse conservativamente; es decir, los aminoácidos sustitutos más preferidos son los que no afectan a la actividad biológica de RANK (es decir, a la capacidad de las proteínas de la invención de unirse a anticuerpos contra la proteína nativa correspondiente de una manera sustancialmente equivalente, la capacidad de unirse a la contraestructura sustancialmente de la misma manera que la proteína nativa, la capacidad de transducir una señal de RANK, o la capacidad de inducir la activación de NF-κB tras la sobreexpresión en sistemas de transfección transitorios, por ejemplo). Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de aminoácidos fuera del dominio o dominios de unión (ligando/receptor o áreas de unión a anticuerpo para el dominio extracelular, o regiones que interaccionan con otras proteínas intracelulares para el dominio citoplásmico), y sustitución de aminoácidos que no alteran la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína nativa. Otros ejemplos adicionales incluyen la sustitución de un resto alifático por otro, tal como Ile, Val, Leu o Ala entre sí, o sustituciones de un resto polar

por otro, tal como entre Lys y Arg; Glu y Asp; o Gln y Asn. Son bien conocidas otras de estas sustituciones conservativas, por ejemplo, sustituciones de regiones enteras que tienen características de hidrofobia similares.

[0035] Por supuesto, las mutaciones en las secuencias de nucleótidos construidas para la expresión de proteínas análogas o fragmentos de las mismas deben conservar la fase de lectura de las secuencias codificantes y, preferentemente, no crearán regiones complementarias que puedan hibridar para producir estructuras de ARNm secundarias tales como bucles u horquillas que afectarían de forma adversa a la traducción del ARNm.

[0036] No todas las mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína RANK o fragmentos de la misma se expresarán en el producto final, por ejemplo, pueden realizarse sustituciones de nucleótidos para mejorar la expresión, principalmente para evitar bucles de estructura secundaria en el ARNm transcrito (véase el documento EPA 75.444A), o para proporcionar codones que se traducen más fácilmente por el hospedador seleccionado, por ejemplo, los codones de preferencia de *E. coli* bien conocidos para la expresión en *E. coli*.

[0037] Aunque un sitio de mutación puede estar predeterminado, no es necesario que esté predeterminada la naturaleza de la mutación *per se*. Por ejemplo, para seleccionar características óptimas de mutantes, puede realizarse mutagénesis aleatoria y puede seleccionarse la actividad deseada de las proteínas mutadas expresadas. Pueden introducirse mutaciones en loci particulares por síntesis de oligonucleótidos que contienen una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permiten el ligamiento a fragmentos de la secuencia nativa. Después del ligamiento, la secuencia reconstruida resultante codifica un análogo que tiene la inserción, sustitución o delección de aminoácidos deseada.

[0038] Como alternativa, pueden emplearse procedimientos de mutagénesis con especificidad de sitio dirigidos a oligonucleótidos para proporcionar un gen alterado que tenga codones particulares de acuerdo con la sustitución, delección o inserción necesaria. Se describen métodos ejemplares para realizar las alteraciones expuestas anteriormente por Walder et al. (*Gene* 42:133, 1986); Bauer et al. (*Gene* 37:73, 1985); Craik (*BioTechniques*, Enero de 1985, 12-19); Smith et al. (*Genetic Engineering: Principles and Methods*, Plenum Press, 1981); y las Patentes de Estados Unidos N° 4.518.584 y 4.737.462 describen técnicas adecuadas.

[0039] Otras realizaciones de las proteínas de la invención incluyen polipéptidos RANK codificados por ADN capaces de hibridar con el ADN de la SEC ID N°: 5 en condiciones moderadamente rigurosas (solución de prelavado de SSC 5 X, SDS al 0,5%, EDTA 1,0 mM (pH 8,0)) y en condiciones de hibridación de 50°C, SSC 5 X, durante una noche, con las secuencias de ADN que codifican RANK, o más preferentemente en condiciones rigurosas (por ejemplo, hibridación en SSC 6 X a 63°C durante una noche; lavado en SSC 3 X a 55°C) y con otras secuencias que están degeneradas con respecto a las que codifican la proteína RANK. En una realización, los polipéptidos RANK tienen una identidad de al menos aproximadamente un 70% en la secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la proteína RANK nativa expuesta en la SEC ID N°: 6. En una realización preferida, los polipéptidos RANK tienen una identidad de al menos aproximadamente un 80% en la secuencia de aminoácidos con respecto a la forma nativa de RANK; los polipéptidos más preferidos son los que tienen una identidad de al menos aproximadamente un 90% con RANK nativa.

[0040] El porcentaje de identidad puede determinarse usando un programa informático, por ejemplo, el programa informático GAP descrito por Devereux et al. (*Nucl. Acids Res.* 12:387, 1984) y disponible en la University of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGC). Para fragmentos derivados de la proteína RANK, la identidad se calcula basándose en la porción de la proteína RANK que está presente en el fragmento.

[0041] La actividad biológica de análogos o muteínas de RANK puede determinarse ensayando la capacidad de los análogos o muteínas de inhibir la activación de la transcripción, por ejemplo, como se describe en los ejemplos del presente documento. Como alternativa, pueden usarse ensayos adecuados, por ejemplo un inmunoensayo enzimático o una transferencia puntual (dot blot) empleando un anticuerpo que se une a RANK nativo, o a una forma soluble de RANKL, para evaluar la actividad de análogos o muteínas de RANK, así como ensayos que emplean células que expresan RANKL. Los ensayos adecuados también incluyen, por ejemplo, ensayos de transducción de señales y métodos que evalúan la capacidad de la región citoplásmica de RANK de asociarse con otras proteínas intracelulares (es decir, TRAF 2 y 3) implicadas en la transducción de señales y también serán útiles para evaluar la actividad de análogos o muteínas de RANK. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica.

[0042] También son útiles fragmentos de las secuencias de nucleótidos de RANK. En una realización, dichos fragmentos comprenden al menos 17 nucleótidos consecutivos, preferentemente al menos aproximadamente 25 nucleótidos, más preferentemente al menos 30 nucleótidos consecutivos, del ADN de RANK descrito en el presente documento. En el presente documento se proporcionan complementos de ADN y ARN de dichos fragmentos, junto con formas tanto monocatenarias como bicatenarias del ADN de RANK de la SEC ID N°: 5, y los que codifican los polipéptidos mencionados anteriormente. Un fragmento de ADN de RANK generalmente comprende al menos aproximadamente 17 nucleótidos, preferentemente de aproximadamente 17 a aproximadamente 30 nucleótidos. Dichos fragmentos de ácido nucleico (por ejemplo, una sonda que corresponde al dominio extracelular de RANK) se usan como sonda o como cebadores en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

[0043] Las sondas también encuentran uso en la detección de la presencia de ácidos nucleicos de RANK en ensayos

in vitro y en procedimientos tales como transferencias de Northern y Southern. También pueden identificarse tipos celulares que expresan RANK. Dichos procedimientos son bien conocidos y el experto en la materia puede elegir una sonda de longitud adecuada, dependiendo de la aplicación particular deseada. Para PCR, se emplean cebadores 5' y 3' correspondientes al extremo de una secuencia de ADN de RANK deseada para amplificar esa secuencia, usando técnicas convencionales.

[0044] Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos de RANK son oligonucleótidos antisentido o con sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias diana de ARNm de RANK (con sentido) o ADN de RANK (antisentido). La capacidad de crear un oligonucleótido antisentido o con sentido basándose en una secuencia de ADNc para una proteína dada se describe, por ejemplo, en Stein y Cohen, *Cancer Res.* 48: 2659, 1988 y van der Krol et al., *BioTechniques* 6: 958, 1988.

Usos de ADN, Proteínas y Análogos

[0045] Los ADN, proteínas y análogos de RANK descritos en el presente documento tendrán numerosos usos, incluyendo la preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, las formas solubles de RANK serán útiles como antagonistas de la activación de NF- κ B mediada por RANK, así como para inhibir la transducción de una señal a través de RANK. Las composiciones de RANK (tanto proteínas como ADN) también serán útiles en el desarrollo de anticuerpos tanto agonistas como antagonistas contra RANK. Los ADN de la invención son útiles para la expresión de proteínas recombinantes y como sondas para el análisis (cuantitativo o cualitativo) de la presencia o distribución de transcritos de RANK.

[0046] Las proteínas de la invención también serán útiles en la preparación de kits que se usan para detectar RANK soluble o RANKL, o supervisar la actividad relacionada con RANK, por ejemplo, en muestras de pacientes. Las proteínas RANK también encontrarán utilidad en el control de la actividad relacionada con RANK en otras muestras o composiciones, como es necesario cuando se seleccionan antagonistas o miméticos de esta actividad (por ejemplo, péptidos o moléculas pequeñas que inhiben o imitan, respectivamente, la interacción). En dichos kits son útiles una diversidad de formatos de ensayo incluyendo (pero sin limitación) ELISA, transferencia puntual, ensayos de unión en fase sólida (tales como los que usan un biosensor), ensayos de formato rápido y bioensayos.

[0047] La RANK purificada de acuerdo con la invención facilitará el descubrimiento de inhibidores de RANK y, por lo tanto, inhibidores de una respuesta inflamatoria (mediante la inhibición de la activación de NF- κ B). El uso de un polipéptido RANK purificado en la selección de inhibidores potenciales es importante y prácticamente puede eliminar la posibilidad de reacciones de interferencia con contaminantes. Dicho ensayo de selección puede utilizar el dominio extracelular de RANK, el dominio intracelular o un fragmento de cualquiera de estos polipéptidos. La detección de la actividad inhibidora de una molécula típicamente implicaría el uso de una forma soluble de RANK procedente del dominio extracelular en un ensayo de selección para detectar moléculas capaces de unirse a RANK y de inhibir la unión, por ejemplo, de un anticuerpo agonista o RANKL, o el uso de un polipéptido derivado del dominio intracelular en un ensayo para detectar la inhibición de la interacción de RANK y otras proteínas intracelulares implicadas en la transducción de señales.

[0048] Además, pueden usarse sistemas *in vitro* para determinar la capacidad de moléculas de antagonizar o agonizar la actividad de RANK. En dichos métodos se incluyen usos de quimeras de RANK, por ejemplo, una quimera del dominio intracelular de RANK y un dominio extracelular derivado de una proteína que tiene un ligando conocido. Después pueden controlarse los efectos sobre la transducción de señales de diversas moléculas utilizando el ligando conocido para transducir una señal.

[0049] Además, también pueden usarse polipéptidos RANK para el diseño basado en la estructura de inhibidores de RANK. Dicho diseño basado en la estructura también se conoce como "diseño racional de fármacos". Los polipéptidos RANK pueden analizarse tridimensionalmente, por ejemplo, por cristalografía de rayos X, resonancia magnética nuclear o modelado por homología, siendo todos ellos métodos bien conocidos. También se incluye en la invención el uso de la información estructural de RANK en sistemas de software de modelado molecular para ayudar al diseño del inhibidor. Dicho modelado asistido por ordenador y diseño de fármaco puede utilizar información tal como análisis conformacional químico, el potencial electrostático de las moléculas, el plegamiento de proteínas, etc. Un procedimiento particular de la invención comprende analizar la estructura tridimensional de RANK con respecto a probables sitios de unión de sustratos, sintetizar una nueva molécula que incorpore un sitio reactivo predictivo, y ensayar la nueva molécula como se ha descrito anteriormente.

Expresión de RANK Recombinante

[0050] Las proteínas de la presente invención preferentemente se producen por procedimientos de ADN recombinante por inserción de una secuencia de ADN que codifica una proteína RANK o un análogo de la misma en un vector de expresión recombinante y por expresión de la secuencia de ADN en un sistema de expresión recombinante en condiciones que promuevan la expresión. Las secuencias de ADN que codifican las proteínas proporcionadas por esta invención pueden ensamblarse a partir de fragmentos de ADNc y enlazadores oligonucleotídicos cortos, o a partir de una serie de oligonucleótidos, para proporcionar un gen sintético que es capaz de insertarse en un vector de expresión recombinante y expresarse en una unidad transcripcional recombinante.

[0051] Los vectores de expresión recombinantes incluyen fragmentos de ADN derivados de ADNc o sintéticos que codifican RANK, u homólogos, muteínas o análogos bioequivalentes de los mismos, unidos operativamente a elementos reguladores de la transcripción o traducción adecuados derivados de genes de mamífero, microbianos, virales o insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor transcripcional, una secuencia de operador opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión a ribosomas de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción, como se describe con detalle más adelante. Pueden incorporarse adicionalmente la capacidad de replicación en un hospedador, normalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

[0052] Las regiones de ADN están unidas operativamente cuando están relacionadas funcionalmente entre sí. Por ejemplo, el ADN de un péptido señal (líder secretor) está unido operativamente a un ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está unido operativamente a una secuencia codificante si está colocado de forma que produce la traducción. En general, unido operativamente significa contiguo y, en el caso de líderes secretores, contiguo y en fase de lectura. Las secuencias de ADN que codifican RANK, u homólogos o análogos de los mismos que se van a expresar en un microorganismo, preferentemente no contendrán intrones que pudieran terminar prematuramente la transcripción del ADN en ARNm.

[0053] Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador de selección y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos disponibles en el mercado que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017). Dichos vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) y pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Estas secciones de "esqueleto" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y la secuencia estructural a expresar. *E. coli* típicamente se transforma usando derivados de pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (Bolivar et al., *Gene* 2: 95, 1977). pBR322 contiene genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina y, por lo tanto, proporciona medios sencillos para identificar células transformadas.

[0054] Los promotores usados comúnmente en vectores de expresión microbianos recombinantes incluyen el sistema promotor de β -lactamasa (penicilinas) y lactosa (Chang et al., *Nature* 275: 615, 1978; y Goeddel et al., *Nature* 281: 544, 1979), el sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel et al., *Nucl. Acids Res.* 8:4051, 1980; y documento EPA 36.776) y el promotor de tac (Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 412, 1982). Un sistema de expresión bacteriano particularmente útil emplea el promotor P_L del fago λ y el represor termolábil cl857ts. Los vectores plasmídicos disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo que incorporan derivados del promotor P_L de λ incluyen el plásmido pHUB2, residente en la cepa JMB9 de *E. coli* (ATCC 37092) y pPLc28, residente en la cepa RR1 de *E. coli* (ATCC 53082).

[0055] Las secuencias promotoras adecuadas en vectores de levadura incluyen los promotores para metalotioneína, 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255: 2073, 1980) u otras enzimas glicolíticas (Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.* 7: 149, 1968; y Holland et al., *Biochem.* 77:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para uso en la expresión en levaduras en R. Hitzeman et al., documento EPA 73.657.

[0056] Los vectores de levadura preferidos pueden ensamblarse usando secuencias de ADN de pBR322 para la selección y replicación en *E. coli* (gen y origen de replicación de Amp^r) y secuencias de ADN de levadura incluyendo un promotor de ADH2 reprimible por glucosa y un líder de secreción del factor α . El promotor de ADH2 se ha descrito por Russell et al. (*J. Biol. Chem.* 258: 2674, 1982) y Beier et al. (*Nature* 300: 724, 1982). El líder del factor α de levadura, que dirige la secreción de proteínas heterólogas, puede insertarse entre el promotor y el gen estructural a expresar. Véase, por ejemplo, Kurjan et al., *Cell* 30: 933, 1982; y Bitter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5330, 1984. La secuencia líder puede modificarse para contener, cerca de su extremo 3', uno o más sitios de restricción útiles para facilitar la fusión de la secuencia líder a genes extraños.

[0057] Las secuencias de control de la transcripción y traducción en vectores de expresión a usar en la transformación de células de vertebrados pueden proporcionarse por fuentes virales. Por ejemplo, los promotores y potenciadores usados comúnmente proceden de Polioma, Adenovirus 2, Virus de Simio 40 (SV40) y citomegalovirus humano. Pueden usarse secuencias de ADN procedentes del genoma viral de SV40, por ejemplo, el origen de SV40, el promotor

temprano y tardío, potenciador, sitio de corte y empalme y sitio de poliadenilación, para proporcionar los otros elementos genéticos necesarios para la expresión de una secuencia de ADN heteróloga. Los promotores temprano y tardío son particularmente útiles porque los dos se obtienen fácilmente a partir del virus como un fragmento que también contiene el origen de replicación viral de SV40 (Fiers et al., *Nature* 273: 113, 1978). También pueden usarse fragmentos de SV40 más pequeños o más grandes, siempre que se incluya la secuencia de aproximadamente 250 pb que se extiende desde el sitio *Hind* III hacia el sitio *Bgl* II localizado en el origen de replicación viral. Además, pueden utilizarse promotores genómicos virales, secuencias de control y/o secuencias señal, siempre que dichas secuencias de control sean compatibles con la célula hospedadora elegida. Los vectores ilustrativos pueden construirse como se describe por Okayama y Berg (*Mol. Cell. Biol.* 3: 280, 1983).

[0058] Puede construirse un sistema útil para la expresión de alto nivel estable de ADNc del receptor de mamífero en células epiteliales mamarias murinas C127 sustancialmente como se describe por Cosman et al. (*Mol. Immunol.* 23: 935, 1986). Un vector eucariota preferido para la expresión de ADN de RANK se denomina pDC406 (McMahan et al., *EMBO J.* 10: 2821, 1991) e incluye secuencias reguladoras derivadas de SV40, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus Epstein-Barr (EBV). Otros vectores preferidos incluyen pDC409 y pDC410, que proceden de pDC406. pDC410 se obtuvo a partir de pDC406 sustituyendo el origen de replicación de EBV con secuencias codificantes del antígeno T grande de SV40. pDC409 difiere de pDC406 en que se ha delecionado un sitio de restricción de *Bgl* II fuera del sitio de clonación múltiple, haciendo único el sitio de *Bgl* II dentro del sitio de clonación múltiple.

[0059] Una línea celular útil que permite la replicación episomal de vectores de expresión, tales como pDC406 y pDC409, que contiene el origen de replicación de EBV, es CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478). La línea celular CV-1/EBNA se obtuvo por transfección de la línea celular CV-1 con un gen que codifica el antígeno 1 nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA-1) y expresa constitutivamente EBNA-1 dirigido por el promotor/potenciador temprano inmediato de CMV humano.

Células Hospedadoras

[0060] Las células hospedadoras transformadas son células que se han transformado o transfectado con vectores de expresión contruidos usando técnicas de ADN recombinante y que contienen secuencias que codifican las proteínas de la presente invención. Las células hospedadoras transformadas pueden expresar la proteína deseada (RANK u homólogos o análogos del mismo), pero las células hospedadoras transformadas para los fines de clonar o amplificar el ADN de la invención no necesitan expresar la proteína. Las proteínas expresadas preferentemente se secretarán en el sobrenadante de cultivo, dependiendo del ADN seleccionado, pero pueden depositarse en la membrana celular.

[0061] Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de proteínas incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores bajo el control de promotores apropiados. Los procariotas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus* spp. Las células eucariotas superiores incluyen líneas celulares establecidas procedentes de mamífero como se describe más adelante. También podrían emplearse sistemas de traducción sin células para producir proteínas usando ARN derivados de las construcciones de ADN descritas en el presente documento. Se describen vectores de clonación y expresión apropiados para uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levadura y mamíferos por Pouwels et al. (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985).

[0062] Pueden usarse hospedadores de expresión procariotas para la expresión de RANK, u homólogos o análogos de los mismos que no requieren un procesamiento proteolítico y disulfuro extensivo. Los vectores de expresión procariotas generalmente comprenden uno o más marcadores de selección fenotípicos, por ejemplo un gen que codifica proteínas que confieren resistencia a antibióticos o que suministra un requisito autotrófico, y un origen de replicación reconocido por el hospedador para asegurar la amplificación dentro del hospedador. Los hospedadores procariotas adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro del género *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aunque también pueden emplearse otros.

[0063] RANK recombinante también puede expresarse en hospedadores de levadura, preferentemente de especies de *Saccharomyces* tales como *S. cerevisiae*. También pueden emplearse levaduras de otros géneros tales como *Pichia* o *Kluyveromyces*. Los vectores de levadura generalmente contendrán un origen de replicación del plásmido de levadura 2 μ , o una secuencia de replicación autónoma (ARS), promotor, ADN que codifica la proteína, secuencias para la poliadenilación y terminación de la transcripción y un gen de selección. Preferentemente, los vectores de levadura incluirán un origen de replicación y un marcador de selección que permita la transformación tanto de levadura como de *E. coli*, por ejemplo, el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y el gen *trp1* de *S. cerevisiae*, que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, y un promotor derivado de un gen de levadura de alta expresión para inducir la transcripción de una secuencia estructural cadena abajo. Entonces, la presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona un entorno eficaz para detectar la transformación por el crecimiento en ausencia de triptófano.

[0064] Los protocolos de transformación de levadura adecuados se conocen por los expertos en la materia; se describe una técnica ejemplar por Hinnen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1929, 1978, selección de los transformantes Trp⁺ en un medio selectivo que consiste en base de nitrógeno de levadura al 0,67%, casaminoácidos al 0,5%, glucosa al 2%, adenina a 10 μ g/ml y 20 μ g/ml de uracilo. Las cepas hospedadoras transformadas por vectores

que comprenden el promotor de ADH2 pueden cultivarse para la expresión en un medio rico que consiste en extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 1% suplementada con adenina a 80 µg/ml y uracilo a 80 µg/ml. La desrepresión del promotor de ADH2 se produce después del agotamiento de la glucosa del medio. Se recogen sobrenadantes de levadura en bruto por filtración y se mantienen a 4°C antes de la purificación adicional.

[0065] Pueden emplearse diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar la proteína recombinante. Se revisan sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto por Luckow y Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen las líneas COS-7 de células de riñón de mono, descritas por Gluzman (*Cell* 23: 175, 1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector apropiado incluyendo, por ejemplo, CV-1/EBNA (ATCC CRL 10478), células L, C127, 3T3, ovario de hámster chino (CHO), líneas celulares HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender elementos no transcritos tales como un origen de replicación, un promotor adecuado y un potenciador unido al gen a expresar, y otras secuencias flanqueantes no transcritas 5' o 3', y secuencias no traducidas 5' o 3', tales como sitios de unión a ribosomas necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de corte y empalme, y secuencias de terminación de la transcripción.

Purificación de RANK Recombinante

[0066] Se preparan RANK purificado y homólogos y análogos del mismo cultivando sistemas de hospedador/vector adecuados para expresar los productos de traducción recombinantes de los ADN de la presente invención, que después se purifican del medio de cultivo o de los extractos celulares. Por ejemplo, primero pueden concentrarse sobrenadantes de sistemas que secretan la proteína recombinante en el medio de cultivo usando un filtro de concentración de proteínas disponible en el mercado, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon.

[0067] Después de la etapa de concentración, el concentrado puede aplicarse a una matriz de purificación adecuada. Por ejemplo, una matriz de afinidad adecuada puede comprender una contraestructura de proteína o lecitina o molécula de anticuerpo unida a un soporte adecuado. Como alternativa, puede emplearse una resina de intercambio aniónica, por ejemplo, una matriz o sustrato que tiene grupos dietilaminoetilo (DEAE) colgantes. Las matrices pueden ser acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos empleados comúnmente en la purificación de proteínas. Como alternativa, puede emplearse una etapa de intercambio catiónico. Los intercambiadores de cationes adecuados incluyen diversas matrices insolubles que comprenden grupos sulfopropilo o carboximetilo. Se prefieren los grupos sulfopropilo. La cromatografía de exclusión molecular también proporciona un medio para purificar las proteínas de la invención.

[0068] La cromatografía de afinidad es un método particularmente preferido para purificar RANK y homólogos del mismo. Por ejemplo, un RANK expresado como una proteína de fusión que comprende una región Fc de inmunoglobulina puede purificarse usando cromatografía de afinidad de Proteína A o Proteína G. Además, una proteína RANK que comprende un dominio de cremallera de oligomerización puede purificarse en una resina que comprende un anticuerpo específico para el dominio de cremallera de oligomerización. También pueden ser útiles anticuerpos monoclonales contra la proteína RANK en purificación por cromatografía de afinidad, utilizando métodos que son bien conocidos en la técnica. También puede usarse un ligando para preparar una matriz de afinidad para la purificación por afinidad de RANK.

[0069] Finalmente, puede emplearse una o más etapas de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) empleando medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice que tiene grupos metilo colgantes u otros grupos alifáticos, para purificar adicionalmente una composición de RANK. También pueden emplearse algunas o todas las etapas de purificación anteriores, en diversas combinaciones, para proporcionar una proteína recombinante homogénea.

[0070] La proteína recombinante producida en cultivo bacteriano normalmente se aísla por extracción inicial a partir de sedimentos celulares, seguido de una o más etapas de concentración, desplazamiento salino, intercambio iónico acuoso o cromatografía de exclusión molecular. Finalmente, puede emplearse cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales. Las células microbianas empleadas en la expresión de la proteína recombinante pueden romperse por cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o uso de agentes de lisado de células.

[0071] La fermentación de levaduras que expresan la proteína de la invención como una proteína secretada simplifica en gran medida la purificación. La proteína recombinante secretada resultante de una fermentación a gran escala puede purificarse por métodos análogos a los descritos por Urdal et al. (*J. Chromatog.* 296: 171, 1984). Esta referencia describe dos etapas de HPLC de fase inversa, secuenciales, para la purificación de GM-CSF humana recombinante en una columna de HPLC preparativa.

[0072] La proteína sintetizada en el cultivo recombinante se caracteriza por la presencia de componentes celulares, incluyendo proteínas, en cantidades y de un carácter que depende de las etapas de purificación tomadas para recuperar la proteína de la invención del cultivo. Estos componentes normalmente procederán de levadura, de procariotas o de un organismo eucariota superior no humano y preferentemente están presentes en cantidades contaminantes inocuas, del orden de menos de aproximadamente un 1 por ciento en peso. Además, el cultivo de células recombinantes permite la producción de las proteínas de la invención sin otras proteínas que pueden estar normalmente asociadas con las

proteínas como se encuentran en la naturaleza en la especie de origen.

Usos y Administración de Composiciones de RANK

- 5 [0073] La presente invención proporciona métodos para usar composiciones terapéuticas que comprenden una cantidad eficaz de una proteína y un diluyente y vehículo adecuado, y métodos para regular una respuesta inmune o inflamatoria. También se contempla el uso de RANK junto con receptores de citocinas o citocinas solubles, u otras moléculas inmunorreguladoras.
- 10 [0074] Para uso terapéutico, la proteína purificada se administra a un paciente, preferentemente un ser humano, para el tratamiento en una manera apropiada para la indicación. De esta manera, por ejemplo, las composiciones de proteínas RANK administradas para regular la función inmune pueden administrarse por inyección en embolada, infusión continua, liberación sostenida desde implantes u otra técnica adecuada. Típicamente, un agente terapéutico se administrará en forma de una composición que comprende RANK purificado, junto con vehículos, excipientes o diluyentes fisiológicamente aceptables. Dichos vehículos no serán tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas.
- 15 [0075] Normalmente, la preparación de dichas composiciones de proteína implica combinar la proteína de la invención con tampones, antioxidantes tales como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos incluyendo glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. Son diluyentes apropiados ejemplares solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero no específica. Preferentemente, el producto se formula como un liofilizado usando soluciones de excipiente apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse en ensayos. La cantidad y frecuencia de administración dependerá, por supuesto, de factores tales como la naturaleza y gravedad de la indicación a tratar, la respuesta deseada, el estado del paciente y similares.
- 20 [0076] Las formas solubles de RANK y otros antagonistas de RANK tales como anticuerpos monoclonales antagonistas pueden administrarse para inhibir la inducción inducida por RANK de la actividad de NF- κ B. NF- κ B es un factor de transcripción que se utiliza considerablemente por las células del sistema inmune, y juega un papel en la respuesta inflamatoria. De esta manera, los inhibidores de la señalización de RANK serán útiles en el tratamiento de afecciones en las que la señalización a través de RANK ha dado lugar a consecuencias negativas, por ejemplo, choque tóxico o séptico, o reacciones de injerto contra hospedador. También pueden ser útiles para interferir con el papel de NF- κ B en la transformación celular. Las células tumorales responden más a la radiación cuando su NF- κ B está bloqueado; de esta manera, el RANK soluble (u otros antagonistas de la señalización de RANK) será útil como terapia auxiliar para enfermedades caracterizadas por células neoplásicas que expresan RANK.
- 25 [0077] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.
- 30

EJEMPLO 1

[0078] El ejemplo describe la identificación y aislamiento de un ADN que codifica un nuevo miembro de la superfamilia de receptores del TNF. Se identificó un inserto de ADNc parcial con una fase de lectura abierta prevista que tenía alguna similitud con CD40 (un antígeno de la superficie celular presente en la superficie de células B humanas tanto normales como neoplásicas que, según se ha demostrado, juega un papel importante en la proliferación y diferenciación de células B; Stamenkovic et al., *EMBO J.* 8: 1403, 1989), en una base de datos que contenía información de secuencia de ADNc generados a partir de células dendríticas (DC) derivadas de médula ósea humana. El inserto se escindió del vector por digestión con endonucleasas de restricción, se purificó en gel, se marcó con ³²P y se usó para hibridar con manchas de transferencia de colonias generadas a partir de una biblioteca de ADNc de DC que contenía insertos de ADNc de mayor tamaño usando técnicas de hibridación y lavado de alta rigurosidad (hibridación en SSC 5x, formamida al 50% a 42°C durante una noche, lavado en SSC 0,5x a 63°C); se describen otras condiciones de alta rigurosidad adecuadas en Sambrook et al. en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; 1989), 9.52-9.55. Los experimentos iniciales produjeron un clon denominado 9D-8A (SEC ID N°: 1); el análisis posterior indicó que este clon contenía todo excepto el extremo 5' de un nuevo ADNc, con una secuencia de intrones prevista en el extremo 5' (nucleótidos 1-92 de la SEC ID N°: 1). Se realizaron hibridaciones de colonias adicionales y se aisló un segundo clon. El segundo clon, denominado 9D-15C (SEC ID N°: 3), contenía el extremo 5' sin interrupción de intrones pero no el extremo 3' completo. La SEC ID N°: 5 muestra la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de una proteína de longitud completa prevista basada en el alineamiento de las secuencias solapantes de las SEC ID N°: 1 y 3.

[0079] La proteína codificada se denominó RANK, por las siglas en inglés de activador del receptor de NF-κB. El ADNc codifica una proteína transmembrana de Tipo 1 prevista que tiene 616 restos aminoacídicos, con una secuencia señal prevista de 24 aminoácidos (el ordenador predijo que el sitio de escisión está después de la Leu24), un dominio extracelular de 188 aminoácidos, un dominio transmembrana de 21 aminoácidos y una cola citoplásmica de 383 aminoácidos. La región extracelular de RANK presentó una homología de aminoácidos significativa (38,5% de identidad, 52,3% de similitud) con CD40. Un vector de clonación (pBluescriptSK-) que contenía la secuencia de RANK humano, denominado pBluescript:huRANK (en *E. coli* DH10B) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD (ATCC) el 20 de diciembre de 1996, según los términos del Tratado de Budapest, y recibió el número de acceso 98285.

EJEMPLO 2

[0080] Este ejemplo describe la construcción de una construcción de ADN de RANK para expresar una proteína de fusión RANK/Fc. Se construyó una forma soluble de RANK fusionada a la región Fc de IgG₁ humana en el vector de expresión de mamífero pDC409 (documento USSN 08/571.579). Este vector de expresión codifica la secuencia líder de la fase de lectura abierta de Citomegalovirus (CMV) R27080 (SEC ID N°: 9), seguida de los aminoácidos 33-213 de RANK, seguido de una forma mutada del dominio constante de IgG₁ humana que presenta afinidad reducida por receptores de Fc (SEC ID N°: 8; para la proteína de fusión, la parte Fc de la construcción consistía en Arg3 a Lys232). También se preparó un vector de expresión alternativo que incluía los aminoácidos 1-213 de RANK (usando la secuencia líder nativa) seguidos de la muteína de IgG₁. Se descubrió que los dos vectores de expresión inducían altos niveles de expresión de la proteína de fusión RANK/Fc en células transfectadas.

[0081] Para obtener la proteína RANK/Fc, un plásmido de expresión RANK/Fc se introduce por transfección en células CV-1/EBNA y se recogen los sobrenadantes durante aproximadamente una semana. La proteína de fusión RANK/Fc se purifica por medios bien conocidos en la técnica para la purificación de proteínas de fusión de Fc, por ejemplo, por cromatografía en columna de proteína A sepharose de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (es decir, Pharmacia, Uppsala, Sweden). El análisis de SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida indicó que la proteína RANK/Fc purificada migraba con un peso molecular de ~55 kDa en presencia de un agente reductor, y a un peso molecular de ~110 kDa en ausencia de un agente reductor.

[0082] La secuenciación de aminoácidos N-terminales de la proteína purificada obtenida usando el líder R27080 de CMV mostró una escisión del 60% después de Ala20, una escisión del 20% después de Pro22 y una escisión del 20% después de Arg 28 (que es el sitio de escisión de Furina; los restos aminoacídicos son relativos a la SEC ID N°: 9); el análisis de aminoácidos N-terminales de la proteína de fusión expresada con el líder nativo mostró escisión predominantemente después de Gln25 (un 80% después de Gln25 y un 20% después de Arg23; los restos aminoacídicos son relativos a la SEC ID N°: 6, RANK de longitud completa). Las dos proteínas de fusión pudieron unirse a un ligando para RANK de una manera específica (es decir, se unieron a la superficie de diversas líneas celulares tales como la línea celular de timoma murino, EL4), indicando que la presencia de aminoácidos adicionales en el extremo N de RANK no interfiere con su capacidad de unirse a RANKL. Además, la construcción que comprendía el líder de CMV codificaba RANK empezando en el aminoácido 33; de esta manera, es de esperar que un péptido RANK que tenga un extremo N en un aminoácido entre Arg23 y Prot33, inclusive, pueda unirse a un ligando para RANK de una manera específica.

[0083] Otros miembros de la superfamilia de receptores de TNF tienen una región de aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión al ligando que se denomina región "espaciadora", que no es necesaria para la unión al ligando. En RANK, se predice que los aminoácidos entre 196 y 213 forman dicha región espaciadora. Por

consiguiente, es de esperar que una forma soluble de RANK que termina con un aminoácido en esta región retenga la capacidad de unirse a un ligando para RANK de una manera específica. Los aminoácidos C-terminales preferidos para los péptidos RANK solubles se seleccionan del grupo que consiste en los aminoácidos 213 y 196 de la SEC ID N°: 6, aunque otros aminoácidos en la región espaciadora pueden utilizarse como extremo C.

5 **EJEMPLO 3**

10 **[0084]** Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales contra RANK. Se emplean preparaciones de RANK recombinante purificada, por ejemplo, o células transfectadas que expresan altos niveles de RANK, para generar anticuerpos monoclonales contra RANK usando técnicas convencionales, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos 4.411.993. También puede usarse ADN que codifica RANK como inmunógeno, por ejemplo, como se revisa por Pardoll y Beckerleg en *Immunity* 3: 165, 1995. Dichos anticuerpos probablemente serán útiles para interferir con la señalización inducida por RANK (anticuerpos antagonistas o de bloqueo) o en la inducción de una señal por entrecruzamiento de RANK (anticuerpos agonistas), como componentes de ensayos de diagnóstico o de investigación para RANK o la actividad de RANK, o en purificación por afinidad de RANK.

15 **[0085]** Para inmunizar roedores, se emulsiona inmunógeno de RANK en un adyuvante (tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, alumbre u otro adyuvante, tal como adyuvante R700 de Ribí (Ribí, Hamilton, MT) y se inyecta en cantidades que varían de 10 a 100 µg por vía subcutánea en un roedor seleccionado, por ejemplo, ratones BALB/c o ratas de Lewis. El ADN puede administrarse por vía intradérmica (Raz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9519, 1994) o intramuscular (Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4156, 1993); se ha descubierto que la solución salina es un diluyente adecuado para antígenos basados en ADN. De diez días a tres semanas después, los animales inmunizados se refuerzan con más inmunógeno y después se refuerzan periódicamente en un programa de inmunización semanal, bisemanal o cada tres semanas.

20 **[0086]** Se extraen periódicamente muestras de suero por extracción de sangre retro-orbital o escisión de la punta de la cola para ensayar mediante el ensayo de transferencia puntual (dot-blot) (sándwich de anticuerpo), ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoprecipitación u otros ensayos adecuados, incluyendo análisis FACS. Después de la detección de un título de anticuerpos apropiado, a los animales positivos se les administra una inyección intravenosa de antígeno en solución salina. De tres a cuatro días después, los animales se sacrifican, se recogen los esplenocitos y se fusionan a una línea de células de mieloma murino (por ejemplo, NS1 o preferentemente Ag 8.653 [ATCC CRL 1580]). Las líneas de células de hibridoma generadas por este procedimiento se cultivan en múltiples placas de microtitulación en un medio selectivo (por ejemplo, uno que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina o HAT) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, híbridos de mieloma-mieloma e híbridos de esplenocito-esplenocito.

25 **[0087]** Los clones de hibridoma generados de esta manera pueden explorarse por ELISA con respecto a la reactividad con RANK, por ejemplo, por adaptaciones de las técnicas descritas por Engvall et al., *Immunochem.* 8: 871 (1971) y en la Patente de Estados Unidos N°: 4.703.004. Una técnica de exploración preferida es la técnica de captura de anticuerpos descrita por Beckman et al., *J. Immunol.* 144: 4212 (1990). Los clones positivos después se inyectan en las cavidades peritoneales de roedores singénicos para producir líquido ascítico que contiene altas concentraciones (>1 mg/ml) de anticuerpo monoclonal anti-RANK. El anticuerpo monoclonal resultante puede purificarse por precipitación con sulfato amónico seguido de cromatografía de exclusión molecular. Como alternativa, también puede usarse cromatografía de afinidad basada en la unión de un anticuerpo a proteína A o proteína G, así como cromatografía de afinidad basada en la unión a la proteína RANK.

30 **[0088]** Se generaron anticuerpos monoclonales usando la proteína de fusión RANK/Fc como inmunógeno. Estos reactivos se exploraron para confirmar la reactividad contra la proteína RANK. Usando los métodos descritos en el presente documento para controlar la actividad de los mAb, se aislaron tanto bloqueantes (es decir, anticuerpos que se unen a RANK e inhiben la unión de un ligando a RANK) como no bloqueantes (es decir, anticuerpos que se unen a RANK y no inhiben la unión al ligando).

45 **EJEMPLO 4**

50 **[0089]** Este ejemplo ilustra la inducción de la actividad NF-κB por RANK en células 293/EBNA (la línea celular se obtuvo por transfección de la línea celular 293 con un gen que codifica el antígeno nuclear-1 del virus de Epstein-Barr (EBNA-1) que expresa constitutivamente EBNA-1 dirigido por el promotor/potenciador temprano inmediato de CMV humano). La activación de la actividad de NF-κB se midió en células 293/EBNA esencialmente como se describe por Yao et al. (*Immunity* 3: 811, 1995). Se prepararon extractos nucleares y se analizaron con respecto a la actividad de NF-κB por un ensayo de retraso en gel usando un oligonucleótido de 25 pares de bases que incluía los sitios de unión a NF-κB. Se sembraron dos millones de células en placas de 10 cm dos días antes de la transfección con el ADN y se cultivaron en medio DMEM-F12 que contenía un 2,5% de FBS (suero bovino fetal). Las transfecciones con ADN se realizaron como se describe en el presente documento para los ensayos de promotor/indicador de IL-8.

55 **[0090]** Se prepararon extractos nucleares por solubilización de núcleos aislados con NaCl 400 mM (Yao et al., mencionado anteriormente). Se hibridaron oligonucleótidos que contenían un sitio de unión a NF-κB y se marcaron terminalmente con ³²P usando la ADN polinucleótido quinasa de T4. Las reacciones de cambio de movilidad contenían

10 µg de extracto nuclear, 4 µg de poli(dI-dC) y 15.000 cpm de oligonucleótido bicatenario marcado y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Los complejos de proteína-ADN resultantes se resolvieron en un gel de poliacrilamida nativo al 6% en tampón Tris-borato-EDTA 0,25 X.

[0091] La sobreexpresión de RANK tuvo como resultado la inducción de la actividad de NF-κB como se muestra por un cambio apropiado en la movilidad de la sonda radiactiva en el gel. Se observaron resultados similares cuando RANK se indujo por un ligando que se une a RANK y transduce una señal a las células que expresan el receptor (es decir, por co-transfección de las células con RANK humano y ADN de RANKL murino; véase el Ejemplo 7 presentado más adelante), y sería de esperar que esto se produjera cuando la inducción se hace con anticuerpos agonistas.

EJEMPLO 5

[0092] Este ejemplo describe un sistema promotor/indicador de genes basado en el promotor de Interleucina-8 (IL-8) humana usado para analizar la activación de la transcripción génica *in vivo*. Se sabe que la inducción de la transcripción del gen de IL-8 humano por las citocinas Interleucina-1 (IL-1) o el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF-α) es dependiente de los sitios de unión al factor de transcripción NF-IL-6 y NF-κB intacto. La fusión del promotor de IL-8 que responde a citocinas con un ADNc que codifica el receptor murino de IL-4 (mIL-4R) permite medir la activación del promotor por detección de la proteína indicadora heteróloga (mIL-4R) en la superficie celular de células transfectadas.

[0093] Se transfectan células epiteliales de riñón humano (293/EBNA) (a través del método de DEAE/DEXTRANO) con plásmidos que codifican: 1). la construcción indicador/promotor (denominada pIL-8rep) y 2). el o los ADNc de interés. Las concentraciones de ADN siempre se mantienen constantes por la adición de ADN de vector vacío. Las células 293/EBNA se cultivan a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/ml (3 ml/pocillo) en una placa de 6 pocillos y se incuban durante dos días antes de la transfección. Dos días después de la transfección, se detecta el receptor de mIL-4 por un radioinmunoensayo (RIA) como se describe más adelante.

[0094] En uno de estos experimentos, las células 293/EBNA se co-transfectaron con ADN que codificaba RANK y con ADN que codificaba RANKL (véase el Ejemplo 7 presentado más adelante). La co-expresión de este receptor y su contraestructura por las células da como resultado la activación del proceso de señalización de RANK. Para estos estudios de co-transfección, la concentración de ADN/pocillo para la transfección de DEAE fue la siguiente: 40 ng de pIL-8rep [pBluescriptSK – vector (Stratagene)]; 0,4 ng de CD40 (ADN que codifica CD40, un receptor de control; vector pCDM8); 0,4 ng de RANK (ADN que codifica RANK; vector pDC409) y 1-50 ng de CD40L (ADN que codifica el ligando para CD40, que actúa como control positivo cuando se co-transfecta con CD40 y como control negativo cuando se co-transfecta con RANK; en pDC304) o RANKL (ADN que codifica un ligando para RANK; en pDC406). Pueden realizarse experimentos similares usando RANKL soluble o anticuerpos agonistas para RANK para inducir células transfectadas con RANK.

[0095] Para el RIA específico de mIL-4R, un anticuerpo monoclonal reactivo con mIL-4R se marca con ^{125}I y a través de un método de conjugación con Cloramina T; la actividad específica resultante típicamente es de $1,5 \times 10^6$ cpm/nmol. Después de 48 horas, las células transfectadas se lavan una vez con medio (DMEM/F12, FBS al 5%). Los sitios de unión no específicos se bloquean por la adición de medio de unión precalentado que contiene un 5% de leche desnatada en polvo e incubación a 37°C/CO₂ al 5% en un incubador de cultivo de tejidos durante una hora. El medio de bloqueo se decanta y se añade tampón de unión que contiene ^{125}I anti-mIL-4R (clon M1; IgG1 de rata) a las células y se incuban con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación de las células con el anticuerpo radiomarcado, las células se lavan considerablemente con tampón de unión (2X) y dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las células se lisan en 1 ml de NaOH 0,5 M, y se mide la radiactividad total con un contador gamma.

[0096] Usando este ensayo, células 293/EBNA co-transfectadas con ADN que codificaban RANK mostraron actividad transcripcional, como se muestra por detección de mIL-4R en la superficie celular. La sobreexpresión de RANK dio como resultado la transcripción de mIL-4R, así como lo hizo la inducción de RANK por RANKL. Se observan resultados similares cuando RANK se induce por anticuerpos agonistas.

EJEMPLO 6

[0097] Este ejemplo ilustra la asociación de RANK con proteínas TRAF. La interacción de RANK con proteínas TRAF citoplásmicas se demostró por ensayos de co-inmunoprecipitación esencialmente como se describe por Hsu et al. (*Cell* 84: 299; 1996). En resumen, se co-transfectaron células 293/EBNA con plásmidos que dirigen la síntesis de RANK y TRAF2 o TRAF3 con el epítipo marcado (FLAG®; SEC ID N°: 7). Dos días después de la transfección, se marcaron las proteínas de la superficie con éster de biotina y las células se lisaron en un tampón que contenía NP-40 al 0,5%. RANK y las proteínas asociadas con este receptor se inmunoprecipitaron con anti-RANK, se lavaron minuciosamente, se resolvieron por separación electroforética en un gel de SDS-poliacrilamida al 6-10% y se transfirieron electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa para la transferencia de Western. La asociación de las proteínas TRAF2 y TRAF3 con RANK se visualizó por sondeo de la membrana con un anticuerpo que reconoce específicamente el epítipo FLAG®. TRAF 2 y 3 no inmunoprecipitaban con anti-RANK en ausencia de la expresión de RANK.

EJEMPLO 7

[0098] Este ejemplo describe el aislamiento de un ligando para RANK, denominado RANKL, por clonación de expresión directa. El ligando se clonó esencialmente como se describe en el documento USSN 08/249-189, presentado el 24 de mayo de 1994.

5 **[0099]** Para CD40L, en resumen, se preparó una biblioteca a partir de un clon de una línea celular de timoma de ratón EL-4 (ATCC TIB 39), denominada EL-40.5, obtenida por separación cinco veces con la proteína de fusión CD40/Fc biotinilada en un FACS (separador de células activadas por fluorescencia). La biblioteca de ADNc se obtuvo usando la metodología convencional; el ADN plasmídico se aisló y se introdujo por transfección en células CV1-EBNA subconfluentes usando un método de DEAE-dextrano. Los transfectantes se seleccionaron por autorradiografía en portaobjetos para la expresión de RANKL usando un método de unión de dos etapas con la proteína de fusión RANK/Fc como se preparó en el Ejemplo 2 seguido de anticuerpo de cabra anti-IgG humana radioyodado. Se aisló un clon que codificaba una proteína que se unía específicamente a RANK y se secuenció; el clon se denominó 11H. Un vector de expresión que contenía la secuencia de RANKL murina, denominado pDC406:muRANK-L (en *E. coli* DH10B), se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD (ATCC) el 20 de diciembre de 1996, según los términos del Tratado de Budapest, y recibió el número de acceso 98284. La secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos prevista de este clon se ilustran en la SEC ID N°: 10. Este clon no contenía una metionina iniciadora; se obtuvieron clones de longitud completa adicionales a partir de una biblioteca 7B9 (preparada sustancialmente como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.599.905, expedida el 4 de febrero de 1997); se descubrió que la región 5' era idéntica a la de RANKL humano como se muestra en la SEC ID N°: 12, aminoácidos 1 a 22, excepto por la sustitución de una Thr por Gly en el resto 9.

15 **[0100]** Este ligando es útil para evaluar la capacidad de RANK de unirse a RANKL por varios ensayos diferentes. Por ejemplo, pueden usarse células transfectadas que expresan RANKL en un ensayo FACS (o ensayo similar) para evaluar la capacidad de RANK soluble de unirse a RANKL. Además, pueden prepararse formas solubles de RANKL y usarse en ensayos que se conocen en la técnica (es decir, ensayos ELISA o BIAcore esencialmente como se describe en el documento USSN 08/249.189, presentado el 24 de mayo de 1994). RANKL también es útil en la purificación por afinidad de RANK, y como reactivo en métodos para medir los niveles de RANK en una muestra. RANKL soluble también es útil para inducir la activación de NF- κ B y de esta manera proteger a las células que expresan RANK de la apoptosis.

EJEMPLO 8

30 **[0101]** Este ejemplo describe el aislamiento de un ligando de RANK humano (RANKL) usando una técnica basada en PCR. Se usaron cebadores oligonucleotídicos específicos de ligando de RANK murino en reacciones de PCR usando ADNc de primera cadena derivado de la línea celular humana como moldes. Los cebadores correspondían a los nucleótidos 478-497 y al complemento de los nucleótidos 858-878 del ligando de RANK murino (SEC ID N°: 10). Una banda amplificada de aproximadamente 400 pb de longitud de una reacción usando la línea celular epidermoide humana KB (ATCC CCL-17) se purificó en gel y se determinó su secuencia de nucleótidos; la secuencia era idéntica en un 85% a la región correspondiente del ligando de RANK murino, confirmando que el fragmento procedía de RANKL humano.

35 **[0102]** Para obtener ADNc de RANKL humano de longitud completa, se radiomarcaron dos oligonucleótidos específicos de RANKL humano derivados de la secuencia de nucleótidos del producto de PCR KB y se usaron como sondas de hibridación para explorar una biblioteca de ADNc de PBL humanos preparada en lambda gt10 (Stratagene, La Jolla, CA), sustancialmente como se describe en la Patente de Estados Unidos 5.599.905, expedida el 4 de febrero de 1997. Se identificaron varias placas de hibridación positivas y se purificaron, sus insertos se subclonaron en pBluescript SK⁻ (Stratagene, La Jolla, CA) y se determinó su secuencia de nucleótidos. Se descubrió que un aislado, PBL3, codificaba la mayor parte del RANKL humano previsto, pero parecían faltar aproximadamente 200 pb de la región codificante 5'. Se descubrió que un segundo aislado, PBL5, codificaba gran parte del RANKL humano previsto, incluyendo el extremo 5' entero y 200 pb adicionales de la secuencia 5' no traducida.

40 **[0103]** El extremo 5' de PBL5 y el extremo 3' de PBL3 se unieron entre sí para formar un ADNc de longitud completa que codifica RANKL humano. La secuencia de nucleótidos y de aminoácidos prevista del ligando del RANK humano de longitud completa se muestra en la SEC ID N°: 12. El ligando de RANK humano comparte una identidad del 83% de nucleótidos y del 84% de aminoácidos con el ligando de RANK murino. Un vector de plásmido que contiene la secuencia de RANKL, denominado pBluescript:huRANK-L (en *E. coli* DH10B) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, MD (ATCC) el 11 de marzo de 1997 según los términos del Tratado de Budapest, y recibió el número de acceso 98354.

45 **[0104]** RANKL murino y humano son proteínas transmembrana de Tipo 2. RANKL murino contiene un dominio intracelular previsto de 48 aminoácidos, un dominio transmembrana de 21 aminoácidos y un dominio extracelular de 247 aminoácidos. RANKL humano contiene un dominio intracelular de 47 aminoácidos previsto, un dominio transmembrana de 21 aminoácidos y un dominio extracelular de 249 aminoácidos.

EJEMPLO 9

50 **[0105]** Este ejemplo describe el mapeo cromosómico de RANK humano usando estrategias de mapeo basadas en

PCR. Se realizaron asignaciones cromosómicas humanas iniciales usando RANK y cebadores de PCR específicos de RANKL y un kit de ADN BIOS Somatic Cell Hybrid PCRable de BIOS Laboratories (New Haven, CT), siguiendo las instrucciones del fabricante. RANK se localizó en el cromosoma humano 18; el ligando de RANK se localizó en el cromosoma 13 humano. Se realizó un mapeo más detallado usando un panel de mapeo con híbridos de radiación Genebridge 4 Radiation Hybrid Panel (Research Genetics, Huntsville, AL; descrito en Walter, MA et al., *Nature Genetics* 7: 22-28, 1994). Los datos de este análisis después se presentaron electrónicamente al MIT Radiation Hybrid Mapper (URL: <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>) siguiendo las instrucciones contenidas en el mismo. Este análisis produjo nombres de marcadores genéticos específicos que, cuando se presentaron electrónicamente al navegador de NCBI Entrez (URL: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=c&form=0>), produjo las localizaciones de mapa específicas. RANK se localizó en el cromosoma 18q22.1 y RANKL se localizó en el cromosoma 13q14.

EJEMPLO 10

[0106] Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales contra RANKL. Se emplean preparaciones de RANKL recombinante purificado, por ejemplo, o células transfectadas que expresan altos niveles de RANKL, para generar anticuerpos monoclonales contra RANKL usando técnicas convencionales, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos 4.411.993. El ADN que codifica RANKL también puede usarse como inmunógeno, por ejemplo, como se revisa por Pardoll y Berckerleg en *Immunity* 3: 165, 1995. Dichos anticuerpos probablemente serán útiles para interferir con la señalización de RANKL (anticuerpos antagonistas o bloqueantes), como componentes de ensayos de diagnóstico o investigación para RANKL o la actividad de RANKL, o en la purificación por afinidad de RANKL.

[0107] Para inmunizar roedores, un inmunógeno de RANKL se emulsiona en un adyuvante (tal como adyuvante completo o incompleto de Freund, alumbre u otro adyuvante, tal como adyuvante R700 de Ribí (Ribí, Hamilton, MT)) y se inyecta en cantidades que varían de 10 a 100 µg por vía subcutánea en un roedor seleccionado, por ejemplo, ratones BALB/c o ratas Lewis. El ADN puede administrarse por vía intradérmica (Raz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9519, 1994) o por vía intramuscular (Wang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4156, 1993); se ha observado que la solución salina es un diluyente adecuado para antígenos basados en ADN. De diez días a tres semanas después, los animales inmunizados se refuerzan con un inmunógeno adicional y posteriormente se refuerzan periódicamente con un programa de inmunización semanal, bisemanal o cada tres semanas.

[0108] Se toman muestras de suero periódicamente por extracción retro-orbital o escisión de la punta de la cola para ensayar mediante un ensayo de transferencia puntual (sándwich de anticuerpo), ELISA (ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzima), inmunoprecipitación u otros ensayos adecuados, incluyendo análisis FACS. Después de la detección de un título de anticuerpo apropiado, a los animales positivos se les administra una inyección intravenosa de antígeno en solución salina. De tres a cuatro días después, los animales se sacrifican, se recogen los esplenocitos y se fusionan a una línea celular de mieloma murino (por ejemplo, NS1 o preferentemente Ag 8.653 [ATCC CRL 1580]). Se cultivan líneas celulares de hibridoma generadas por este procedimiento en múltiples placas de microtitulación en un medio selectivo (por ejemplo, uno que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina o HAT) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma-mieloma e híbridos de esplenocito-esplenocito.

[0109] Los clones de hibridoma generados de esta manera pueden explorarse por ELISA con respecto a la reactividad con RANKL, por ejemplo, por adaptaciones de las técnicas descritas por Engvall et al., *Immunochem.* 8: 871 (1971) y en la Patente de Estados Unidos 4.703.004. Una técnica de exploración preferida es la técnica de captura de anticuerpos descrita por Beckman et al., *J. Immunol.* 144: 4212 (1990). Los clones positivos después se inyectan en las cavidades peritoneales de roedores singénicos para producir líquido ascítico que contiene altas concentraciones (>1 mg/ml) de anticuerpo monoclonal anti-RANK. El anticuerpo monoclonal resultante puede purificarse por precipitación con sulfato amónico seguido de cromatografía de exclusión molecular. Como alternativa, también puede usarse cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpo a proteína A o proteína G, así como cromatografía de afinidad basada en la unión a proteína RANKL. Usando los métodos descritos en el presente documento para controlar la actividad de los mAb, se aíslan anticuerpos tanto bloqueantes (es decir, anticuerpos que se unen a RANKL e inhiben la unión a RANK) como anticuerpos no bloqueantes (es decir, anticuerpos que se unen a RANKL y no inhiben la unión).

EJEMPLO 11

[0110] Este ejemplo demuestra que la expresión de RANK puede regularse positivamente. Se purificaron células T de sangre periférica humana por separación por citometría de flujo o por selección negativa usando perlas recubiertas de anticuerpo, y se activaron con placas revestidas con anti-CD3 (OKT3, Dako) o fitohemaglutinina en presencia o ausencia de diversas citocinas, incluyendo Interleucina-4 (IL-4), Factor de Crecimiento de Transformación-β (TGF-β) y otras citocinas disponibles en el mercado (IL1-α, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IFN-γ, TNF-α). La expresión de RANK se evaluó por FACS en un experimento a lo largo del tiempo del día 2 al día 8, usando un anticuerpo monoclonal de ratón mAb144 (preparado como se describe en el Ejemplo 3), como se muestra en la tabla presentada a continuación. Los resultados se expresan como '+' a '++++' haciendo referencia al aumento relativo de intensidad de tinción con anti-RANK. También se realizaron experimentos de doble marcaje usando anticuerpos anti-RANK y anti-CD8 o anti-CD4.

Tabla 1: Regulación positiva de RANK por Citocinas

Citocina (concentración)	Resultados
IL-4 (50 ng/ml)	+
TGF- β (5 ng/ml)	+ a ++
IL-4 (50 ng/ml) + TGF- β (5 ng/ml)	++++
IL1- α (10 ng/ml)	-
IL-2 (20 ng/ml)	-
IL-3 (25 ng/ml)	-
IL-7 (20 ng/ml)	-
IL-8 (10 ng/ml)	-
IL-10 (50 ng/ml)	-
IL-12 (10 ng/ml)	-
IL-15 (10 ng/ml)	-
IFN- γ (100 U/ml)	-
TNF- α (10 ng/ml)	-

[0111] De las citocinas ensayadas, IL-4 y TGF- β aumentaron el nivel de expresión de RANK tanto en células T citotóxicas CD8⁺ como en células T auxiliares CD4⁺ del día 4 al día 8. La combinación de IL-4 y TGF- β actuó sinérgicamente para regular positivamente la expresión de este receptor sobre células T activadas. Esta combinación particular de citocinas se secreta por células T supresoras, y se cree que es importante en la generación de tolerancia (revisado en Mitchison y Sieper, *Z. Rheumatol.* 54: 141, 1995), implicando la interacción de RANK en la regulación de una respuesta inmune hacia la tolerancia o inducción de una respuesta inmune activa.

EJEMPLO 12

[0112] Este ejemplo ilustra la influencia de RANK.Fc y hRANKL sobre el crecimiento de células T activadas. La adición de TGF β a linfocitos T de sangre periférica humana activados anti-CD3 induce la detención de la proliferación y finalmente la muerte de la mayoría de los linfocitos dentro de los primeros días de cultivo. Ensayamos el efecto de las interacciones RANK:RANKL sobre células T tratadas con TGF- β añadiendo RANK.Fc o RANKL humano soluble a cultivos de células T.

[0113] Se cultivaron células T de sangre periférica humana (7×10^5 PBT) durante seis días en placas de 24 pocillos revestidas con anti-CD3 (OKT3, 5 μ g/ml) y anti-Flag (M1, 5 μ g/ml) en presencia de TGF β (1 ng/ml) e IL-4 (10 ng/ml), con o sin RANK.Fc (10 μ g/ml) o hRANKL (1 μ g/ml) soluble marcado con FLAG recombinante. La recuperación de células T viables se determinó por recuentos con azul tripan por triplicado.

[0114] La adición de RANK.Fc redujo significativamente el número de células T viables recuperadas después de seis días, mientras que RANKL soluble aumentó en gran medida la recuperación de células T viables (Figura 1). De esta manera, RANKL endógeno o exógeno aumenta el número de células T viables generadas en presencia de TGF β . TGF β , junto con IL-4, se ha implicado en la regulación de la respuesta inmune cuando se secreta por la subserie de T_H3/células T reguladoras. Se cree que estas células T median la supresión espectadora de células T efectoras. Por consiguiente, RANK y su ligando pueden actuar de una forma auto/paracrina para influir en la tolerancia de las células T. Además, se sabe que TGF β juega un papel en la evasión del sistema inmune efectuada por ciertos organismos patógenos u oportunistas. Además de jugar un papel en el desarrollo de tolerancia, RANK también puede jugar un papel en la evasión del sistema inmune por patógenos.

EJEMPLO 13

[0115] Este ejemplo ilustra la influencia de la interacción de RANK sobre células dendríticas (DC) CD1a⁺. Se generaron células dendríticas (DC) funcionalmente maduras *in vitro* a partir de progenitores de médula ósea (BM) CD34⁺. En resumen, se fraccionaron por densidad células BM humanas de voluntarios sanos normales usando medio de Ficoll y se aislaron por inmunoafinidad células CD34⁺ usando una columna de matriz anti-CD34 (Ceprate, CellPro). Las células BM CD34⁺ después se cultivaron en GM-CSF humano (20 ng/ml), IL-4 humana (20 ng/ml), TNF- α humano

(20 ng/ml), Flt3L humano derivado de CHO (FL; 100 ng/ml) en medio de Super McCoy suplementado con suero bovino fetal al 10% en un incubador completamente humidificado a 37°C (5% de CO₂) durante 14 días. Después se separaron DC CD1a⁺ y HLA-DR⁺ usando un FACStar Plus™ y se usaron para la evaluación biológica de RANK.

[0116] En DC CD1a⁺ humanas procedentes de células de médula ósea CD34⁺, solamente una subserie (20-30%) de las DC CD1a⁺ expresaron RANK en la superficie celular, como se evalúa por análisis de citometría de flujo. Sin embargo, la adición de CD40L a los cultivos de DC dio como resultado una expresión en la superficie de RANK en la mayoría de las DC CD1a⁺. Se ha demostrado que CD40L activa las DC al aumentar la formación de agrupamientos *in vitro*, induciendo cambios morfológicos de las DC y regulando positivamente la expresión de HLA-DR, CD54, CD58, CD80 y CD86.

[0117] La adición de RANKL a cultivos de DC aumentó significativamente el grado de agregación de DC y de formación de agrupamientos con respecto a los cultivos de control, de forma similar a los efectos observados con CD40L (Figura 2). Se cultivaron DC CD1a⁺ humanas separadas en un cóctel de citocinas (GM-CSF, IL-4, TNF- α y FL) (panel superior izquierdo), en cóctel más CD40L (1 μ g/ml) (superior derecho), en cóctel más RANKL (1 μ g/ml) (inferior izquierdo) o en cóctel más RANKL inactivado por calor (Δ H) (1 μ g/ml) (inferior derecho) en placas de cultivo de fondo plano de 24 pocillos en un medio de cultivo de 1 ml durante 48-72 horas y después se fotografiaron usando un microscopio de inversión. No fue evidente un aumento en la agregación de DC y la formación de agrupamientos con respecto a los cultivos de control cuando se usó RANKL inactivada con calor, lo que indica que este efecto era dependiente de la proteína biológicamente activa. Sin embargo, el análisis fenotípico inicial de la expresión de moléculas de adhesión indicó que el agrupamiento inducido por RANKL no se debía a los mayores niveles de CD2, CD11a, CD54 o CD58.

[0118] La adición de RANKL a DC CD1a⁺ aumentaba su capacidad alo-estimuladora en una reacción de linfocitos mixtos (MLR) al menos de 3 a 10 veces, de forma comparable a DC cultivadas con CD40L (Figura 3). Se incubaron células T alogénicas (1x10⁵) con números variables de DC irradiadas (2000 rad) cultivadas como se ha indicado anteriormente para la Figura 2 en placas de cultivo de fondo redondo de 96 pocillos en 0,2 ml de medio cultivo durante cuatro días. Los cultivos se sometieron a pulsos con 0,5 mCi de [³H]-timidina durante ocho horas y las células se recogieron sobre láminas de fibra de vidrio para el recuento en un contador β en fase gaseosa. Los recuentos de fondo para células T o DC cultivadas solas fueron <100 cpm. Los valores representan la media $\pm$ SD de cultivos por triplicado. RANKL inactivado por calor no tuvo ningún efecto. La actividad alo-estimuladora de DC no aumentó adicionalmente cuando se usaron RANKL y CD40L en combinación, posiblemente debido a la capacidad funcional de DC que había alcanzado un nivel máximo con cualquier citocina sola. Ni RANKL ni CD40L aumentaron el crecimiento *in vitro* de DC con respecto al periodo de cultivo de tres días. A diferencia de CD40L, RANKL no aumentó significativamente los niveles de expresión de HLA-DR ni la expresión de CD80 o CD86.

[0119] RANKL puede aumentar la formación de agrupamientos de DC y la capacidad funcional sin modular moléculas conocidas implicadas en la adhesión celular (CD18, CD54), la presentación de antígenos (HLA-DR) o la co-estimulación (CD86), estando todos estos procesos regulados por la señalización de CD40/CD40L. La ausencia de un efecto sobre la expresión de estas moléculas sugiere que RANKL puede regular la función de DC por una o más rutas alternativas distintas de CD40/CD40L. Dado que CD40L regula la expresión en la superficie de RANK en DC generadas *in vitro* y que CD40L está regulada positivamente en células T activadas durante interacciones de DC-células T, RANK y su ligando pueden formar una parte importante de la cascada de activación que se induce durante la expansión de células T mediada por DC. Además, el cultivo de DC en RANKL da como resultado menores niveles de expresión de CD1b/c, y mayores niveles de CD83. Estas dos moléculas se modulan de forma similar durante la maduración de DC por CD40L (Caux et al. *J. Exp. Med.* 180: 1263; 1994), lo que indica que RANKL induce la maduración de DC.

[0120] Las células dendríticas se denominan células presentadoras de antígeno "profesionales", y tienen una alta capacidad de sensibilizar células T restringidas al MHC. Cada vez hay más interés en el uso de células dendríticas *ex vivo* como adyuvantes de vacunas para enfermedades infecciosas o tumores (véase, por ejemplo, Romani, et al., *J. Exp. Med.*, 180: 83, 1994). Por lo tanto, un agente tal como RANKL que induce la maduración de DC y aumenta la capacidad de células dendríticas de estimular una respuesta inmune probablemente será útil en la inmunoterapia de diversas enfermedades.

EJEMPLO 14

[0121] Este ejemplo describe el aislamiento del homólogo murino de RANK, denominado muRANK. MuRANK se aisló por una combinación de PCR de especies cruzadas e hibridación de colonias. Se explotó la conservación de restos de Cys en las pseudorrepeticiones ricas en Cys de los dominios extracelulares de proteínas miembro de la superfamilia de TNFR para diseñar cebadores de PCR basados en RANK para usar en ADNc de primera cadena murinas de diversas fuentes. Tanto el cebador cadena arriba con sentido como el cebador cadena abajo antisentido se diseñaron de manera que sus extremos 3' terminaran con restos Cys.

[0122] El cebador con sentido cadena arriba codificaba los nucleótidos 272-295 de la SEC ID N°: 5 (región que codifica los aminoácidos 79-86); el cebador antisentido cadena abajo codificaba el complemento de los nucleótidos 409-427 (región codificante de aminoácidos 124-130). Se prepararon y se realizaron reacciones de PCR convencionales usando estos cebadores y ADNc de primera cadena de diversas líneas celulares murinas o fuentes de tejidos. Se

realizaron treinta ciclos de reacción de 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 20 segundos. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis y se vieron bandas específicas en varias muestras. La banda de una muestra se purificó en gel y la secuenciación del ADN reveló que la secuencia entre los cebadores era aproximadamente un 85% idéntica a la secuencia de nucleótidos de RANK humano correspondiente.

- 5 **[0123]** Se exploró una biblioteca de ADNc basada en plásmidos preparada a partir de la línea de epitelio de hígado fetal murino FLE18 (una de las líneas celulares identificadas como positivas en la exploración de PCR) con respecto a los ADNc de RANK de longitud completa usando sondas oligonucleotídicas específicas para RANK murino derivadas de la secuencia de RANK murina determinada por secuenciación del producto de PCR. Se recombinaron dos ADNc, uno que codificaba el extremo 5' y el otro que codificaba el extremo 3' de RANK murino de longitud completa (basándose en la comparación de secuencias con el RANK humano de longitud completa) para generar un ADNc de RANK murino de longitud completa. Las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de muRANK se muestran en las SEC ID N°: 14 y 15.
- 10
- 15 **[0124]** El ADNc codifica una proteína transmembrana de Tipo 1 prevista que tiene 625 restos aminoacídicos, con una secuencia señal prevista de 30 aminoácidos, un dominio extracelular de 184 aminoácidos, un dominio transmembrana de 21 aminoácidos y una cola citoplásmica de 390 aminoácidos. La región extracelular de muRANK presentaba una homología de aminoácidos significativa (69,7% de identidad, 80,8% de similitud) con huRANK. Los expertos en la materia reconocerán que el sitio de escisión real puede ser diferente del previsto por ordenador; por consiguiente, el extremo N de RANK puede ser desde el aminoácido 25 al aminoácido 35.
- 20 **[0125]** Otros miembros de la superfamilia de receptores de TNF tienen una región de aminoácidos entre el dominio transmembrana y el dominio de unión a ligando que se denomina región 'espaciadora', que no es necesaria para la unión del ligando. En muRANK, se predice que los aminoácidos entre 197 y 214 forman dicha región espaciadora. Por consiguiente, es de esperar que una forma soluble de RANK que termina con un aminoácido en esta región retenga la capacidad de unirse a un ligando para RANK de una manera específica. Se seleccionan aminoácidos C-terminales preferidos para péptidos RANK solubles del grupo que consiste en los aminoácidos 214 y 197 de la SEC ID N°: 14, aunque pueden utilizarse otros aminoácidos en la región espaciadora como extremo C.
- 25

EJEMPLO 15

[0126] Este ejemplo ilustra la preparación de varias formas solubles diferentes de RANK y RANKL. Se usaron técnicas convencionales de corte con enzimas de restricción y ligamiento, en combinación con aislamiento basado en PCR de fragmentos para los cuales no existían sitios de restricción convenientes. Cuando se utilizó la PCR, los productos de PCR se secuenciaron para averiguar si se había introducido alguna mutación; no se encontraron estas mutaciones.

[0127] Además del huRANK/Fc descrito en el Ejemplo 2, se preparó otra proteína de fusión RANK/Fc por ligamiento de ADN que codificaba los aminoácidos 1-213 de la SEC ID N°: 6 a ADN que codificaba los aminoácidos 3-232 de la muteína de Fc descrita previamente (SEC ID N°: 8). Se preparó una construcción similar para RANK murino, ligando ADN que codificaba los aminoácidos 1-213 de RANK murino de longitud completa (SEC ID N°: 15) a ADN que codificaba los aminoácidos 3-232 de la muteína de Fc (SEC ID N°: 8).

[0128] Se preparó una versión poli-His, marcada, soluble de huRANKL por ligamiento de ADN que codificaba el péptido líder de la cadena kappa de inmunoglobulina (SEC ID N°: 16) a ADN que codificaba una versión corta del marcador FLAG™ (SEC ID N°: 17), seguido de codones que codificaban Gly Ser, y después un marcador poli-His (SEC ID N°: 18), seguido de codones que codificaban Gly Thr Ser y ADN que codificaba los aminoácidos 138-317 de la SEC ID N°: 13. Se preparó una versión marcada con poli-His soluble de RANKL murino por ligamiento de ADN que codificaba el líder de CMV (SEC ID N°: 9) a codones que codificaban Arg Thr Ser, seguido de ADN que codificaba poli-His (SEC ID N°: 18) y seguido de ADN que codificaba los aminoácidos 119-294 de la SEC ID N°: 11.

[0129] Se preparó una forma oligomérica soluble de huRANKL por ligamiento de ADN que codificaba el líder de CMV (SEC ID N°: 9) a un codón que codificaba Asp seguido de ADN que terminaba en una cremallera de "leucina" de formación de trímeros (SEC ID N°: 19), y después por codones que codificaban Thr Arg Ser seguido de los aminoácidos 138-317 de la SEC ID N°: 13.

[0130] Estas y otras construcciones se preparan por experimentación rutinaria. Los diversos ADN después se insertan en un vector de expresión adecuado y se expresan. Son vectores de expresión particularmente preferidos los que pueden usarse en células de mamífero. Por ejemplo, pDC409 y pDC304, descritos en el presente documento, son útiles para la expresión transitoria. Para una transfección estable, se prefiere el uso de células CHO; en el documento USSN 08/785.150, ahora admitido, se describen varios vectores útiles, por ejemplo, uno de los vectores de expresión derivados de λ 2A5-3 analizados en el presente documento.

EJEMPLO 16

[0131] Este ejemplo demuestra que la expresión de RANKL puede regularse positivamente en células T murinas. Se obtuvieron células de ganglios linfáticos mesentéricos de ratones C57BL/6 y se activaron con placas recubiertas de anti-CD3, Concanavalina A (ConA) o acetato de miristato de forbol en combinación con ionomicina (anti-CD3: 500A2; Immunex Corporation, Seattle WA; ConA, PMA, ionomicina, Sigma, St. Louis, MO) sustancialmente como se describe en el presente documento, y se cultivaron durante aproximadamente 2 a 5 días. La expresión de RANKL se evaluó en un análisis de tres colores por FACS, usando anticuerpos contra los marcadores de células T CD4, CD8 y CD45RB y RANK/Fc, preparados como se describe en el presente documento.

[0132] RANKL no se expresó en células T murinas no estimuladas. Las células T estimuladas con anti-CD3, ConA o PMA/ionomicina, mostraron expresión diferencial de RANKL: las células CD4⁺/CD45RBL^{Lo} y CD4⁺/CD45RB^{Hi} fueron positivas para RANKL, pero las células CD8⁺ no. RANKL no se observó en células B, de forma similar a los resultados observados con células humanas.

EJEMPLO 17

[0133] Este ejemplo ilustra los efectos de RANKL murino sobre la proliferación y la activación celular. Se evaluaron diversas células o líneas celulares representativas de células que juegan un papel en una respuesta inmune (bazo, timo y ganglios linfáticos murinos) cultivándolas en condiciones que promovían su viabilidad, en presencia o ausencia de RANKL. RANKL no estimulaba a ninguna de las células ensayadas para que proliferaran. Una línea celular, una línea celular de macrófagos denominada RAW 264.7 (número de acceso de ATCC TIB 71) mostró algunos signos de activación.

[0134] Las células RAW producen constitutivamente pequeñas cantidades de TNF- α . La incubación con RANKL humano o murino aumentaba la producción de TNF- α por estas células de una manera dependiente de la dosis. Los resultados no se debían a la contaminación de las preparaciones de RANKL con endotoxina, ya que la ebullición de RANKL durante 10 minutos impedía la producción de TNF- α , mientras que un tratamiento similar de endotoxina purificada (LPS) no afectaba a la capacidad del LPS de estimular la producción de TNF- α . A pesar del hecho de que RANKL activaba la línea celular de macrófagos RAW T64.7 para la producción de TNF- α , ni RANKL humano ni RANKL murino estimulaban la producción de óxido nítrico por estas células.

EJEMPLO 18

[0135] Este ejemplo ilustra los efectos de RANKL murino sobre el crecimiento y desarrollo del timo en ratones fetales.

Se inyectaron ratones hembra preñadas con 1 mg de RANK/Fc o proteína de control de vehículo (albúmina de suero murino; MSA) los días 13, 16 y 19 de gestación. Después del nacimiento, en los recién nacidos se continuó inyectando RANK/Fc por vía intraperitoneal (IP) en una base diaria, empezando a una dosis de 1 µg y doblando la dosis aproximadamente cada cuatro días, para llegar a una dosificación final de 4 µg. Se recogieron los recién nacidos en los días 1, 8 y 15 después del nacimiento, se recogieron sus timos y bazo y se examinaron con respecto al tamaño, celularidad y composición fenotípica.

[0136] Se observó una ligera reducción en el tamaño del timo el día 1 en los recién nacidos de hembras inyectadas con RANK/Fc; no se observó una reducción de tamaño similar en los recién nacidos de control. El día 8, el tamaño del timo y la celularidad se habían reducido aproximadamente un 50% en los animales tratados con RANK/Fc en comparación con los ratones tratados con MSA. El análisis fenotípico demostró que las proporciones relativas de diferentes poblaciones de células T en el timo de los ratones RANK/Fc eran iguales a las de los ratones de control, indicando que la celularidad reducida se debía a una depresión global en el número de células T tímicas en lugar de deberse a una reducción en una o más poblaciones específicas. Los recién nacidos tratados con RANK/Fc no fueron significativamente diferentes de los recién nacidos de control el día 15 con respecto a su tamaño, celularidad o fenotipo de células tímicas. No se observó ninguna diferencia significativa en el tamaño del bazo, celularidad o composición en ninguno de los puntos del tiempo evaluados. La diferencia en celularidad el día 8 y no el día 15 puede sugerir que RANK/Fc puede ejercer su efecto de forma temprana en el desarrollo tímico.

EJEMPLO 19

[0137] Este ejemplo demuestra que la región C-terminal del dominio citoplásmico de RANK es importante para la unión de varias proteínas TRAF diferentes. RANK contiene al menos dos motivos PXQX(X)T reconocibles que son probables sitios de acoplamiento de TRAF. Por consiguiente, se evaluó la importancia de diversas regiones del dominio citoplásmico de RANK para la unión de TRAF. Se preparó una proteína de fusión RANK/GST sustancialmente como se describe en Smith y Johnson, *Gene* 67: 31 (1988), y se usó en la preparación de diversos truncamientos como se describe más adelante.

[0138] La comparación de la secuencia de nucleótidos de RANK murino y humano indicó que había varias regiones conservadas que podían ser importantes para la unión de TRAF. Por consiguiente, se desarrolló una técnica basada en PCR para facilitar la preparación de diversos truncamientos C-terminales que retendrían las regiones conservadas. Se diseñaron cebadores de PCR para introducir un codón de terminación y un sitio de enzima de restricción en puntos seleccionados, produciendo los truncamientos descritos en la Tabla 1 mostrada a continuación. La secuenciación confirmó que no se habían introducido mutaciones indeseadas en las construcciones.

[0139] Se prepararon proteínas TRAF radiomarcadas (³²S-Met, Cys) por traducción *in vitro* usando un kit de lisado de reticulocitos disponible en el mercado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega). Las proteínas de fusión de GST truncadas se purificaron sustancialmente como se describe en Smith y Johnson (mencionado anteriormente). En resumen, se transfectó *E. coli* con un vector de expresión que codificaba una proteína de fusión y se indujo para expresar la proteína. Las bacterias se lisaron, se retiró el material insoluble y la proteína de fusión se aisló por precipitación con perlas revestidas con glutatión (Sephacrose 4B, Pharmacia, Uppsala Sweden).

[0140] Las perlas se lavaron y se incubaron con diversas proteínas TRAF radiomarcadas. Después de las etapas de incubación y lavado, se retiraron los complejos de proteína de fusión/TRAF de las perlas por ebullición en SDS al 0,1% + β-mercaptoetanol, y se cargaron en geles de SDS al 12% (Novex). Los geles se sometieron a una autorradiografía y se registró la presencia y ausencia del material radiomarcado. Los resultados se muestran en la Tabla 2 proporcionada a continuación.

Tabla 2: Unión de Diversas Proteínas TRAF al Dominio Citoplásmico de RANK

Truncamientos: C terminales	E206-S339	E206-Y421	E206-M476	E206-G544	Longitud Completa
TRAF 1	-	-	-	-	++
TRAF2	-	-	-	-	++
TRAF3	-	-	-	-	++
TRAF4	-	-	-	-	-
TRAF5	-	-	-	-	+
TRAF6	-	+	+	+	++

[0141] Estos resultados indican que TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 y TRAF6 se unen a la parte más distal del dominio citoplásmico de RANK (entre el aminoácido G544 y A616). TRAF6 también tiene un sitio de unión entre S339 e Y421. En este experimento, TRAF5 también se unía al dominio citoplásmico de RANK.

LISTA DE SECUENCIAS

[0142]

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

5

(i) SOLICITANTE: Immunex Corporation

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: Activador del receptor de NF-KappaB

10

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 19

(iv) DIRECCIÓN POSTAL:

(A) DIRECCIÓN: Immunex Corporation, Law Department

(B) CALLE: 51 University Street

15

(C) CIUDAD: Seattle

(D) ESTADO: WA

(E) PAÍS: USA

(E) CÓDIGO POSTAL: 98101

20

(v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR

(A) TIPO DE SOPORTE: Disquete flexible

(B) ORDENADOR: Apple Power Macintosh

(C) SISTEMA OPERATIVO: Apple Operating System 7.5.5

(D) SOFTWARE: Microsoft Word for Power Macintosh 6.0.1

25

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD:

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 22 DE DICIEMBRE DE 1997

(C) CLASIFICACIÓN:

30

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 60/064.671

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 14 DE OCTUBRE DE 1997

(C) CLASIFICACIÓN:

35

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 08/813.509

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 7 DE MARZO DE 1997

(C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

- 5
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: USSN 08/772.330 (60/064.671)
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 23 DE DICIEMBRE DE 1996
 - (C) CLASIFICACIÓN:

(viii) INFORMACIÓN DEL MANDATARIO/AGENTE

- 10
- (A) NOMBRE: Perkins, Patricia Anne
 - (B) NÚMERO DE REGISTRO: 34.693
 - (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 2851-WO

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIONES

- 15
- (A) TELÉFONO: (206)587-0430
 - (B) TELEFAX: (206) 233-0644

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20
- (A) LONGITUD: 3115 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

- 30
- (A) ORGANISMO: HOMO SAPIENS

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (A) BIBLIOTECA: CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADA DE MÉDULA ÓSEA
- (B) CLON: 9D-8A

(ix) CARACTERÍSTICAS:

- 35
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) LOCALIZACIÓN: 93..1868

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 1

GCTGCTGCTG	CTCTGCGCGC	TGCTCGCCCG	GCTGCAGTTT	TATCCAGAAA	GAGCTGTGTG	60
GACTCTCTGC	CTGACCTCAG	TGTTCTTTTC	AG	GTG	GCT	113
			Val	Ala	Leu	
			1		5	
CCA TGT ACC AGT GAG AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC	161					
Pro Cys Thr Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn						
10 15 20						
AAA TGT GAA CCA GGA AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT	209					
Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser						
25 30 35						
GAC AGT GTA TGT CTG CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG	257					
Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp						
40 45 50 55						
AAT GAA GAA GAT AAA TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG	305					
Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys						
60 65 70						
GCC CTG GTG GCC GTG GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC	353					
Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys						
75 80 85						
GCG TGC ACG GCT GGG TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC	401					
Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg						
90 95 100						
CGC AAC ACC GAG TGC GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG	449					
Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln						
105 110 115						
CTC AAC AAG GAC ACA GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT	497					
Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser						
120 125 130 135						

GAT	GCC	TTT	TCC	TCC	ACG	GAC	AAA	TGC	AGA	CCC	TGG	ACC	AAC	TGT	ACC	545
Asp	Ala	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Lys	Cys	Arg	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	Thr	
			140					145					150			
TTC	CTT	GGA	AAG	AGA	GTA	GAA	CAT	CAT	GGG	ACA	GAG	AAA	TCC	GAT	GCG	593
Phe	Leu	Gly	Lys	Arg	Val	Glu	His	His	Gly	Thr	Glu	Lys	Ser	Asp	Ala	
			155					160					165			
GTT	TGC	AGT	TCT	TCT	CTG	CCA	GCT	AGA	AAA	CCA	CCA	AAT	GAA	CCC	CAT	641
Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	
		170					175					180				
GTT	TAC	TTG	CCC	GGT	TTA	ATA	ATT	CTG	CTT	CTC	TTC	GCG	TCT	GTG	GCC	689
Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	
	185					190					195					
CTG	GTG	GCT	GCC	ATC	ATC	TTT	GGC	GTT	TGC	TAT	AGG	AAA	AAA	GGG	AAA	737
Leu	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	
200				205				210						215		
GCA	CTC	ACA	GCT	AAT	TTG	TGG	CAC	TGG	ATC	AAT	GAG	GCT	TGT	GGC	CGC	785
Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	
			220					225						230		
CTA	AGT	GGA	GAT	AAG	GAG	TCC	TCA	GGT	GAC	AGT	TGT	GTC	AGT	ACA	CAC	833
Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	
			235					240					245			
ACG	GCA	AAC	TTT	GGT	CAG	CAG	GGA	GCA	TGT	GAA	GGT	GTC	TTA	CTG	CTG	881
Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	
		250					255					260				
ACT	CTG	GAG	GAG	AAG	ACA	TTT	CCA	GAA	GAT	ATG	TGC	TAC	CCA	GAT	CAA	929
Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	
	265					270				275						
GGT	GGT	GTC	TGT	CAG	GGC	ACG	TGT	GTA	GGA	GGT	GGT	CCC	TAC	GCA	CAA	977
Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	
280				285				290							295	
GGC	GAA	GAT	GCC	AGG	ATG	CTC	TCA	TTG	GTC	AGC	AAG	ACC	GAG	ATA	GAG	1025
Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	
			300					305						310		
GAA	GAC	AGC	TTC	AGA	CAG	ATG	CCC	ACA	GAA	GAT	GAA	TAC	ATG	GAC	AGG	1073
Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	
			315					320					325			
CCC	TCC	CAG	CCC	ACA	GAC	CAG	TTA	CTG	TTC	CTC	ACT	GAG	CCT	GGA	AGC	1121
Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	
		330					335					340				
AAA	TCC	ACA	CCT	CCT	TTC	TCT	GAA	CCC	CTG	GAG	GTG	GGG	GAG	AAT	GAC	1169
Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	
	345					350					355					
AGT	TTA	AGC	CAG	TGC	TTC	ACG	GGG	ACA	CAG	AGC	ACA	GTG	GGT	TCA	GAA	1217
Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	
360				365				370							375	

AGC TGC AAC TGC ACT GAG CCC CTG TGC AGG ACT GAT TGG ACT CCC ATG	1265
Ser Cys Asn Cys Thr Glu Pro Leu Cys Arg Thr Asp Trp Thr Pro Met	
380 385 390	
TCC TCT GAA AAC TAC TTG CAA AAA GAG GTG GAC AGT GGC CAT TGC CCG	1313
Ser Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Glu Val Asp Ser Gly His Cys Pro	
395 400 405	
CAC TGG GCA GCC AGC CCC AGC CCC AAC TGG GCA GAT GTC TGC ACA GGC	1361
His Trp Ala Ala Ser Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly	
410 415 420	
TGC CGG AAC CCT CCT GGG GAG GAC TGT GAA CCC CTC GTG GGT TCC CCA	1409
Cys Arg Asn Pro Pro Gly Glu Asp Cys Glu Pro Leu Val Gly Ser Pro	
425 430 435	
AAA CGT GGA CCC TTG CCC CAG TGC GCC TAT GGC ATG GGC CTT CCC CCT	1457
Lys Arg Gly Pro Leu Pro Gln Cys Ala Tyr Gly Met Gly Leu Pro Pro	
440 445 450 455	
GAA GAA GAA GCC AGC AGG ACG GAG GCC AGA GAC CAG CCC GAG GAT GGG	1505
Glu Glu Glu Ala Ser Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly	
460 465 470	
GCT GAT GGG AGG CTC CCA AGC TCA GCG AGG GCA GGT GCC GGG TCT GGA	1553
Ala Asp Gly Arg Leu Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly	
475 480 485	
AGC TCC CCT GGT GGC CAG TCC CCT GCA TCT GGA AAT GTG ACT GGA AAC	1601
Ser Ser Pro Gly Gly Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn	
490 495 500	
AGT AAC TCC ACG TTC ATC TCC AGC GGG CAG GTG ATG AAC TTC AAG GGC	1649
Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly	
505 510 515	
GAC ATC ATC GTG GTC TAC GTC AGC CAG ACC TCG CAG GAG GGC GCG GCG	1697
Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala	
520 525 530 535	
GCG GCT GCG GAG CCC ATG GGC CGC CCG GTG CAG GAG GAG ACC CTG GCG	1745
Ala Ala Ala Glu Pro Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala	
540 545 550	
CGC CGA GAC TCC TTC GCG GGG AAC GGC CCG CGC TTC CCG GAC CCG TGC	1793
Arg Arg Asp Ser Phe Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys	
555 560 565	
GGC GGC CCC GAG GGG CTG CGG GAG CCG GAG AAG GCC TCG AGG CCG GTG	1841
Gly Gly Pro Glu Gly Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val	
570 575 580	
CAG GAG CAA GGC GGG GCC AAG GCT TGA GCGCCCCCA TGGCTGGGAG	1888
Gln Glu Gln Gly Gly Ala Lys Ala	
585 590	
CCCGAAGCTC GGAGCCAGGG CTCGCGAGGG CAGCACCGCA GCCTCTGCCC CAGCCCCGGC	1948
CACCCAGGGA TCGATCGGTA CAGTCGAGGA AGACCACCCG GCATTCTCTG CCCACTTTGC	2008
CTTCCAGGAA ATGGGCTTTT CAGGAAGTGA ATTGATGAGG ACTGTCCCCA TGCCCACGGA	2068

TGCTCAGCAG CCCGCCGCAC TGGGGCAGAT GTCTCCCCTG CCACTCCTCA AACTCGCAGC 2128
 AGTAATTTGT GGCACATATGA CAGCTATTTT TATGACTATC CTGTTCTGTG GGGGGGGGGT 2188
 CTATGTTTTT CCCCCATATT TGTATTCCTT TTCATAACTT TTCTTGATAT CTTTCCTCCC 2248
 TCTTTTTTAA TGTAAGGTT TTCTCAAAAA TTCTCCTAAA GGTGAGGGTC TCTTTCTTTT 2308
 CTCTTTTCCT TTTTTTTTTC TTTTTTTTGGC AACCTGGCTC TGGCCCAGGC TAGAGTGCAG 2368
 TGGTGCGATT ATAGCCCGGT GCAGCCTCTA ACTCCTGGGC TCAAGCAATC CAAGTGATCC 2428
 TCCCACCTCA ACCTTCGGAG TAGCTGGGAT CACAGCTGCA GGCCACGCCC AGCTTCCTCC 2488
 CCCCAGCTCC CCCCCCCCAG AGACACGGTC CCACCATGTT ACCCAGCCTG GTCTCAAACT 2548
 CCCCAGCTAA AGCAGTCCTC CAGCCTCGGC CTCCCAAAGT ACTGGGATTA CAGGCGTGAG 2608
 CCCCCACGCT GGCCTGCTTT ACGTATTTTC TTTTGTGCCC CTGCTCACAG TGTTTTAGAG 2668
 ATGGCTTTCC CAGTGTGTGT TCATTGTAAA CACTTTTGGG AAAGGGCTAA ACATGTGAGG 2728
 CCTGGAGATA GTTGCTAAGT TGCTAGGAAC ATGTGGTGGG ACTTTCATAT TCTGAAAAAT 2788
 GTTCTATATT CTCATTTTTC TAAAAGAAAG AAAAAAGGAA ACCCGATTTA TTTCTCCTGA 2848
 ATCTTTTTTAA GTTTGTGTCG TTCCTTAAGC AGAACTAAGC TCAGTATGTG ACCTTACCCG 2908
 CTAGGTGGTT AATTTATCCA TGCTGGCAGA GGCACTCAGG TACTTGGTAA GCAAATTTCT 2968
 AAAACTCCAA GTTGCTGCAG CTTGGCATTC TTCTTATTCT AGAGGTCTCT CTGGAAAAGA 3028
 TGGAGAAAAT GAACAGGACA TGGGGCTCCT GGAAAGAAAG GGCCCGGGAA GTTCAAGGAA 3088
 GAATAAAGTT GAAATTTTAA AAAAAA 3115

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 2

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 591 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 2

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

Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn
 65 70 75 80
 Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser
 85 90 95
 Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu
 100 105 110
 Gly Ala Gln His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro
 115 120 125
 Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys
 130 135 140
 Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His
 145 150 155 160
 Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg
 165 170 175
 Lys Pro Pro Asn Glu Pro His Val Tyr Leu Pro Gly Leu Ile Ile Leu
 180 185 190
 Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala Leu Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val
 195 200 205
 Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp His Trp
 210 215 220
 Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg Leu Ser Gly Asp Lys Glu Ser Ser Gly
 225 230 235 240
 Asp Ser Cys Val Ser Thr His Thr Ala Asn Phe Gly Gln Gln Gly Ala
 245 250 255
 Cys Glu Gly Val Leu Leu Leu Thr Leu Glu Glu Lys Thr Phe Pro Glu
 260 265 270
 Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln Gly Gly Val Cys Gln Gly Thr Cys Val
 275 280 285
 Gly Gly Gly Pro Tyr Ala Gln Gly Glu Asp Ala Arg Met Leu Ser Leu
 290 295 300
 Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu Glu Asp Ser Phe Arg Gln Met Pro Thr
 305 310 315 320
 Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg Pro Ser Gln Pro Thr Asp Gln Leu Leu
 325 330 335
 Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser Lys Ser Thr Pro Pro Phe Ser Glu Pro
 340 345 350
 Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln Cys Phe Thr Gly Thr
 355 360 365
 Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu Ser Cys Asn Cys Thr Glu Pro Leu Cys
 370 375 380

Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu	385	390	395	400
Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Asn	405	410	415	
Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	Cys	Arg	Asn	Pro	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys	420	425	430	
Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Ser	Pro	Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	Pro	Gln	Cys	Ala	435	440	445	
Tyr	Gly	Met	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Ala	Ser	Arg	Thr	Glu	Ala	450	455	460	
Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser	Ala	465	470	475	480
Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Ser	Pro	Ala	485	490	495	
Ser	Gly	Asn	Val	Thr	Gly	Asn	Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	500	505	510	
Gln	Val	Met	Asn	Phe	Lys	Gly	Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln	515	520	525	
Thr	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Met	Gly	Arg	Pro	530	535	540	
Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala	Arg	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Asn	Gly	545	550	555	560
Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Pro	Cys	Gly	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg	Glu	Pro	565	570	575	
Glu	Lys	Ala	Ser	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Gln	Gly	Gly	Ala	Lys	Ala		580	585	590	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 3

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1391 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

15

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: HOMO SAPIENS

5

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADA DE MÉDULA ÓSEA

(B) CLON: 9D-15C

10

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 39..1391

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

CCGCTGAGGC CGCGGCGCCC GCCAGCCTGT CCCGCGCC ATG GCC CCG CGC GCC	53
Met Ala Pro Arg Ala	
1 5	
CGG CGG CGC CGC CCG CTG TTC GCG CTG CTG CTG CTC TGC GCG CTG CTC	101
Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu	
10 15 20	
GCC CGG CTG CAG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT ACC AGT GAG	149
Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu	
25 30 35	
AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC AAA TGT GAA CCA GGA	197
Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly	
40 45 50	
AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT GAC AGT GTA TGT CTG	245
Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu	
55 60 65	
CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG AAT GAA GAA GAT AAA	293
Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys	
70 75 80 85	
TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG GCC CTG GTG GCC GTG	341
Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val	
90 95 100	
GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC GCG TGC ACG GCT GGG	389
Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly	
105 110 115	
TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC CGC AAC ACC GAG TGC	437
Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys	
120 125 130	
GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG CTC AAC AAG GAC ACA	485
Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr	
135 140 145	
GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT GAT GCC TTT TCC TCC	533
Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser	
150 155 160 165	
ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC TTC CTT GGA AAG AGA	581
Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg	
170 175 180	
GTA GAA CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAT GCG GTT TGC AGT TCT TCT	629
Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser	
185 190 195	

CTG	CCA	GCT	AGA	AAA	CCA	CCA	AAT	GAA	CCC	CAT	GTT	TAC	TTG	CCC	GGT	677
Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	
		200					205					210				
TTA	ATA	ATT	CTG	CTT	CTC	TTC	GCG	TCT	GTG	GCC	CTG	GTG	GCT	GCC	ATC	725
Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	
	215					220					225					
ATC	TTT	GGC	GTT	TGC	TAT	AGG	AAA	AAA	GGG	AAA	GCA	CTC	ACA	GCT	AAT	773
Ile	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	
230					235					240					245	
TTG	TGG	CAC	TGG	ATC	AAT	GAG	GCT	TGT	GGC	CGC	CTA	AGT	GGA	GAT	AAG	821
Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	
				250					255					260		
GAG	TCC	TCA	GGT	GAC	AGT	TGT	GTC	AGT	ACA	CAC	ACG	GCA	AAC	TTT	GGT	869
Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	
			265					270					275			
CAG	CAG	GGA	GCA	TGT	GAA	GGT	GTC	TTA	CTG	CTG	ACT	CTG	GAG	GAG	AAG	917
Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	
		280					285					290				
ACA	TTT	CCA	GAA	GAT	ATG	TGC	TAC	CCA	GAT	CAA	GGT	GGT	GTC	TGT	CAG	965
Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	
	295					300					305					
GGC	ACG	TGT	GTA	GGA	GGT	GGT	CCC	TAC	GCA	CAA	GGC	GAA	GAT	GCC	AGG	1013
Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	
310					315					320					325	
ATG	CTC	TCA	TTG	GTC	AGC	AAG	ACC	GAG	ATA	GAG	GAA	GAC	AGC	TTC	AGA	1061
Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	
				330					335					340		
CAG	ATG	CCC	ACA	GAA	GAT	GAA	TAC	ATG	GAC	AGG	CCC	TCC	CAG	CCC	ACA	1109
Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	
			345					350					355			
GAC	CAG	TTA	CTG	TTC	CTC	ACT	GAG	CCT	GGA	AGC	AAA	TCC	ACA	CCT	CCT	1157
Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys		Thr	Pro	Pro	
		360					365				370					
TTC	TCT	GAA	CCC	CTG	GAG	GTG	GGG	GAG	AAT	GAC	AGT	TTA	AGC	CAG	TGC	1205
Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	
	375					380					385					
TTC	ACG	GGG	ACA	CAG	AGC	ACA	GTG	GGT	TCA	GAA	AGC	TGC	AAC	TGC	ACT	1253
Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	
390					395					400					405	
GAG	CCC	CTG	TGC	AGG	ACT	GAT	TGG	ACT	CCC	ATG	TCC	TCT	GAA	AAC	TAC	1301
Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	
				410					415					420		
TTG	CAA	AAA	GAG	GTG	GAC	AGT	GGC	CAT	TGC	CCG	CAC	TGG	GCA	GCC	AGC	1349
Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Ser	
			425					430					435			
CCC	AGC	CCC	AAC	TGG	GCA	GAT	GTC	TGC	ACA	GGC	TGC	CGG	AAC			1391
Pro	Ser	Pro	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	Cys	Arg	Asn			
		440					445					450				

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

5

(A) LONGITUD: 451 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

10

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

```

Met Ala Pro Arg Ala Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu
 1          5          10          15

Leu Cys Ala Leu Leu Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro
 20          25          30

Pro Cys Thr Ser Glu Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn
 35          40          45

Lys Cys Glu Pro Gly Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser
 50          55          60

Asp Ser Val Cys Leu Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp
 65          70          75          80

Asn Glu Glu Asp Lys Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys
 85          90          95

Ala Leu Val Ala Val Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys
100          105          110

Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg
115          120          125

Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln
130          135          140

Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser
145          150          155          160

Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr
165          170          175

Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala
180          185          190

Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His
195          200          205

Val Tyr Leu Pro Gly Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala
210          215          220

Leu Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys
225          230          235          240

```

Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	
				245					250					255		
Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	
				260					265					270		
Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	
				275					280					285		
Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	
				290					295					300		
Gly	Gly	Val	Cys	Gln	Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	
				310					315					320		
Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	
				325					330					335		
Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	
				340					345					350		
Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	
				355					360					365		
Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	
				370					375					380		
Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	
				385					390					395		
Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	
				405					410					415		
Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	
				420					425					430		
His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly	
				435					440					445		
Cys	Arg	Asn														
				450												

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 5

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 3136 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

5

(A) ORGANISMO: HOMO SAPIENS

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA: CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADA DE MÉDULA ÓSEA

(B) CLON: RANK DE LONGITUD COMPLETA

10

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 39..1886

15

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

CCGCTGAGGC CGCGGCGCCC GCCAGCCTGT CCCGCGCC ATG GCC CCG CGC GCC	53
Met Ala Pro Arg Ala	
1 5	
CGG CGG CGC CGC CCG CTG TTC GCG CTG CTG CTG CTC TGC GCG CTG CTC	101
Arg Arg Arg Arg Pro Leu Phe Ala Leu Leu Leu Leu Cys Ala Leu Leu	
10 15 20	
GCC CGG CTG CAG GTG GCT TTG CAG ATC GCT CCT CCA TGT ACC AGT GAG	149
Ala Arg Leu Gln Val Ala Leu Gln Ile Ala Pro Pro Cys Thr Ser Glu	
25 30 35	
AAG CAT TAT GAG CAT CTG GGA CGG TGC TGT AAC AAA TGT GAA CCA GGA	197
Lys His Tyr Glu His Leu Gly Arg Cys Cys Asn Lys Cys Glu Pro Gly	
40 45 50	
AAG TAC ATG TCT TCT AAA TGC ACT ACT ACC TCT GAC AGT GTA TGT CTG	245
Lys Tyr Met Ser Ser Lys Cys Thr Thr Thr Ser Asp Ser Val Cys Leu	
55 60 65	
CCC TGT GGC CCG GAT GAA TAC TTG GAT AGC TGG AAT GAA GAA GAT AAA	293
Pro Cys Gly Pro Asp Glu Tyr Leu Asp Ser Trp Asn Glu Glu Asp Lys	
70 75 80 85	
TGC TTG CTG CAT AAA GTT TGT GAT ACA GGC AAG GCC CTG GTG GCC GTG	341
Cys Leu Leu His Lys Val Cys Asp Thr Gly Lys Ala Leu Val Ala Val	
90 95 100	
GTC GCC GGC AAC AGC ACG ACC CCC CGG CGC TGC GCG TGC ACG GCT GGG	389
Val Ala Gly Asn Ser Thr Thr Pro Arg Arg Cys Ala Cys Thr Ala Gly	
105 110 115	
TAC CAC TGG AGC CAG GAC TGC GAG TGC TGC CGC CGC AAC ACC GAG TGC	437
Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg Arg Asn Thr Glu Cys	
120 125 130	
GCG CCG GGC CTG GGC GCC CAG CAC CCG TTG CAG CTC AAC AAG GAC ACA	485
Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln Leu Asn Lys Asp Thr	
135 140 145	
GTG TGC AAA CCT TGC CTT GCA GGC TAC TTC TCT GAT GCC TTT TCC TCC	533
Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe Ser Ser	
150 155 160 165	
ACG GAC AAA TGC AGA CCC TGG ACC AAC TGT ACC TTC CTT GGA AAG AGA	581
Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr Phe Leu Gly Lys Arg	
170 175 180	
GTA GAA CAT CAT GGG ACA GAG AAA TCC GAT GCG GTT TGC AGT TCT TCT	629
Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala Val Cys Ser Ser Ser	
185 190 195	

CTG	CCA	GCT	AGA	AAA	CCA	CCA	AAT	GAA	CCC	CAT	GTT	TAC	TTG	CCC	GGT	677
Leu	Pro	Ala	Arg	Lys	Pro	Pro	Asn	Glu	Pro	His	Val	Tyr	Leu	Pro	Gly	
		200					205					210				
TTA	ATA	ATT	CTG	CTT	CTC	TTC	GCG	TCT	GTG	GCC	CTG	GTG	GCT	GCC	ATC	725
Leu	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Phe	Ala	Ser	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Ile	
		215				220					225					
ATC	TTT	GGC	GTT	TGC	TAT	AGG	AAA	AAA	GGG	AAA	GCA	CTC	ACA	GCT	AAT	773
Ile	Phe	Gly	Val	Cys	Tyr	Arg	Lys	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	
230					235					240					245	
TTG	TGG	CAC	TGG	ATC	AAT	GAG	GCT	TGT	GGC	CGC	CTA	AGT	GGA	GAT	AAG	821
Leu	Trp	His	Trp	Ile	Asn	Glu	Ala	Cys	Gly	Arg	Leu	Ser	Gly	Asp	Lys	
				250					255					260		
GAG	TCC	TCA	GGT	GAC	AGT	TGT	GTC	AGT	ACA	CAC	ACG	GCA	AAC	TTT	GGT	869
Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Ser	Cys	Val	Ser	Thr	His	Thr	Ala	Asn	Phe	Gly	
			265					270					275			
CAG	CAG	GGA	GCA	TGT	GAA	GGT	GTC	TTA	CTG	CTG	ACT	CTG	GAG	GAG	AAG	917
Gln	Gln	Gly	Ala	Cys	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Glu	Glu	Lys	
		280					285					290				
ACA	TTT	CCA	GAA	GAT	ATG	TGC	TAC	CCA	GAT	CAA	GGT	GGT	GTC	TGT	CAG	965
Thr	Phe	Pro	Glu	Asp	Met	Cys	Tyr	Pro	Asp	Gln	Gly	Gly	Val	Cys	Gln	
		295				300					305					
GGC	ACG	TGT	GTA	GGA	GGT	GGT	CCC	TAC	GCA	CAA	GGC	GAA	GAT	GCC	AGG	1013
Gly	Thr	Cys	Val	Gly	Gly	Gly	Pro	Tyr	Ala	Gln	Gly	Glu	Asp	Ala	Arg	
310					315					320					325	
ATG	CTC	TCA	TTG	GTC	AGC	AAG	ACC	GAG	ATA	GAG	GAA	GAC	AGC	TTC	AGA	1061
Met	Leu	Ser	Leu	Val	Ser	Lys	Thr	Glu	Ile	Glu	Glu	Asp	Ser	Phe	Arg	
				330					335					340		
CAG	ATG	CCC	ACA	GAA	GAT	GAA	TAC	ATG	GAC	AGG	CCC	TCC	CAG	CCC	ACA	1109
Gln	Met	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Met	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	Thr	
			345					350				355				
GAC	CAG	TTA	CTG	TTC	CTC	ACT	GAG	CCT	GGA	AGC	AAA	TCC	ACA	CCT	CCT	1157
Asp	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Pro	Gly	Ser	Lys	Ser	Thr	Pro	Pro	
		360					365					370				
TTC	TCT	GAA	CCC	CTG	GAG	GTG	GGG	GAG	AAT	GAC	AGT	TTA	AGC	CAG	TGC	1205
Phe	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	Cys	
		375				380					385					
TTC	ACG	GGG	ACA	CAG	AGC	ACA	GTG	GGT	TCA	GAA	AGC	TGC	AAC	TGC	ACT	1253
Phe	Thr	Gly	Thr	Gln	Ser	Thr	Val	Gly	Ser	Glu	Ser	Cys	Asn	Cys	Thr	
390					395				400						405	
GAG	CCC	CTG	TGC	AGG	ACT	GAT	TGG	ACT	CCC	ATG	TCC	TCT	GAA	AAC	TAC	1301
Glu	Pro	Leu	Cys	Arg	Thr	Asp	Trp	Thr	Pro	Met	Ser	Ser	Glu	Asn	Tyr	
				410					415					420		
TTG	CAA	AAA	GAG	GTG	GAC	AGT	GGC	CAT	TGC	CCG	CAC	TGG	GCA	GCC	AGC	1349
Leu	Gln	Lys	Glu	Val	Asp	Ser	Gly	His	Cys	Pro	His	Trp	Ala	Ala	Ser	
			425					430					435			

CCC AGC CCC AAC TGG GCA GAT GTC TGC ACA GGC TGC CGG AAC CCT CCT	1397
Pro Ser Pro Asn Trp Ala Asp Val Cys Thr Gly Cys Arg Asn Pro Pro	
440 445 450	
GGG GAG GAC TGT GAA CCC CTC GTG GGT TCC CCA AAA CGT GGA CCC TTG	1445
Gly Glu Asp Cys Glu Pro Leu Val Gly Ser Pro Lys Arg Gly Pro Leu	
455 460 465	
CCC CAG TGC GCC TAT GGC ATG GGC CTT CCC CCT GAA GAA GAA GCC AGC	1493
Pro Gln Cys Ala Tyr Gly Met Gly Leu Pro Pro Glu Glu Glu Ala Ser	
470 475 480 485	
AGG ACG GAG GCC AGA GAC CAG CCC GAG GAT GGG GCT GAT GGG AGG CTC	1541
Arg Thr Glu Ala Arg Asp Gln Pro Glu Asp Gly Ala Asp Gly Arg Leu	
490 495 500	
CCA AGC TCA GCG AGG GCA GGT GCC GGG TCT GGA AGC TCC CCT GGT GGC	1589
Pro Ser Ser Ala Arg Ala Gly Ala Gly Ser Gly Ser Ser Pro Gly Gly	
505 510 515	
CAG TCC CCT GCA TCT GGA AAT GTG ACT GGA AAC AGT AAC TCC ACG TTC	1637
Gln Ser Pro Ala Ser Gly Asn Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe	
520 525 530	
ATC TCC AGC GGG CAG GTG ATG AAC TTC AAG GGC GAC ATC ATC GTG GTC	1685
Ile Ser Ser Gly Gln Val Met Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val	
535 540 545	
TAC GTC AGC CAG ACC TCG CAG GAG GGC GCG GCG GCG GCT GCG GAG CCC	1733
Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln Glu Gly Ala Ala Ala Ala Glu Pro	
550 555 560 565	
ATG GGC CGC CCG GTG CAG GAG GAG ACC CTG GCG CGC CGA GAC TCC TTC	1781
Met Gly Arg Pro Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala Arg Arg Asp Ser Phe	
570 575 580	
GCG GGG AAC GGC CCG CGC TTC CCG GAC CCG TGC GGC GGC CCC GAG GGG	1829
Ala Gly Asn Gly Pro Arg Phe Pro Asp Pro Cys Gly Gly Pro Glu Gly	
585 590 595	
CTG CGG GAG CCG GAG AAG GCC TCG AGG CCG GTG CAG GAG CAA GGC GGG	1877
Leu Arg Glu Pro Glu Lys Ala Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln Gly Gly	
600 605 610	
GCC AAG GCT TGAGCGCCCC CCATGGCTGG GAGCCCGAAG CTCGGAGCCA	1926
Ala Lys Ala	
615	
GGGCTCGCGA GGGCAGCACC GCAGCCTCTG CCCCAGCCCC GGCCACCCAG GGATCGATCG	1986
GTACAGTCGA GGAAGACCAC CCGGCATTCT CTGCCCCACTT TGCCTTCCAG GAAATGGGCT	2046
TTTCAGGAAG TGAATTGATG AGGACTGTCC CCATGCCCCAC GGATGCTCAG CAGCCCGCCG	2106
CACTGGGGCA GATGTCTCCC CTGCCACTCC TCAAACCTCGC AGCAGTAATT TGTGGCACTA	2166
TGACAGCTAT TTTTATGACT ATCCTGTTCT GTGGGGGGGG GGTCTATGTT TTCCCCCAT	2226
ATTTGTATTC CTTTTCATAA CTTTTCTTGA TATCTTTCCT CCCTCTTTTT TAATGTAAAG	2286
GTTTTCTCAA AAATTCCTCT AAAGGTGAGG GTCTCTTTCT TTTCTCTTTT CCTTTTTTTT	2346

```

TTCTTTTTTTT GGCAACCTGG CTCTGGCCCA GGCTAGAGTG CAGTGGTGCG ATTATAGCCC 2406
GGTGCAGCCT CTAACCTCTG GGCTCAAGCA ATCCAAGTGA TCCTCCCACC TCAACCTTCG 2466
GAGTAGCTGG GATCACAGCT GCAGGCCACG CCCAGCTTCC TCCCCCGAC TCCCCCCCCC 2526
CAGAGACACG GTCCCACCAT GTTACCCAGC CTGGTCTCAA ACTCCCCAGC TAAAGCAGTC 2586
CTCCAGCCTC GGCCTCCCAA AGTACTGGGA TTACAGGCGT GAGCCCCCAC GCTGGCCTGC 2646
TTTACGTATT TTCTTTTGTG CCCCTGCTCA CAGTGTTTTA GAGATGGCTT TCCCAGTGTG 2706
TGTTTCATTGT AAACACTTTT GGGAAAGGCG TAAACATGTG AGGCCTGGAG ATAGTTGCTA 2766
AGTTGCTAGG AACATGTGGT GGGACTTTCA TATTCTGAAA AATGTTCTAT ATTCTCATTT 2826
TTCTAAAAGA AAGAAAAAAG GAAACCCGAT TTATTTCTCC TGAATCTTTT TAAGTTTGTG 2886
TCGTTCCCTTA AGCAGAACTA AGCTCAGTAT GTGACCTTAC CCGCTAGGTG GTTAATTTAT 2946
CCATGCTGGC AGAGGCACTC AGGTACTTGG TAAGCAAATT TCTAAAACTC CAAGTTGCTG 3006
CAGCTTGGA TTCTTCTTAT TCTAGAGGTC TCTCTGGAAA AGATGGAGAA AATGAACAGG 3066
ACATGGGGCT CCTGGAAAGA AAGGGCCCGG GAAGTTCAAG GAAGAATAAA GTTGAAATTT 3126
TAAAAAAAAA 3136

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 6

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 616 aminoácidos

(B) TIPO: ácido nucleico

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 6

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

Ala Cys Thr Ala Gly Tyr His Trp Ser Gln Asp Cys Glu Cys Cys Arg
 115 120 125
 Arg Asn Thr Glu Cys Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gln His Pro Leu Gln
 130 135 140
 Leu Asn Lys Asp Thr Val Cys Lys Pro Cys Leu Ala Gly Tyr Phe Ser
 145 150 155 160
 Asp Ala Phe Ser Ser Thr Asp Lys Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Thr
 165 170 175
 Phe Leu Gly Lys Arg Val Glu His His Gly Thr Glu Lys Ser Asp Ala
 180 185 190
 Val Cys Ser Ser Ser Leu Pro Ala Arg Lys Pro Pro Asn Glu Pro His
 195 200 205
 Val Tyr Leu Pro Gly Leu Ile Ile Leu Leu Leu Phe Ala Ser Val Ala
 210 215 220
 Leu Val Ala Ala Ile Ile Phe Gly Val Cys Tyr Arg Lys Lys Gly Lys
 225 230 235 240
 Ala Leu Thr Ala Asn Leu Trp His Trp Ile Asn Glu Ala Cys Gly Arg
 245 250 255
 Leu Ser Gly Asp Lys Glu Ser Ser Gly Asp Ser Cys Val Ser Thr His
 260 265 270
 Thr Ala Asn Phe Gly Gln Gln Gly Ala Cys Glu Gly Val Leu Leu Leu
 275 280 285
 Thr Leu Glu Glu Lys Thr Phe Pro Glu Asp Met Cys Tyr Pro Asp Gln
 290 295 300
 Gly Gly Val Cys Gln Gly Thr Cys Val Gly Gly Gly Pro Tyr Ala Gln
 305 310 315 320
 Gly Glu Asp Ala Arg Met Leu Ser Leu Val Ser Lys Thr Glu Ile Glu
 325 330 335
 Glu Asp Ser Phe Arg Gln Met Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Met Asp Arg
 340 345 350
 Pro Ser Gln Pro Thr Asp Gln Leu Leu Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ser
 355 360 365
 Lys Ser Thr Pro Pro Phe Ser Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp
 370 375 380
 Ser Leu Ser Gln Cys Phe Thr Gly Thr Gln Ser Thr Val Gly Ser Glu
 385 390 395 400
 Ser Cys Asn Cys Thr Glu Pro Leu Cys Arg Thr Asp Trp Thr Pro Met
 405 410 415
 Ser Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Glu Val Asp Ser Gly His Cys Pro
 420 425 430

His	Trp	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Asn	Trp	Ala	Asp	Val	Cys	Thr	Gly
		435						440				445			
Cys	Arg	Asn	Pro	Pro	Gly	Glu	Asp	Cys	Glu	Pro	Leu	Val	Gly	Ser	Pro
		450				455					460				
Lys	Arg	Gly	Pro	Leu	Pro	Gln	Cys	Ala	Tyr	Gly	Met	Gly	Leu	Pro	Pro
465					470					475					480
Glu	Glu	Glu	Ala	Ser	Arg	Thr	Glu	Ala	Arg	Asp	Gln	Pro	Glu	Asp	Gly
				485					490					495	
Ala	Asp	Gly	Arg	Leu	Pro	Ser	Ser	Ala	Arg	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly
			500					505					510		
Ser	Ser	Pro	Gly	Gly	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Gly	Asn	Val	Thr	Gly	Asn
		515					520					525			
Ser	Asn	Ser	Thr	Phe	Ile	Ser	Ser	Gly	Gln	Val	Met	Asn	Phe	Lys	Gly
		530				535					540				
Asp	Ile	Ile	Val	Val	Tyr	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Gln	Glu	Gly	Ala	Ala
545					550					555					560
Ala	Ala	Ala	Glu	Pro	Met	Gly	Arg	Pro	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Leu	Ala
				565					570					575	
Arg	Arg	Asp	Ser	Phe	Ala	Gly	Asn	Gly	Pro	Arg	Phe	Pro	Asp	Pro	Cys
			580					585					590		
Gly	Gly	Pro	Glu	Gly	Leu	Arg	Glu	Pro	Glu	Lys	Ala	Ser	Arg	Pro	Val
		595					600					605			
Gln	Glu	Gln	Gly	Gly	Ala	Lys	Ala								
		610				615									

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 7

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácidos
(C) TIPO DE CADENA: no relevante
(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(vii) FUENTE INMEDIATA:

- (B) CLON: péptido FLAG®

15

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 7

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 8

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 232 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADENA: no relevante

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Humano

15

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(B) CLON: muteína de Fc de IgG1

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 8

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 9

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 31 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: no relevante
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: CMV (Líder R2780)

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) OTRA INFORMACIÓN: Met1-Arg28 es el péptido líder real; Arg29 refuerza el sitio de escisión de furina; los nucleótidos que codifican Thr30 y Ser31 añaden un sitio Spe1

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 9

Met	Ala	Arg	Arg	Leu	Trp	Ile	Leu	Ser	Leu	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Thr
1				5				10						15	
Val	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Lys	Ser	Lys	Arg	Arg	Thr	Ser	
			20					25					30		

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 1630 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Mus musculus

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA:

(B) CLON: RANKL

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 3..884

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 10

CC	GGC	GTC	CCA	CAC	GAG	GGT	CCG	CTG	CAC	CCC	GCG	CCT	TCT	GCA	CCG	47
Gly	Val	Pro	His	Glu	Gly	Pro	Leu	His	Pro	Ala	Pro	Ser	Ala	Pro		
1				5					10					15		

GCT CCG GCG CCG CCA CCC GCC GCC TCC CGC TCC ATG TTC CTG GCC CTC	95
Ala Pro Ala Pro Pro Pro Ala Ala Ser Arg Ser Met Phe Leu Ala Leu	
20 25 30	
CTG GGG CTG GGA CTG GGC CAG GTG GTC TGC AGC ATC GCT CTG TTC CTG	143
Leu Gly Leu Gly Leu Gly Gln Val Val Cys Ser Ile Ala Leu Phe Leu	
35 40 45	
TAC TTT CGA GCG CAG ATG GAT CCT AAC AGA ATA TCA GAA GAC AGC ACT	191
Tyr Phe Arg Ala Gln Met Asp Pro Asn Arg Ile Ser Glu Asp Ser Thr	
50 55 60	
CAC TGC TTT TAT AGA ATC CTG AGA CTC CAT GAA AAC GCA GAT TTG CAG	239
His Cys Phe Tyr Arg Ile Leu Arg Leu His Glu Asn Ala Asp Leu Gln	
65 70 75	
GAC TCG ACT CTG GAG AGT GAA GAC ACA CTA CCT GAC TCC TGC AGG AGG	287
Asp Ser Thr Leu Glu Ser Glu Asp Thr Leu Pro Asp Ser Cys Arg Arg	
80 85 90 95	
ATG AAA CAA GCC TTT CAG GGG GCC GTG CAG AAG GAA CTG CAA CAC ATT	335
Met Lys Gln Ala Phe Gln Gly Ala Val Gln Lys Glu Leu Gln His Ile	
100 105 110	
GTG GGG CCA CAG CGC TTC TCA GGA GCT CCA GCT ATG ATG GAA GGC TCA	383
Val Gly Pro Gln Arg Phe Ser Gly Ala Pro Ala Met Met Glu Gly Ser	
115 120 125	
TGG TTG GAT GTG GCC CAG CGA GGC AAG CCT GAG GCC CAG CCA TTT GCA	431
Trp Leu Asp Val Ala Gln Arg Gly Lys Pro Glu Ala Gln Pro Phe Ala	
130 135 140	
CAC CTC ACC ATC AAT GCT GCC AGC ATC CCA TCG GGT TCC CAT AAA GTC	479
His Leu Thr Ile Asn Ala Ala Ser Ile Pro Ser Gly Ser His Lys Val	
145 150 155	
ACT CTG TCC TCT TGG TAC CAC GAT CGA GGC TGG GCC AAG ATC TCT AAC	527
Thr Leu Ser Ser Trp Tyr His Asp Arg Gly Trp Ala Lys Ile Ser Asn	
160 165 170 175	
ATG ACG TTA AGC AAC GGA AAA CTA AGG GTT AAC CAA GAT GGC TTC TAT	575
Met Thr Leu Ser Asn Gly Lys Leu Arg Val Asn Gln Asp Gly Phe Tyr	
180 185 190	
TAC CTG TAC GCC AAC ATT TGC TTT CGG CAT CAT GAA ACA TCG GGA AGC	623
Tyr Leu Tyr Ala Asn Ile Cys Phe Arg His His Glu Thr Ser Gly Ser	
195 200 205	
GTA CCT ACA GAC TAT CTT CAG CTG ATG GTG TAT GTC GTT AAA ACC AGC	671
Val Pro Thr Asp Tyr Leu Gln Leu Met Val Tyr Val Val Lys Thr Ser	
210 215 220	
ATC AAA ATC CCA AGT TCT CAT AAC CTG ATG AAA GGA GGG AGC ACG AAA	719
Ile Lys Ile Pro Ser Ser His Asn Leu Met Lys Gly Gly Ser Thr Lys	
225 230 235	
AAC TGG TCG GGC AAT TCT GAA TTC CAC TTT TAT TCC ATA AAT GTT GGG	767
Asn Trp Ser Gly Asn Ser Glu Phe His Phe Tyr Ser Ile Asn Val Gly	
240 245 250 255	

GGA TTT TTC AAG CTC CGA GCT GGT GAA GAA ATT AGC ATT CAG GTG TCC	815
Gly Phe Phe Lys Leu Arg Ala Gly Glu Glu Ile Ser Ile Gln Val Ser	
260 265 270	
AAC CCT TCC CTG CTG GAT CCG GAT CAA GAT GCG ACG TAC TTT GGG GCT	863
Asn Pro Ser Leu Leu Asp Pro Asp Gln Asp Ala Thr Tyr Phe Gly Ala	
275 280 285	
TTC AAA GTT CAG GAC ATA GAC TGAGACTCAT TTCGTGGAAC ATTAGCATGG	914
Phe Lys Val Gln Asp Ile Asp	
290	
ATGTCCTAGA TGT TTGGAAA CTTCTTAAAA AATGGATGAT GTCTATACAT GTGTAAGACT	974
ACTAAGAGAC ATGGCCACG GTGTATGAAA CTCACAGCCC TCTCTCTTGA GCCTGTACAG	1034
GTTGTGTATA TGTAAGTCC ATAGGTGATG TTAGATTTCAT GGTGATTACA CAACGGTTTT	1094
ACAATTTTGT AATGATTTCC TAGAATTGAA CCAGATTGGG AGAGGTATTC CGATGCCTTAT	1154
GAAAAACTTA CACGTGAGCT ATGGAAGGGG GTCACAGTCT CTGGGTCTAA CCCCTGGACA	1214
TGTGCCACTG AGAACCTTGA AATTAAGAGG ATGCCATGTC ATTGCAAAGA AATGATAGTG	1274
TGAAGGGTTA AGTTCTTTTG AATTGTTACA TTGCGCTGGG ACCTGCAAAT AAGTTCTTTT	1334
TTTCTAATGA GGAGAGAAAA ATATATGTAT TTTTATATAA TGTCTAAAGT TATATTTTCAG	1394
GTCTAATGTT TTCTGTGCAA AGTTTTGTAA ATTATATTTG TGCTATAGTA TTTGATTCAA	1454
AATATTTAAA AATGTCTCAC TGTGACATA TTTAATGTTT TAAATGTACA GATGTATTTA	1514
ACTGGTGACAC TTTGTAATTC CCCTGAAGGT ACTCGTAGCT AAGGGGGCAG AATACTGTTT	1574
CTGGTGACCA CATGTAGTTT ATTTCTTTAT TCTTTTAAAC TTAATAGAGT CTTCAG	1630

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 11

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 294 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 11

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 12

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 954 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICA: NO

10

(iv) ANTISENTIDO: NO

(vi) FUENTE ORIGINAL:

(A) ORGANISMO: Homo sapiens

15

(vii) FUENTE INMEDIATA:

(A) BIBLIOTECA:

(B) CLON: huRANKL (longitud completa)

20

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) LOCALIZACIÓN: 1..951

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 12

ATG	CGC	CGC	GCC	AGC	AGA	GAC	TAC	ACC	AAG	TAC	CTG	CGT	GGC	TCG	GAG	48
Met	Arg	Arg	Ala	Ser	Arg	Asp	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Leu	Arg	Gly	Ser	Glu	
1				5					10					15		
GAG	ATG	GGC	GGC	GGC	CCC	GGA	GCC	CCG	CAC	GAG	GGC	CCC	CTG	CAC	GCC	96
Glu	Met	Gly	Gly	Gly	Pro	Gly	Ala	Pro	His	Glu	Gly	Pro	Leu	His	Ala	
			20					25					30			
CCG	CCG	CCG	CCT	GCG	CCG	CAC	CAG	CCC	CCC	GCC	GCC	TCC	CGC	TCC	ATG	144
Pro	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro	His	Gln	Pro	Pro	Ala	Ala	Ser	Arg	Ser	Met	
			35				40					45				
TTC	GTG	GCC	CTC	CTG	GGG	CTG	GGG	CTG	GGC	CAG	GTT	GTC	TGC	AGC	GTC	192
Phe	Val	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Cys	Ser	Val	
	50					55					60					
GCC	CTG	TTC	TTC	TAT	TTC	AGA	GCG	CAG	ATG	GAT	CCT	AAT	AGA	ATA	TCA	240
Ala	Leu	Phe	Phe	Tyr	Phe	Arg	Ala	Gln	Met	Asp	Pro	Asn	Arg	Ile	Ser	
65					70					75					80	
GAA	GAT	GGC	ACT	CAC	TGC	ATT	TAT	AGA	ATT	TTG	AGA	CTC	CAT	GAA	AAT	288
Glu	Asp	Gly	Thr	His	Cys	Ile	Tyr	Arg	Ile	Leu	Arg	Leu	His	Glu	Asn	
				85					90					95		
GCA	GAT	TTT	CAA	GAC	ACA	ACT	CTG	GAG	AGT	CAA	GAT	ACA	AAA	TTA	ATA	336
Ala	Asp	Phe	Gln	Asp	Thr	Thr	Leu	Glu	Ser	Gln	Asp	Thr	Lys	Leu	Ile	
			100					105					110			
CCT	GAT	TCA	TGT	AGG	AGA	ATT	AAA	CAG	GCC	TTT	CAA	GGA	GCT	GTG	CAA	384
Pro	Asp	Ser	Cys	Arg	Arg	Ile	Lys	Gln	Ala	Phe	Gln	Gly	Ala	Val	Gln	
			115				120					125				
AAG	GAA	TTA	CAA	CAT	ATC	GTT	GGA	TCA	CAG	CAC	ATC	AGA	GCA	GAG	AAA	432
Lys	Glu	Leu	Gln	His	Ile	Val	Gly	Ser	Gln	His	Ile	Arg	Ala	Glu	Lys	
	130					135					140					
GCG	ATG	GTG	GAT	GGC	TCA	TGG	TTA	GAT	CTG	GCC	AAG	AGG	AGC	AAG	CTT	480
Ala	Met	Val	Asp	Gly	Ser	Trp	Leu	Asp	Leu	Ala	Lys	Arg	Ser	Lys	Leu	
145					150					155					160	
GAA	GCT	CAG	CCT	TTT	GCT	CAT	CTC	ACT	ATT	AAT	GCC	ACC	GAC	ATC	CCA	528
Glu	Ala	Gln	Pro	Phe	Ala	His	Leu	Thr	Ile	Asn	Ala	Thr	Asp	Ile	Pro	
				165					170					175		
TCT	GGT	TCC	CAT	AAA	GTG	AGT	CTG	TCC	TCT	TGG	TAC	CAT	GAT	CGG	GGT	576
Ser	Gly	Ser	His	Lys	Val	Ser	Leu	Ser	Ser	Trp	Tyr	His	Asp	Arg	Gly	
			180					185					190			

TGG	GCC	AAG	ATC	TCC	AAC	ATG	ACT	TTT	AGC	AAT	GGA	AAA	CTA	ATA	GTT	624
Trp	Ala	Lys	Ile	Ser	Asn	Met	Thr	Phe	Ser	Asn	Gly	Lys	Leu	Ile	Val	
		195					200					205				
AAT	CAG	GAT	GGC	TTT	TAT	TAC	CTG	TAT	GCC	AAC	ATT	TGC	TTT	CGA	CAT	672
Asn	Gln	Asp	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Leu	Tyr	Ala	Asn	Ile	Cys	Phe	Arg	His	
	210					215					220					
CAT	GAA	ACT	TCA	GGA	GAC	CTA	GCT	ACA	GAG	TAT	CTT	CAA	CTA	ATG	GTG	720
His	Glu	Thr	Ser	Gly	Asp	Leu	Ala	Thr	Glu	Tyr	Leu	Gln	Leu	Met	Val	
225					230					235					240	
TAC	GTC	ACT	AAA	ACC	AGC	ATC	AAA	ATC	CCA	AGT	TCT	CAT	ACC	CTG	ATG	768
Tyr	Val	Thr	Lys	Thr	Ser	Ile	Lys	Ile	Pro	Ser	Ser	His	Thr	Leu	Met	
				245					250					255		
AAA	GGA	GGA	AGC	ACC	AAG	TAT	TGG	TCA	GGG	AAT	TCT	GAA	TTC	CAT	TTT	816
Lys	Gly	Gly	Ser	Thr	Lys	Tyr	Trp	Ser	Gly	Asn	Ser	Glu	Phe	His	Phe	
			260					265					270			
TAT	TCC	ATA	AAC	GTT	GGT	GGA	TTT	TTT	AAG	TTA	CGG	TCT	GGA	GAG	GAA	864
Tyr	Ser	Ile	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Phe	Lys	Leu	Arg	Ser	Gly	Glu	Glu	
		275					280					285				
ATC	AGC	ATC	GAG	GTC	TCC	AAC	CCC	TCC	TTA	CTG	GAT	CCG	GAT	CAG	GAT	912
Ile	Ser	Ile	Glu	Val	Ser	Asn	Pro	Ser	Leu	Leu	Asp	Pro	Asp	Gln	Asp	
	290					295					300					
GCA	ACA	TAC	TTT	GGG	GCT	TTT	AAA	GTT	CGA	GAT	ATA	GAT	TGA			954
Ala	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ala	Phe	Lys	Val	Arg	Asp	Ile	Asp				
305					310					315						

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 13

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 317 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID N°: 13

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

- 5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1878 pares de bases
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - (C) TIPO DE CADENA: sencilla
 - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICA: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- 15 (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (A) ORGANISMO: Murino
- (vii) FUENTE INMEDIATA:
- (A) BIBLIOTECA: Epitelio de Hígado Fetal Murino
 - (B) CLON: muRANK
- 20 (ix) CARACTERÍSTICAS:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
 - (B) LOCALIZACIÓN: 1..1875
- 25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 14

ATG	GCC	CCG	CGC	GCC	CGG	CGG	CGC	CGC	CAG	CTG	CCC	GCG	CCG	CTG	CTG	48
Met	Ala	Pro	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Gln	Leu	Pro	Ala	Pro	Leu	Leu	
1				5					10					15		
GCG	CTC	TGC	GTG	CTG	CTC	GTT	CCA	CTG	CAG	GTG	ACT	CTC	CAG	GTC	ACT	96
Ala	Leu	Cys	Val	Leu	Leu	Val	Pro	Leu	Gln	Val	Thr	Leu	Gln	Val	Thr	
			20					25					30			
CCT	CCA	TGC	ACC	CAG	GAG	AGG	CAT	TAT	GAG	CAT	CTC	GGA	CGG	TGT	TGC	144
Pro	Pro	Cys	Thr	Gln	Glu	Arg	His	Tyr	Glu	His	Leu	Gly	Arg	Cys	Cys	
		35					40					45				
AGC	AGA	TGC	GAA	CCA	GGA	AAG	TAC	CTG	TCC	TCT	AAG	TGC	ACT	CCT	ACC	192
Ser	Arg	Cys	Glu	Pro	Gly	Lys	Tyr	Leu	Ser	Ser	Lys	Cys	Thr	Pro	Thr	
	50					55					60					
TCC	GAC	AGT	GTG	TGT	CTG	CCC	TGT	GGC	CCC	GAT	GAG	TAC	TTG	GAC	ACC	240
Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Leu	Pro	Cys	Gly	Pro	Asp	Glu	Tyr	Leu	Asp	Thr	
65					70					75					80	
TGG	AAT	GAA	GAA	GAT	AAA	TGC	TTG	CTG	CAT	AAA	GTC	TGT	GAT	GCA	GGC	288
Trp	Asn	Glu	Glu	Asp	Lys	Cys	Leu	Leu	His	Lys	Val	Cys	Asp	Ala	Gly	
				85					90					95		
AAG	GCC	CTG	GTG	GCG	GTG	GAT	CCT	GGC	AAC	CAC	ACG	GCC	CCG	CGT	CGC	336
Lys	Ala	Leu	Val	Ala	Val	Asp	Pro	Gly	Asn	His	Thr	Ala	Pro	Arg	Arg	
			100					105					110			
TGT	GCT	TGC	ACG	GCT	GGC	TAC	CAC	TGG	AAC	TCA	GAC	TGC	GAG	TGC	TGC	384
Cys	Ala	Cys	Thr	Ala	Gly	Tyr	His	Trp	Asn	Ser	Asp	Cys	Glu	Cys	Cys	
			115				120					125				
CGC	AGG	AAC	ACG	GAG	TGT	GCA	CCT	GGC	TTC	GGA	GCT	CAG	CAT	CCC	TTG	432
Arg	Arg	Asn	Thr	Glu	Cys	Ala	Pro	Gly	Phe	Gly	Ala	Gln	His	Pro	Leu	
	130					135					140					
CAG	CTC	AAC	AAG	GAT	ACG	GTG	TGC	ACA	CCC	TGC	CTC	CTG	GGC	TTC	TTC	480
Gln	Leu	Asn	Lys	Asp	Thr	Val	Cys	Thr	Pro	Cys	Leu	Leu	Gly	Phe	Phe	
145					150					155					160	
TCA	GAT	GTC	TTT	TCG	TCC	ACA	GAC	AAA	TGC	AAA	CCT	TGG	ACC	AAC	TGC	528
Ser	Asp	Val	Phe	Ser	Ser	Thr	Asp	Lys	Cys	Lys	Pro	Trp	Thr	Asn	Cys	
				165					170					175		
ACC	CTC	CTT	GGA	AAG	CTA	GAA	GCA	CAC	CAG	GGG	ACA	ACG	GAA	TCA	GAT	576
Thr	Leu	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Ala	His	Gln	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Asp	
			180					185						190		

GTG	GTC	TGC	AGC	TCT	TCC	ATG	ACA	CTG	AGG	AGA	CCA	CCC	AAG	GAG	GCC	624
Val	Val	Cys	Ser	Ser	Ser	Met	Thr	Leu	Arg	Arg	Pro	Pro	Lys	Glu	Ala	
		195					200					205				
CAG	GCT	TAC	CTG	CCC	AGT	CTC	ATC	GTT	CTG	CTC	CTC	TTC	ATC	TCT	GTG	672
Gln	Ala	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Val	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Ser	Val	
	210					215					220					
GTA	GTA	GTG	GCT	GCC	ATC	ATC	TTC	GGC	GTT	TAC	TAC	AGG	AAG	GGA	GGG	720
Val	Val	Val	Ala	Ala	Ile	Ile	Phe	Gly	Val	Tyr	Tyr	Arg	Lys	Gly	Gly	
225					230					235					240	
AAA	GCG	CTG	ACA	GCT	AAT	TTG	TGG	AAT	TGG	GTC	AAT	GAT	GCT	TGC	AGT	768
Lys	Ala	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Trp	Asn	Trp	Val	Asn	Asp	Ala	Cys	Ser	
				245					250					255		
AGT	CTA	AGT	GGA	AAT	AAG	GAG	TCC	TCA	GGG	GAC	CGT	TGT	GCT	GGT	TCC	816
Ser	Leu	Ser	Gly	Asn	Lys	Glu	Ser	Ser	Gly	Asp	Arg	Cys	Ala	Gly	Ser	
			260						265					270		
CAC	TCG	GCA	ACC	TCC	AGT	CAG	CAA	GAA	GTG	TGT	GAA	GGT	ATC	TTA	CTA	864
His	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Gln	Gln	Glu	Val	Cys	Glu	Gly	Ile	Leu	Leu	
		275					280						285			
ATG	ACT	CGG	GAG	GAG	AAG	ATG	GTT	CCA	GAA	GAC	GGT	GCT	GGA	GTC	TGT	912
Met	Thr	Arg	Glu	Glu	Lys	Met	Val	Pro	Glu	Asp	Gly	Ala	Gly	Val	Cys	
	290					295					300					
GGG	CCT	GTG	TGT	GCG	GCA	GGT	GGG	CCC	TGG	GCA	GAA	GTC	AGA	GAT	TCT	960
Gly	Pro	Val	Cys	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Trp	Ala	Glu	Val	Arg	Asp	Ser	
305					310					315					320	
AGG	ACG	TTC	ACA	CTG	GTC	AGC	GAG	GTT	GAG	ACG	CAA	GGA	GAC	CTC	TCG	1008
Arg	Thr	Phe	Thr	Leu	Val	Ser	Glu	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Asp	Leu	Ser	
				325					330					335		
AGG	AAG	ATT	CCC	ACA	GAG	GAT	GAG	TAC	ACG	GAC	CGG	CCC	TCG	CAG	CCT	1056
Arg	Lys	Ile	Pro	Thr	Glu	Asp	Glu	Tyr	Thr	Asp	Arg	Pro	Ser	Gln	Pro	
			340					345					350			
TCG	ACT	GGT	TCA	CTG	CTC	CTA	ATC	CAG	CAG	GGA	AGC	AAA	TCT	ATA	CCC	1104
Ser	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Gln	Gly	Ser	Lys	Ser	Ile	Pro	
		355					360					365				
CCA	TTC	CAG	GAG	CCC	CTG	GAA	GTG	GGG	GAG	AAC	GAC	AGT	TTA	AGC	CAG	1152
Pro	Phe	Gln	Glu	Pro	Leu	Glu	Val	Gly	Glu	Asn	Asp	Ser	Leu	Ser	Gln	
	370					375					380					
TGT	TTC	ACC	GGG	ACT	GAA	AGC	ACG	GTG	GAT	TCT	GAG	GGC	TGT	GAC	TTC	1200
Cys	Phe	Thr	Gly	Thr	Glu	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Glu	Gly	Cys	Asp	Phe	
385					390					395					400	
ACT	GAG	CCT	CCG	AGC	AGA	ACT	GAC	TCT	ATG	CCC	GTG	TCC	CCT	GAA	AAG	1248
Thr	Glu	Pro	Pro	Ser	Arg	Thr	Asp	Ser	Met	Pro	Val	Ser	Pro	Glu	Lys	
				405					410					415		
CAC	CTG	ACA	AAA	GAA	ATA	GAA	GGT	GAC	AGT	TGC	CTC	CCC	TGG	GTG	GTC	1296
His	Leu	Thr	Lys	Glu	Ile	Glu	Gly	Asp	Ser	Cys	Leu	Pro	Trp	Val	Val	
			420					425					430			

AGC TCC AAC TCA ACA GAT GGC TAC ACA GGC AGT GGG AAC ACT CCT GGG	1344
Ser Ser Asn Ser Thr Asp Gly Tyr Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Gly	
435 440 445	
GAG GAC CAT GAA CCC TTT CCA GGG TCC CTG AAA TGT GGA CCA TTG CCC	1392
Glu Asp His Glu Pro Phe Pro Gly Ser Leu Lys Cys Gly Pro Leu Pro	
450 455 460	
CAG TGT GCC TAC AGC ATG GGC TTT CCC AGT GAA GCA GCA GCC AGC ATG	1440
Gln Cys Ala Tyr Ser Met Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ala Ala Ser Met	
465 470 475 480	
GCA GAG GCG GGA GTA CGG CCC CAG GAC AGG GCT GAT GAG AGG GGA GCC	1488
Ala Glu Ala Gly Val Arg Pro Gln Asp Arg Ala Asp Glu Arg Gly Ala	
485 490 495	
TCA GGG TCC GGG AGC TCC CCC AGT GAC CAG CCA CCT GCC TCT GGG AAC	1536
Ser Gly Ser Gly Ser Ser Pro Ser Asp Gln Pro Pro Ala Ser Gly Asn	
500 505 510	
GTG ACT GGA AAC AGT AAC TCC ACG TTC ATC TCT AGC GGG CAG GTG ATG	1584
Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met	
515 520 525	
AAC TTC AAG GGT GAC ATC ATC GTG GTG TAT GTC AGC CAG ACC TCG CAG	1632
Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln	
530 535 540	
GAG GGC CCG GGT TCC GCA GAG CCC GAG TCG GAG CCC GTG GGC CGC CCT	1680
Glu Gly Pro Gly Ser Ala Glu Pro Glu Ser Glu Pro Val Gly Arg Pro	
545 550 555 560	
GTG CAG GAG GAG ACG CTG GCA CAC AGA GAC TCC TTT GCG GGC ACC GCG	1728
Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala His Arg Asp Ser Phe Ala Gly Thr Ala	
565 570 575	
CCG CGC TTC CCC GAC GTC TGT GCC ACC GGG GCT GGG CTG CAG GAG CAG	1776
Pro Arg Phe Pro Asp Val Cys Ala Thr Gly Ala Gly Leu Gln Glu Gln	
580 585 590	
GGG GCA CCC CGG CAG AAG GAC GGG ACA TCG CGG CCG GTG CAG GAG CAG	1824
Gly Ala Pro Arg Gln Lys Asp Gly Thr Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln	
595 600 605	
GGT GGG GCG CAG ACT TCA CTC CAT ACC CAG GGG TCC GGA CAA TGT GCA	1872
Gly Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Thr Gln Gly Ser Gly Gln Cys Ala	
610 615 620	
GAA TGA	1878
Glu	
625	

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID N°: 15

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 625 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 15

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

Gly Pro Val Cys Ala Ala Gly Gly Pro Trp Ala Glu Val Arg Asp Ser
 305 310 315 320
 Arg Thr Phe Thr Leu Val Ser Glu Val Glu Thr Gln Gly Asp Leu Ser
 325 330 335
 Arg Lys Ile Pro Thr Glu Asp Glu Tyr Thr Asp Arg Pro Ser Gln Pro
 340 345 350
 Ser Thr Gly Ser Leu Leu Leu Ile Gln Gln Gly Ser Lys Ser Ile Pro
 355 360 365
 Pro Phe Gln Glu Pro Leu Glu Val Gly Glu Asn Asp Ser Leu Ser Gln
 370 375 380
 Cys Phe Thr Gly Thr Glu Ser Thr Val Asp Ser Glu Gly Cys Asp Phe
 385 390 395 400
 Thr Glu Pro Pro Ser Arg Thr Asp Ser Met Pro Val Ser Pro Glu Lys
 405 410 415
 His Leu Thr Lys Glu Ile Glu Gly Asp Ser Cys Leu Pro Trp Val Val
 420 425 430
 Ser Ser Asn Ser Thr Asp Gly Tyr Thr Gly Ser Gly Asn Thr Pro Gly
 435 440 445
 Glu Asp His Glu Pro Phe Pro Gly Ser Leu Lys Cys Gly Pro Leu Pro
 450 455 460
 Gln Cys Ala Tyr Ser Met Gly Phe Pro Ser Glu Ala Ala Ala Ser Met
 465 470 475 480
 Ala Glu Ala Gly Val Arg Pro Gln Asp Arg Ala Asp Glu Arg Gly Ala
 485 490 495
 Ser Gly Ser Gly Ser Ser Pro Ser Asp Gln Pro Pro Ala Ser Gly Asn
 500 505 510
 Val Thr Gly Asn Ser Asn Ser Thr Phe Ile Ser Ser Gly Gln Val Met
 515 520 525
 Asn Phe Lys Gly Asp Ile Ile Val Val Tyr Val Ser Gln Thr Ser Gln
 530 535 540
 Glu Gly Pro Gly Ser Ala Glu Pro Glu Ser Glu Pro Val Gly Arg Pro
 545 550 555 560
 Val Gln Glu Glu Thr Leu Ala His Arg Asp Ser Phe Ala Gly Thr Ala
 565 570 575
 Pro Arg Phe Pro Asp Val Cys Ala Thr Gly Ala Gly Leu Gln Glu Gln
 580 585 590
 Gly Ala Pro Arg Gln Lys Asp Gly Thr Ser Arg Pro Val Gln Glu Gln
 595 600 605
 Gly Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Thr Gln Gly Ser Gly Gln Cys Ala Glu
 610 615 620 625

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 16

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Gly
 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 17

Asp Tyr Lys Asp Glu
 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 18

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 18

His His His His His His
5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº: 19

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácidos

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID Nº: 19:

Arg Met Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile
1 5 10 15

Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu
20 25 30

Arg

15

REIVINDICACIONES

1. ADN aislado seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) un ADN que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos como la expuesta en SEC ID N°: 6, donde la proteína tiene un extremo amino seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido entre el aminoácido 1 y el aminoácido 33, inclusive, de SEC ID N°: 6, y un extremo carboxi seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido entre el aminoácido 196 y el aminoácido 616, inclusive;
 - (b) moléculas de ADN capaces de hibridar con el ADN de (a) en condiciones rigurosas, que incluyen 63°C, 6X SSC, durante toda la noche; lavado en 3X SSC a 55°C, y que codifican un receptor activador biológicamente activo de NF-κB; y
 - (c) moléculas de ADN que codifican fragmentos de proteínas codificadas por el ADN de (a) o (b), donde los fragmentos son biológicamente activos y la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en: unión a TRAF 1, 2, 3, 5 ó 6, unión específica a un receptor soluble activador del ligando de NF-κB o a un receptor activador de un ligando de NF-κB expresado en células o inmovilizado en una superficie, y unión a un receptor activador de anticuerpos específicos para NF-κB.
2. ADN aislado de la reivindicación 1, que codifica un receptor activador del polipéptido NF-κB que es al menos un 80% idéntico en la secuencia de aminoácidos a un polipéptido de SEC ID N°: 6 y que tiene una actividad mostrada por dicho polipéptido.
3. ADN aislado de la reivindicación 1 ó 2, en el que la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en: unión a TRAF 1, 2, 3, 5 ó 6, unión específica a un receptor soluble activador de un ligando de NF-κB o a un receptor activador de un ligando de NF-κB expresado en células o inmovilizado en una superficie, y unión a un receptor activador de anticuerpos específicos para NF-κB.
4. ADN aislado de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que codifica un receptor soluble activador de un polipéptido NF-κB.
5. ADN aislado de la reivindicación 4, que comprende además un ADN que codifica un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un dominio Fc de inmunoglobulina, una muteína de Fc de inmunoglobulina, un marcador FLAG™, un péptido que comprende al menos aproximadamente 6 residuos de His, una cremallera de leucinas y combinaciones de los mismos.
6. Vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 6.
8. Procedimiento para preparar un receptor activador de la proteína NF-κB, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 7 en condiciones que promueven la expresión y recuperación del receptor activo activador de NF-κB.
9. Fragmento de ADN aislado seleccionado del grupo que consiste en oligonucleótidos de al menos aproximadamente 17 nucleótidos de longitud, oligonucleótidos de al menos aproximadamente 25 nucleótidos de longitud y oligonucleótidos de al menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, donde el fragmento es un fragmento de los residuos nucleotídicos 39-1886 de SEC ID N°: 5.
10. Receptor activador del polipéptido NF-κB aislado seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 33 a 196 de SEC ID N°: 6;
 - (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 1 a 213 de SEC ID N°: 6;
 - (c) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos 234 a 616 de SEC ID N°: 6;
 - (d) un receptor activador de polipéptido NF-κB codificado por un ADN capaz de hibridar con un ADN que codifica la proteína de (a) a (c) en condiciones rigurosas (63°C, 6X SSC, durante toda la noche; lavado en 3X SSC a 55°C) y que es biológicamente activo;
 - (e) fragmentos de los polipéptidos de (a) a (d) que son biológicamente activos y la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en: inducción de la actividad de NF-κB, unión a TRAF 1, 2, 3, 5 ó 6, unión específica a un receptor soluble activador de un ligando de NF-κB o a un receptor activador de un ligando de NF-κB expresado en

células o inmovilizado como una superficie y unión a un receptor activador de anticuerpos específicos de NF- κ B.

11. Receptor activador del polipéptido NF- κ B aislado de la reivindicación 10, en el que la actividad biológica se selecciona del grupo que consiste en: inducción de la actividad de NF- κ B, unión a TRAF 1, 2, 3, 5 ó 6, unión específica a un receptor soluble activador de un ligando de NF- κ B o a un receptor activador de un ligando de NF- κ B expresado en células o inmovilizado como una superficie y unión a un receptor activador de anticuerpos específicos de NF- κ B.
12. Proteína de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que tiene una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos aproximadamente un 70%, una identidad de al menos aproximadamente un 80% o una identidad de al menos aproximadamente un 90% con SEC ID N°: 6.
13. Proteína de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que es un receptor soluble activador de NF- κ B.
14. Receptor soluble activador de la proteína NF- κ B de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además un péptido seleccionado del grupo que consiste en un dominio Fc de inmunoglobulina, una muteína de Fc de inmunoglobulina, un marcador FLAG™, un péptido que comprende al menos aproximadamente 6 residuos de His, una cremallera de leucinas y combinaciones de los mismos.
15. Receptor soluble activador de la proteína NF- κ B de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende la parte Fc de la IgG₁ humana que consiste en los aminoácidos 3 a 232 de SEC ID N°: 8.
16. Anticuerpo inmunorreactivo con un receptor activador del polipéptido NF- κ B de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13.
17. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 16, que es un anticuerpo monoclonal.
18. Anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 16 o la reivindicación 17, donde dicho anticuerpo se une a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 6.
19. Composición que comprende un receptor purificado activador de NF- κ B codificado por un ADN de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un portador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable.
20. Composición que comprende un anticuerpo antagonista de acuerdo con la reivindicación 16, reivindicación 17 o reivindicación 18 y un portador, excipiente o diluyente fisiológicamente aceptable.
21. Receptor activador del polipéptido NF- κ B según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-15, o codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o una composición según se define en la reivindicación 18 o la reivindicación 19, para su uso en medicina.
22. Receptor soluble activador del polipéptido NF- κ B según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-15, o codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la inhibición de la activación de NF- κ B.
23. Receptor soluble activador del polipéptido NF- κ B según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-15, o codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento de una afección en la que la señalización a través de un receptor activador de NF- κ B ha dado lugar a consecuencias negativas, tales como choque tóxico o séptico o un rechazo de un injerto contra hospedador.
24. Receptor soluble activador del polipéptido NF- κ B según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-15, o codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en el tratamiento de una enfermedad **caracterizada por** células neoplásicas que expresan un receptor activador de NF- κ B.
25. Receptor soluble activador del polipéptido NF- κ B según se define en cualquiera de las reivindicaciones 10-15, o codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, para su uso en la regulación de una respuesta inmune o inflamatoria.
26. Uso de un receptor soluble activador de NF- κ B de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, o codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o de un receptor activador de anticuerpos monoclonales antagonistas de NF- κ B en la preparación de un medicamento para inhibir la activación de NF- κ B.
27. Uso de un receptor soluble activador de NF- κ B de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, o codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o de un receptor activador de anticuerpos monoclonales antagonistas de NF- κ B en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección en la que la señalización a través del receptor activador de NF- κ B ha dado lugar a consecuencias negativas, tales como choque tóxico o séptico o rechazo de injerto contra hospedador.

28. Uso de un receptor soluble activador de NF- κ B de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, o codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o de un receptor activador de anticuerpos monoclonales antagonistas de NF- κ B en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad caracterizada por células neoplásicas que expresan el receptor activador de NF- κ B.
- 5 29. Uso de un receptor soluble activador de NF- κ B de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, o codificado por un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o de un receptor activador de anticuerpos monoclonales antagonistas de NF- κ B en la preparación de un medicamento para interferir en el papel de NF- κ B en la transformación celular.
- 10 30. Uso de un receptor soluble activador de una composición polipeptídica de NF- κ B, donde el receptor activador de NF- κ B está codificado por un ADN según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o de un receptor activador de anticuerpos monoclonales antagonistas de NF- κ B, en la preparación de un medicamento para regular una respuesta inmune o inflamatoria.
31. Uso de un receptor soluble activador del polipéptido NF- κ B de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para cribar un inhibidor de un receptor activador de actividad de NF- κ B inducida por NF- κ B.
- 15 32. Uso de una forma soluble de un receptor activador del polipéptido NF- κ B, codificado por un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, derivado del dominio extracelular, en un ensayo de cribado para detectar moléculas capaces de unirse a un receptor activador de NF- κ B.
- 20 33. Uso de un receptor activador del polipéptido NF- κ B, codificado por un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, derivado del dominio citoplásmico, en un ensayo para detectar la inhibición de la interacción del receptor activador de NF- κ B y otras proteínas intracelulares implicadas en la transducción de señales.
34. Uso de acuerdo con la reivindicación 33, en el que el ensayo sirve para detectar la inhibición de la asociación del receptor activador de NF- κ B y TRAF 1, 2, 3, 5 ó 6.
- 25 35. Uso de un receptor activador de la secuencia polipeptídica de NF- κ B, codificado por un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el diseño basado en la estructura de un receptor activador de un inhibidor de NF- κ B.
- 30 36. Uso de un receptor activador del polipéptido NF- κ B, codificado por un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para averiguar la capacidad de moléculas de antagonizar o agonizar el receptor activador de NF- κ B.
37. Uso de un receptor activador del polipéptido NF- κ B, codificado por un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el desarrollo de anticuerpos agonistas o antagonistas del receptor activador de NF- κ B.
38. Uso de un receptor activador del polipéptido NF- κ B, codificado por un ADN de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en un cribado de antagonistas del receptor activador de la actividad de NF- κ B.
- 35 39. Kit para detectar un receptor soluble activador del polipéptido NF- κ B o para detectar un receptor soluble activador de un ligando de NF- κ B o para el seguimiento de un receptor activador de la actividad mediada por NF- κ B en muestras de pacientes, comprendiendo dicho kit un receptor soluble activador de NF- κ B de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, donde dicha detección o seguimiento emplea un ensayo seleccionado del grupo que consiste en ELISA, ensayo de transferencia puntual, ensayo de unión en fase sólida (tales como los que usan un biosensor), un ensayo de formato rápido y un bioensayo.

1/6

Día 6, recuperación de células T viables ($\times 10^{-3}/\text{ml}$)

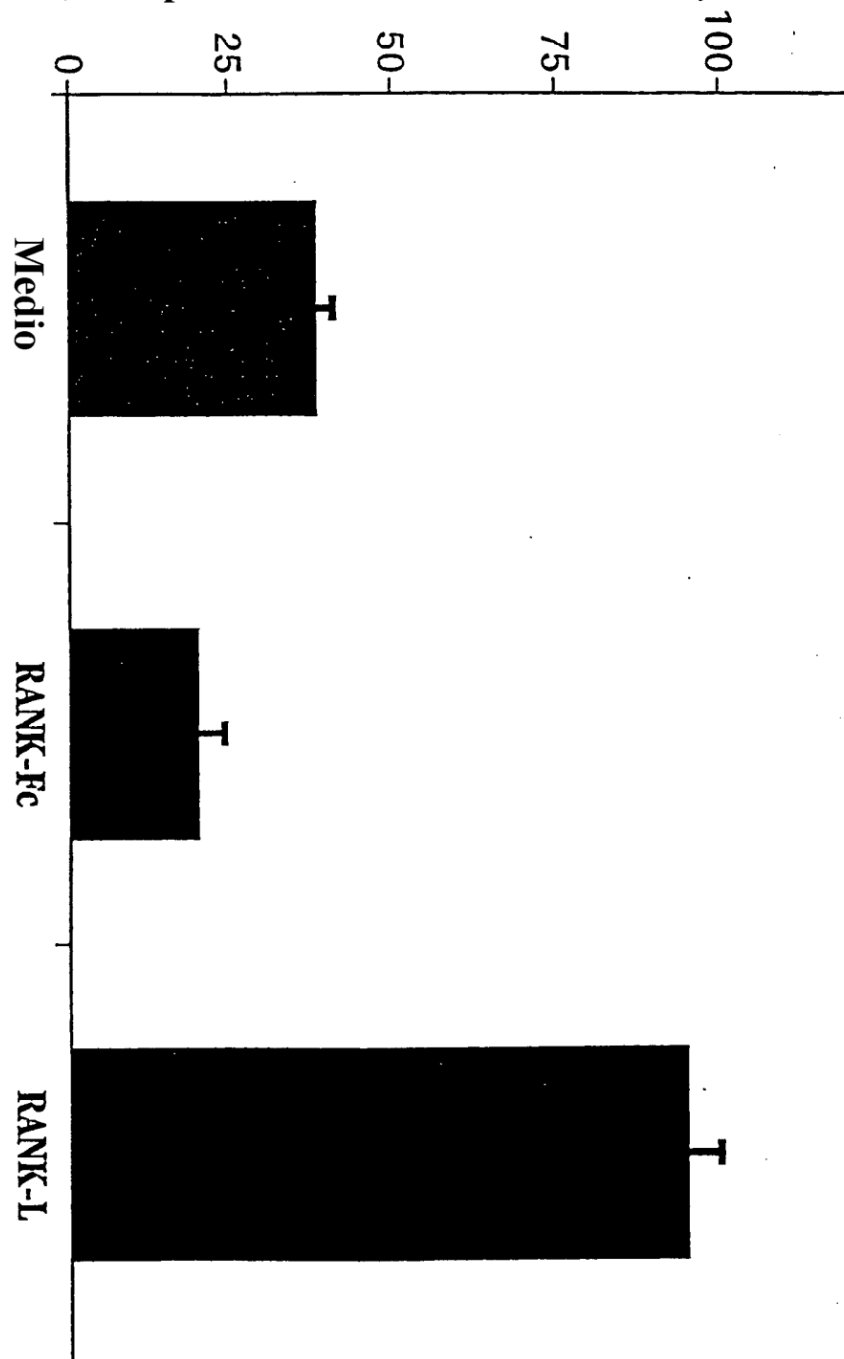


Figura 1

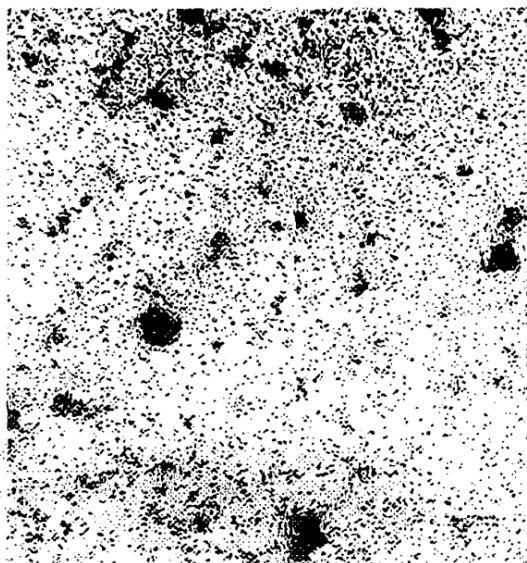


Fig. 2A

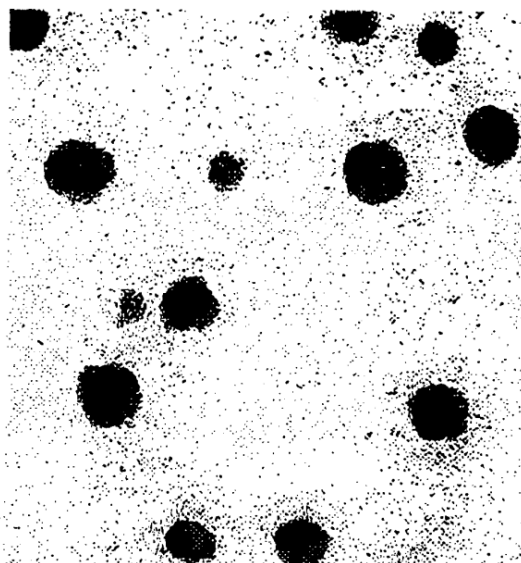


Fig. 2B

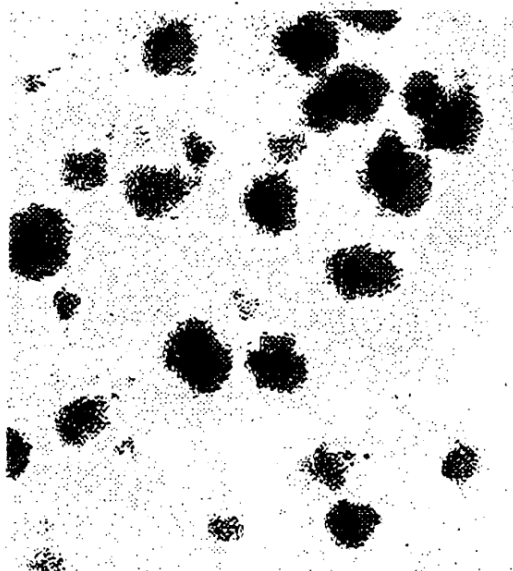


Fig. 2C

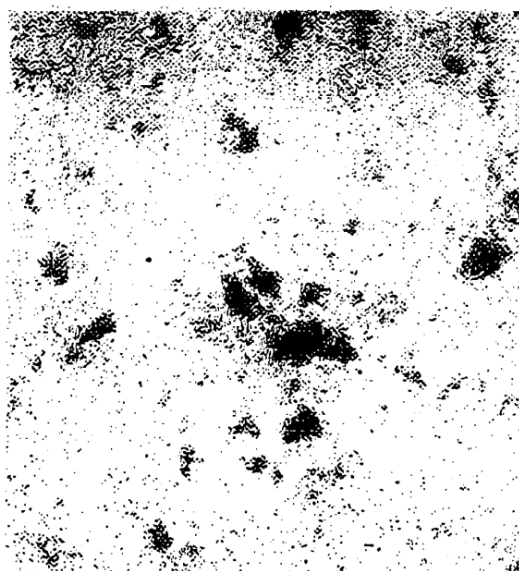


Fig. 2D

2/6

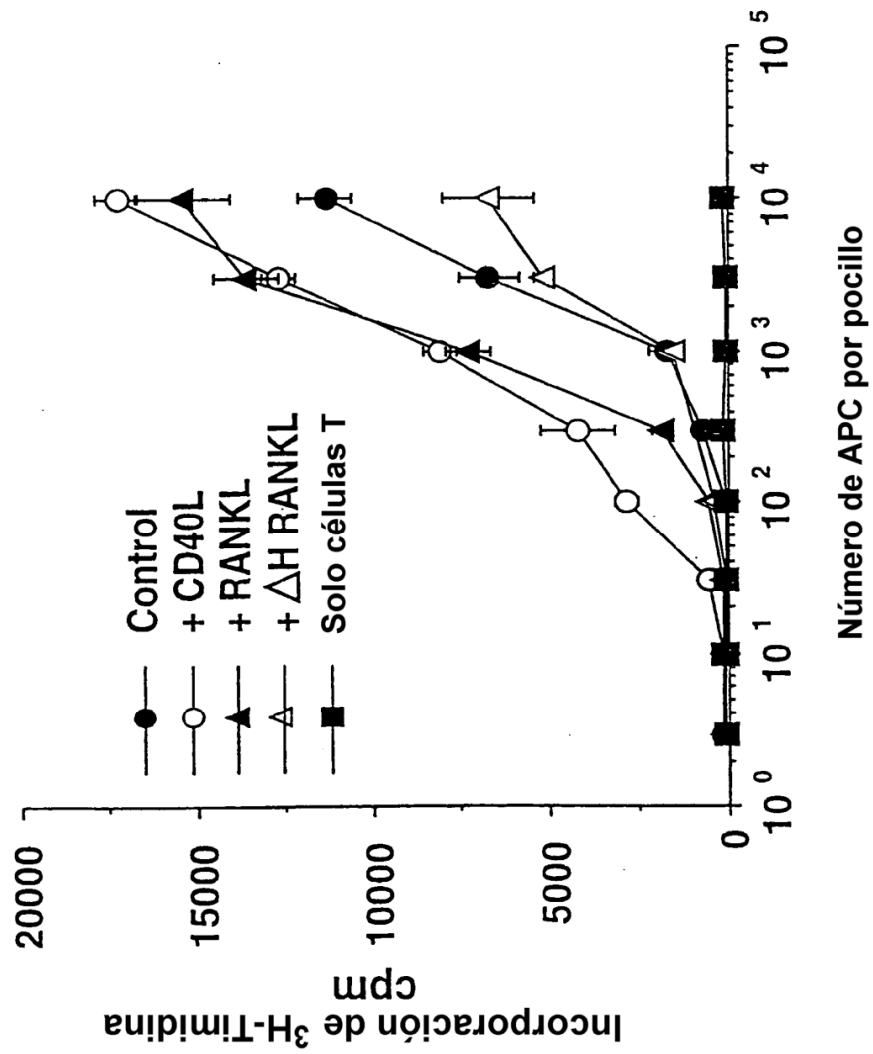


Figura 3

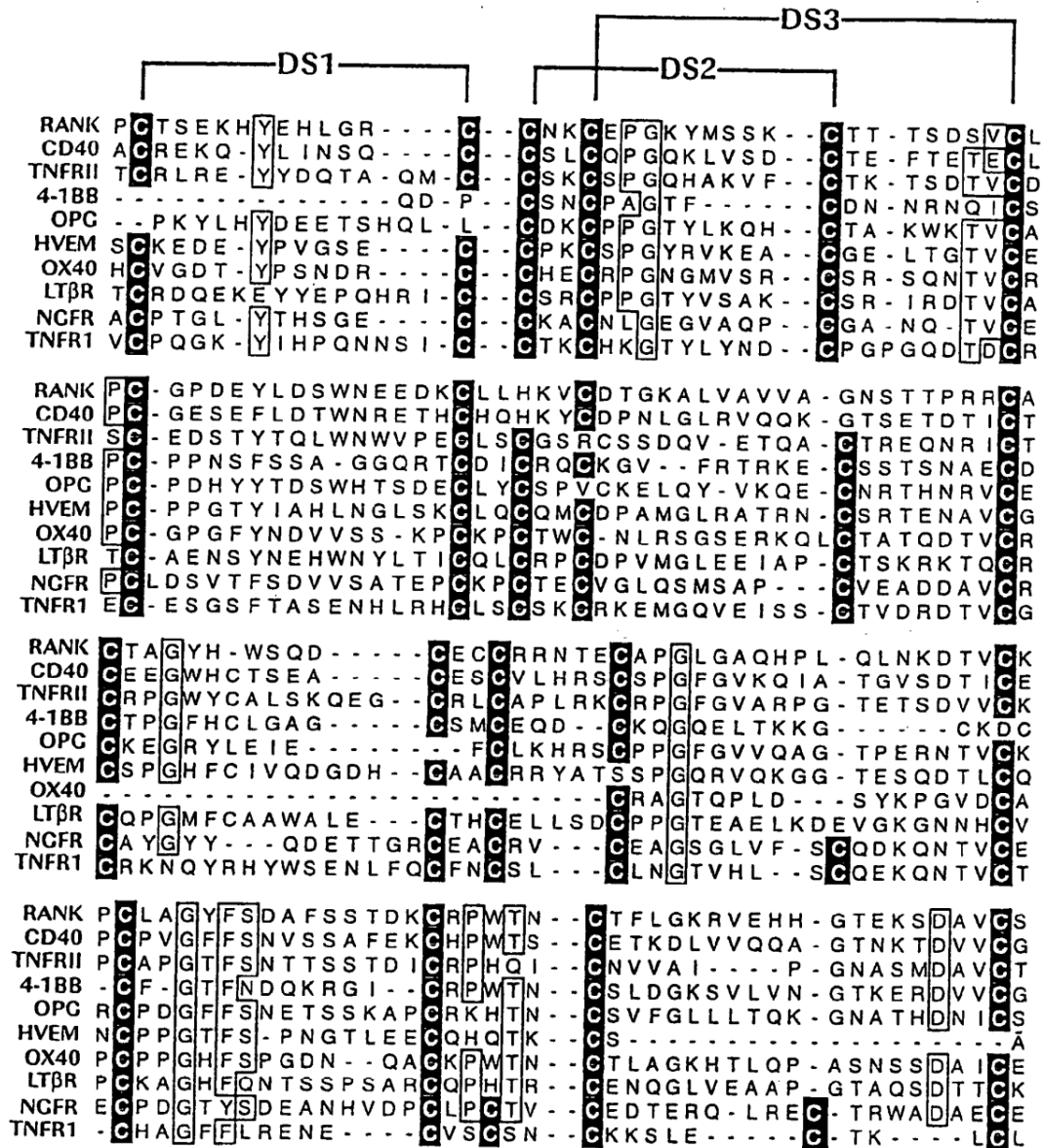


Figura 4

Figura 5

Figura 5 (cont.)

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- US SN08720864 A [0002]
- US SN08249189 A [0003] [0100]
- US 4518584 A [0038]
- US 4737462 A [0038]
- US SN08571579 A [0080]
- US 4411993 A [0084] [0106]
- US 4703004 A [0087] [0109]
- US 24918994 A [0098]
- US 5599905 A [0099] [0102]
- US SN08785150 A [0130]
- US SN60064671 A [0142]
- US SN08813509 A [0142]
- US SN08772330 A [0142]
- US 60064671 B [0142]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- Smith et al. *Science*, 1990, vol. 248, 1019 [0002]
- Schall et al. *Cell*, 1990, vol. 61, 361 [0002]
- Johnson et al. *Cell*, 1986, vol. 47, 545 [0002]
- Stamenkovic et al. *EMBO J.*, 1989, vol. 8, 1403 [0002] [0078]
- Camerini et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 3165 [0002]
- Durkop et al. *Cell*, 1992, vol. 68, 421 [0002]
- Mallett et al. *EMBO J.*, 1990, vol. 9, 1063 [0002]
- Itoh et al. *Cell*, 1991, vol. 66, 233 [0002]
- Kwon et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, vol. 86, 1963 [0002]
- Baker ; Reddy. *Oncogene*, 1996, vol. 12, 1 [0003]
- Xu et al. *Immunity*, 1996, vol. 5, 407 [0003]
- Rothe et al. *Cell*, 1995, vol. 83, 1243 [0012]
- Hopp et al. *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 1204 [0021]
- Canfield ; Morrison. *J. Exp. Med.*, 1991, vol. 173, 1483 [0022]
- Lund et al. *J. Immunol.*, 1991, vol. 147, 2657 [0022]
- Molecular Immunol., 1991, vol. 29, 53 [0022]
- Landschulz et al. *Science*, 1988, vol. 240, 1759 [0023]
- Landschulz et al. *Science*, 1989, vol. 243, 1681 [0023] [0027]
- O'Shea et al. *Science*, 1989, vol. 245, 646 [0023]
- Turner ; Tjian. *Science*, 1989, vol. 243, 1689 [0023] [0027]
- Buckland ; Wild. *Nature*, 1989, vol. 338, 547 [0024]
- Britton. *Nature*, 1991, vol. 353, 394 [0024]
- Delwart ; Mosialos. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 1990, vol. 6, 703 [0024]
- Spruce et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1991, vol. 88, 3523 [0024]
- Rabindran et al. *Science*, 1993, vol. 259, 230 [0024]
- O'Shea et al. *Science*, 1991, vol. 254, 539 [0025]
- McLachlan ; Stewart. *J. Mol. Biol.*, 1975, vol. 98, 293 [0025]
- Krystek et al. *Int. J. Peptide Res.*, 1991, vol. 38, 229 [0026]
- *Science*, 1993, vol. 259, 1288 [0026]
- Hu et al. *Science*, 1990, vol. 250, 1400 [0027]
- Nucl. Acids Res., 1992, vol. 20, 3721 [0027]
- Buckland et al. *J. Gen. Virol.*, 1992, vol. 73, 1703 [0027]
- Alber. *Sixth Symposium of the Protein Society* [0028]
- Walder et al. *Gene*, 1986, vol. 42, 133 [0038]
- Bauer et al. *Gene*, 1985, vol. 37, 73 [0038]
- *BioTechniques*, January 1985, vol. 12, 19 [0038]
- Smith et al. *Genetic Engineering: Principles and Methods*. Plenum Press, 1981 [0038]
- Devereux et al. *Nucl. Acids Res.*, 1984, vol. 12, 387 [0040]
- Stein ; Cohen. *Cancer Res.*, 1988, vol. 48, 2659 [0044]
- van der Krol et al. *BioTechniques*, 1988, vol. 6, 958 [0044]
- Bolivar et al. *Gene*, 1977, vol. 2, 95 [0053]
- Chang et al. *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0054]
- Goeddel et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0054]
- Goeddel et al. *Nucl. Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0054]
- Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 412 [0054]
- Hitzeman et al. *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0055]
- Hess et al. *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0055]
- Holland et al. *Biochem.*, 1978, vol. 17, 4900 [0055]
- Russell et al. *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 258, 2674 [0056]
- Beier et al. *Nature*, 1982, vol. 300, 724 [0056]
- Kurjan et al. *Cell*, 1982, vol. 30, 933 [0056]
- Bitter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 5330 [0056]

- **Fiers et al.** *Nature*, 1978, vol. 273, 113 [0057]
- **Okayama ; Berg.** *Mol. Cell. Biol.*, 1983, vol. 3, 280 [0057]
- **Cosman et al.** *Mol. Immunol.*, 1986, vol. 23, 935 [0058]
- **McMahan et al.** *EMBO J.*, 1991, vol. 10, 2821 [0058]
- **Pouwels.** *Cloning Vectors: A Laboratory Manual.* Elsevier, 1985 [0061]
- **Hinnen et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, 1929 [0064]
- **Luckow ; Summers.** *Bio/Technology*, 1988, vol. 6, 47 [0065]
- **Gluzman.** *Cell*, vol. 23, 175 [0065]
- **Urdalet al.** *J. Chromatog.*, 1984, vol. 296, 171 [0071]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 9.52-9.55 [0078]
- **Pardoll ; Beckerleg.** *Immunity*, 1995, vol. 3, 165 [0084]
- **Raz et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 9519 [0085] [0107]
- **Wang et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 4156 [0085] [0107]
- **Engvall et al.** *Immunochem*, 1971, vol. 8, 871 [0087] [0109]
- **Beckman et al.** *J. Immunol.*, 1990, vol. 144, 4212 [0087] [0109]
- **Yao et al.** *Immunity*, 1995, vol. 3, 811 [0089]
- **Hsu et al.** *Cell*, vol. 84, 299 [0097]
- **Walter, MA et al.** *Nature Genetics*, 1994, vol. 7, 22-28 [0105]
- **Beckerleg.** *Immunity*, 1995, vol. 3, 165 [0106]
- **Mitchison ; Sieper.** *Z. Rheumatol.*, 1995, vol. 54, 141 [0111]
- **Caux et al.** *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 180, 1263 [0119]
- **Romani et al.** *J. Exp. Med.*, vol. 180, 83 [0120]
- **Smith ; Johnson.** *Gene*, vol. 67, 31 [0137]