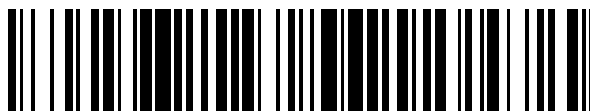


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 826**

51 Int. Cl.:

C12N 15/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **00946953 .7**

96 Fecha de presentación: **30.06.2000**

97 Número de publicación de la solicitud: **1190043**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.03.2002**

54 Título: **GLUCOPROTEÍNA VI Y SUS USOS.**

30 Prioridad:
30.06.1999 US 345468
06.12.1999 US 454824
14.02.2000 US 503387

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2011

73 Titular/es:
MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
75 SIDNEY STREET
CAMBRIDGE, MASSACHUSETTS 02139, US

72 Inventor/es:
BUSFIELD, Samantha, J.;
VILLELAL, Jean-Luc;
JANDROT-PERRUS, Martine;
VAINCENCKER, William;
GILL, Davinder, Singh;
QIAN, Ming, Diana y
KINGSBURY, Gillian

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 368 826 T3

DESCRIPCIÓN

Glucoproteína VI y sus usos

La interacción entre el colágeno y las plaquetas es el primer acontecimiento de la respuesta hemostática normal a la lesión. El colágeno es la principal proteína de la matriz extracelular presente en el subendotelio de los vasos sanguíneos. Cuando se daña el revestimiento del endotelio, como consecuencia de la lesión de la pared del vaso, las fibras de colágeno, las de tipo I y III, quedan expuestas a las plaquetas. Esta interacción conduce a la adhesión plaquetaria, a la activación con una segunda fase de adhesión, a que ocurra la secreción y, finalmente, a la agregación y al desarrollo de un trombo hemostático (Kehrel et al., 1998, *Blood* 91: 491-9).

El mecanismo de las interacciones entre el colágeno y las plaquetas es complejo. Implica, por una parte, la unión directa del colágeno a receptores de plaquetas específicos (p. ej., integrina $\alpha_2\beta_1$, receptor del colágeno, glucoproteína IV y glucoproteína VI) y, por otra parte, la unión indirecta del colágeno por medio de las proteínas de puente (por ejemplo, factor de von Willebrand (vWF)) que se unen al colágeno y a los receptores de la membrana de las plaquetas. Los informes recientes apoyan un mecanismo en dos etapas para la interacción entre el colágeno y las plaquetas, que consiste en la adhesión plaquetaria seguida de la activación plaquetaria (Verkleij et al., 1998, *Blood* 91: 3808-16). En la primera etapa, el complejo receptor plaquetario glucoproteína Ib/IX/V se une al vWF que está fijado al colágeno, y luego ocurre la unión directa de la integrina $\alpha_2\beta_1$ al colágeno (Moroi et al., 1997, *Thrombosis and Haemostasis* 78: 439-444 y Barnes et al., 1998, *Current Opinion in Hematology* 6: 314-320). Esta etapa da lugar a plaquetas que se adhieren al subendotelio de los vasos sanguíneos en condiciones fisiológicas. En la segunda etapa de la interacción entre el colágeno y las plaquetas interviene otro receptor plaquetario del colágeno, la glucoproteína VI (Barnes et al., 1998, *Current Opinion in Hematology* 6: 314-320). Esta fijación conduce a la intensificación de la adhesión y a la activación plaquetaria. Se cree que la glucoproteína VI (GPVI) tiene una importancia menor en la primera etapa de la adhesión, pero que desempeña una función importante en la segunda etapa de la interacción entre colágeno y plaquetas, dando lugar a la activación plaquetaria total y, en consecuencia, a la formación de los agregados de plaquetas (Arai et al., 1995, *British J. of Haematology* 89: 124-130).

La glucoproteína VI (GPVI) es una glucoproteína de la membrana de las plaquetas que interviene en las interacciones entre las plaquetas y el colágeno. En particular, la GPVI es un receptor transmembranario del colágeno que se expresa en la superficie de las plaquetas. La GPVI tiene una masa molecular aparente de 58 kDa en su forma no reducida, y de 62 kDa después de la reducción de los puentes disulfuro, como se determinó mediante su migración por electroforesis en geles de poliácridamida con SDS (SDS-PAGE). Se ha demostrado que el tratamiento de las plaquetas con la N-glucanasa da lugar a un aumento de la migración de la GPVI en SDS-PAGE en dos kDa, que probablemente corresponde a solo un sitio de N-glucosilación.

La existencia de una proteína de 62 kDa, más tarde identificada como GPVI, se detectó primero como un antígeno que reconocía el suero de un paciente con púrpura trombocitopénica inmunitaria que responde a esteroides asociada a funciones plaquetarias inducidas por un colágeno defectuoso (Sugiyama et al., 1987, *Blood* 69: 1712-1720). El plasma del paciente, así como una preparación de anticuerpos IgG completos, indujo a la agregación irreversible y a la liberación de ATP en el plasma rico en plaquetas normales. Sin embargo, los fragmentos Fab preparados del suero de este paciente bloquearon la agregación plaquetaria inducida por el colágeno (Sugiyama et al., 1987, *Blood* 69: 1712-172).

La importancia de la GPVI en las interacciones entre las plaquetas y el colágeno se confirmó además al comparar la expresión de los receptores plaquetarios del colágeno de un paciente diferente, con un trastorno hemorrágico leve, con la de un individuo normal (Moroi et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84(5): 1440-5). Las plaquetas del paciente carecían de la agregación y la adhesión inducida por el colágeno, pero retuvieron la agregación y la liberación normales por otros agonistas. En SDS-PAGE bidimensional no reductor se detectó la expresión de una glucoproteína de la membrana de 61 kDa, pero era menor en comparación con los niveles de expresión encontrados en un individuo normal. Esta glucoproteína se denominó glucoproteína VI (GPVI). Las plaquetas del paciente no se unían a las fibrillas de colágeno de tipo I y III, lo que sugiere que la GPVI funciona como un receptor del colágeno implicado en la activación y agregación plaquetaria inducida por el colágeno.

Se ha demostrado que la GPVI se asocia constitutivamente con el receptor γ de Fc (FcR γ), y que el FcR γ no se expresa en las plaquetas que carecen de la GPVI, lo que sugiere que la GPVI y el FcR γ se coexpresan en las plaquetas (Tsuji et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 23528-31). Además, se ha mostrado que el entrecruzamiento de la GPVI por los fragmentos F(ab')₂ de las IgG anti-GPVI da lugar a la fosforilación de la tirosina de la cadena del FcR γ . El FcR γ se fosforila en la tirosina cuando las plaquetas se activan por el colágeno, por el péptido relacionado con el colágeno (CRP; Gibbins et al., 1997, *FEBS Lett.* 413: 255-259) o por la convulxina, el componente del veneno de serpiente que actúa como un agonista plaquetario (Cvx; Lagrue et al., 1999, *FEBS Lett.* 448: 95-100). La fosforilación se produce en los motivos con tirosina de activación del inmunorreceptor (ITAM) o FcR γ por cinasas de la familia Src (p59Fyn y p53/56 Lyn) (Briddon S. J. y Watson, 1999, *Biochem J.* 338: 203-9). La fosforilación del FcR γ permite que Syk, una molécula de señalización, se fije y, a su vez, se fosfore y active a la fosfolipasa Cy2 (PLCy2). Además, se ha mostrado que la estimulación plaquetaria por el colágeno o la Cvx implica la asociación de la fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3 cinasa) y el conector de la proteína adaptadora por el activador de los linfocitos T (LAT) al FcR γ (Carlsson et al., 1998, *Blood* 92: 1526-31). Por lo tanto, el FcR γ interacciona con la GPVI para

efectuar la señalización.

Los resultados de los estudios realizados sobre la activación de la vía de transducción de señales de la GPVI sugieren la existencia de similitudes importantes entre la vía de señalización de GPVI en las plaquetas y la utilizada por los receptores para los complejos inmunitarios, tales como los receptores de alta afinidad y de baja afinidad por IgG (FcR γ I y FcR γ III), el receptor de alta afinidad por IgE (FcR ϵ I) y el receptor para IgA (FcR α I) (Maliszewski et al., 1990, *J. Exp. Med.* 172: 1665-72). Estos receptores también transmiten la señal a través de la cadena de FcR γ y Syk. No se ha descrito la expresión de FcR γ I ni de FcR γ III en las plaquetas. El FcR γ IIA parece ser el único receptor del Fc de la IgG expresado constantemente en las plaquetas, y contiene 1 ITAM. Se ha sugerido que este receptor interviene en la trombocitopenia y las complicaciones tromboembólicas de la trombocitopenia inducida por la heparina (TIH), que es la trombocitopenia inmunitaria inducida por fármacos más habitual (Carlsson et al., 1998, *Blood* 92: 1526-31), y también puede estar implicado en otra trombocitopenia inmunitaria tal como la trombocitopenia púrpura (Loscalzo, J., y Schafer, A. I., 1998, *Thrombosis and Hemorrhage*, J. Loscalzo y A. I. Schafer, eds., Baltimore: Williams and Wilkins). Polgar et al (*J. Biol. Chem.* (1997) 272: 13576-13583) describen que la convulxina, una proteína del veneno de serpiente que activa las plaquetas, suele unirse a la GPVI.

- Desde su detección, se ha estudiado la función de la GPVI en las interacciones entre las plaquetas y el colágeno y la vía de transducción de señales inducida por la GPVI. Sin embargo, no se ha podido clonar la GPVI debido, al menos en parte, a su abundante O-glucosilación. El no haber podido clonar GPVI ha limitado los experimentos que se pueden realizar para comprender mejor la función de la GPVI en la activación y la agregación plaquetarias inducidas por el colágeno. Además, el desarrollo de los tratamientos de enfermedades, tales como los trastornos hemorrágicos, que se deben a mutaciones en la GPVI o en su promotor se han visto dificultados por la falta de conocimientos sobre las secuencias del ácido nucleico y de los aminoácidos de la GPVI.

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de las moléculas de ADNc que codifican las proteínas TANGO 268, siendo todas ellas proteínas transmembranarias.

- En particular, TANGO 268 representa el receptor del colágeno GPVI que se expresa en las plaquetas. Esta conclusión se basa, al menos en parte, en las pruebas siguientes: (1) la masa molecular glucosilada de TANGO 268 y de GPVI son idénticas o similares; (2) tanto TANGO 268 como GPVI son reconocidas por anticuerpos anti-GPVI y se unen a Cvx; (3) TANGO 268 y GPVI se expresan preferentemente en las células megacariocíticas; (4) se ha predicho que TANGO 268 y GPVI tienen un único sitio de N-glucosilación; (5) la masa molecular de la TANGO 268 de 40 kDa sin glucosilar se predice que es aproximadamente de 62 kDa, la masa molecular aparente de la GPVI cuando está N- y O-glucosilada; (6) la presencia de dos dominios de tipo inmunoglobulina en TANGO 268 indica que, al igual que la GPVI, TANGO 268 interactúa con el FcR γ ; (7) la ausencia de una gran cola intracitoplasmática, que sugiere que esta glucoproteína unida a la membrana no interviene en la señalización, sino que se asocia a otro miembro de la familia de proteínas Ig (p. ej., FcR γ) para transducir una señal; y (8) la presencia de un resto cargado (arginina) en el dominio transmembranario de TANGO 268 que se predice que estará presente en la GPVI por su asociación con el FcR γ .

- En un aspecto de la invención, se da a conocer una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de glucoproteína VI (GPVI), siendo dicha actividad la de fijarse al colágeno, en donde la primera molécula de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de GPVI, en donde la primera molécula de ácido nucleico se selecciona entre (1) una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 9 y (2) una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica al menos al 85% a la SEQ ID n.º 9 y que además comprende una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo que está operativamente unido a la primera molécula de ácido nucleico.

Las proteínas TANGO 268 son miembros de la superfamilia de Ig.

- Los ácidos nucleicos y los polipéptidos de la presente invención son útiles como moduladores para regular una serie de procesos celulares. En consecuencia, en un aspecto, esta invención da a conocer moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de la invención o una porción biológicamente activa del mismo. La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que son adecuadas para uso como cebadores o sondas de hibridación para la detección de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de la invención.
- La descripción incluye moléculas de ácido nucleico que son idénticas al menos al 50%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% a la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de un clon EpthEa11d1 depositado en la ATCC® como número de acceso 207180, o un complemento de las mismas.

- La descripción incluye moléculas de ácido nucleico que son idénticas al menos al 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% a la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 2, la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de un clon EpthEa11d1 depositado en la ATCC® como número de acceso 207180, o un complemento de las mismas.

La descripción incluye moléculas de ácido nucleico que son idénticas al menos al 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% a la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 14, la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de un clon EpTm268 depositado con ATCC® como el número del depósito de patente PTA-225, o un complemento de las

mismas.

La descripción incluye moléculas de ácido nucleico que son idénticas al menos al 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% a la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 15, la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de un clon EpTm268 depositado con ATCC® como el número del depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que son idénticas al menos al 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 98% a la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, a un complemento de las mismas, o la hebra no codificante del ADNc de EpthEa11d1 o de EpTm268 de número de acceso de la ATCC® 207180 o el depósito de patente número PTA-225, en donde dichas moléculas de ácido nucleico codifican polipéptidos o proteínas que muestran al menos una peculiaridad funcional y/o estructural de un polipéptido descrito en la presente memoria.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que incluyen un fragmento de al menos 550, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, la secuencia nucleotídica de un ADNc de EpthEa11d1 de número de acceso de la ATCC® 207180, o un complemento de las mismas.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que incluyen un fragmento de al menos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 950 o 1000 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 2, o un complemento de la misma.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que incluyen un fragmento de al menos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 o 1100 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 14, la secuencia nucleotídica de un ADNc de EpTm268 del depósito de patente con la ATCC® de número PTA-225, o un complemento de las mismas.

La presente invención describe moléculas de ácido nucleico que incluyen un fragmento de al menos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 950 o 1000 nucleótidos contiguos de la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 15, o un complemento de la misma.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen una secuencia nucleotídica que es al menos de 20, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más nucleótidos contiguos idéntica a la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, o 47, o un complemento de las mismas, o la hebra no codificante del ADNc de EpthEa11d1 o EpTm268 de número de acceso de la ATCC® 207180 o de número de depósito de patente PTA-225, en donde dichas moléculas de ácido nucleico codifican polipéptidos o proteínas que muestran al menos una peculiaridad funcional y/o estructural de un polipéptido descrito en la presente memoria.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que incluyen una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos al 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de EpthEa11d1 de número de acceso de la ATCC® 207180, o un complemento de las mismas.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que incluyen una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos al 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 16, la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de EpTm268 de número de depósito de patente de la ATCC® PTA-225, o un complemento de las mismas.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que incluyen una secuencia nucleotídica que codifica una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos al 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, la secuencia de aminoácidos codificada por EpthEa11d1 o EpTm268 de número de acceso de la ATCC® 207180 o de número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas, en donde la proteína codificada por la secuencia nucleotídica también muestra al menos una peculiaridad funcional y/o estructural de un polipéptido descrito en la presente memoria.

En las realizaciones preferentes, las moléculas de ácido nucleico tienen la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15 o la secuencia nucleotídica de los clones de ADNc de número de acceso de la ATCC® 207180 o de número de depósito de patente PTA-225.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, o un fragmento que incluye al menos 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 315 o 330 aminoácidos contiguos de la SEQ ID n.º 3, o la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de EpthEa11d1 de número de acceso de la ATCC® 207180.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento de un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 16, o un fragmento que incluye al menos 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, o 300 aminoácidos contiguos de SEQ ID n.º 16, o la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de EpTm268 de número de depósito de patente de la ATCC® PTA-225.

- 5 La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que codifican un fragmento polipeptídico de al menos 15, 25, 30, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 o más aminoácidos contiguos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por EpthEa11d1 o por EpTm268 de número de acceso de la ATCC® 207180 o de número de depósito de patente PTA-225, en donde el fragmento también muestra al menos una peculiaridad funcional y/o estructural de un polipéptido de la invención.
- 10 La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que codifican una variante alélica que se produce de forma natural de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de número de acceso de la ATCC® 207180 o de número de depósito de patente PTA-225, en donde la molécula de ácido nucleico se hibrida en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia de ácido nucleico que codifica las SEQ
- 15 ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o a la secuencia aminoacídica codificada por un ADNc de número de acceso de la ATCC® 207180 o PTA-225, o un complemento de las mismas.

La presente descripción incluye polipéptidos o proteínas aislados que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente el 30%, preferentemente el 35%, 45%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98%, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, o a la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de

- 20 EpthEa11d1 de número de acceso de la ATCC® 207180.

La presente descripción incluye polipéptidos o proteínas aislados que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente el 30%, preferentemente el 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98%, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 16, o a la secuencia de aminoácidos codifica por un ADNc de EpTm268 de número de depósito de patente de la ATCC® PTA-225.

- 25 La presente descripción incluye polipéptidos o proteínas aislados que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente al 30%, preferentemente el 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98%, a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, o 48, o a la secuencia de aminoácidos codificada por EpthEa11a1 o EpTm268 de número de acceso 207180 o de número de depósito de patente PTA-225, respectivamente, en donde la proteína o polipéptidos también muestran al menos una peculiaridad
- 30 funcional y/o estructural de un polipéptido descrito en la presente memoria.

La presente descripción incluye polipéptidos o proteínas aislados que están codificados por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que es idéntica al menos aproximadamente al 50%, preferentemente el 55%, 60%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98%, a la secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID n.º 3, y polipéptidos o proteínas aislados que están codificados por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia

- 35 nucleotídica que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1 o 2, un complemento de las mismas o una hebra no codificante de un ADNc de EpthEa11d1 de número de acceso de la ATCC® 207180.

La presente descripción incluye polipéptidos o proteínas aislados que están codificados por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que es idéntica al menos aproximadamente al 35%, preferentemente el 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% a la secuencia de ácido nucleico que codifica la SEQ ID n.º 16, y polipéptidos o proteínas aislados que están codificados por una molécula de ácido nucleico que tiene una

- 40 secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones de hibridación rigurosas a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 14 o 15, un complemento de las mismas, o una hebra no codificante de un ADNc de EpTm268 de número de depósito de patente de la ATCC® PTA-225.

La presente descripción incluye polipéptidos o proteínas aislados que están codificados por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que es idéntica al menos aproximadamente al 30%, preferentemente el 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98%, a una secuencia de ácido nucleico que codifica las SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, polipéptidos o proteínas aislados que están codificados por una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones de hibridación

- 50 rigurosas a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, un complemento de las mismas, o la hebra no codificante de EpthEa11d1 o EpTm268 de número de acceso de la ATCC® 207180 o de número de depósito de patente PTA-225, respectivamente, en donde los polipéptidos o las proteínas también muestran al menos una peculiaridad funcional y/o estructural de un polipéptido descrito en la presente memoria.

- 55 La presente invención incluye polipéptidos que son variantes alélicas que se producen en la naturaleza de un polipéptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por un ADNc de número de acceso de la ATCC® 207180 o de número de depósito de patente PTA-225, en donde el polipéptido está codificado por una molécula de ácido nucleico que se

hibrida a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o un complemento de las mismas en condiciones rigurosas.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1 o 2, un ADNc de EpthEa11d1 de número de acceso de la ATCC® 207180, o un complemento de las mismas. En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico tienen una longitud de al menos 480, 500, 530, 550, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 nucleótidos contiguos y se hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, un ADNc de EpthEa11d1 de número de acceso de la ATCC® 207180, o un complemento de las mismas.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 14 o 15, un ADNc de EpTm268 de número de depósito de patente de la ATCC® PTA-225 o un complemento de las mismas. En otras realizaciones, las moléculas de ácido nucleico tienen una longitud de al menos 400, 450, 500, 530, 550, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100 o 1150 nucleótidos contiguos y se hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 14, un ADNc de EpTm268 de ATCC® PTA-225, o un complemento de las mismas.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que se hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o una secuencia nucleotídica de EpthEa11d1 o EpTm268 de número de acceso de la ATCC® 247180 o de número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas, en donde dichas moléculas de ácido nucleico codifican polipéptidos o proteínas que muestran al menos una peculiaridad funcional y/o estructural de un polipéptido descrito en la presente memoria.

La presente descripción incluye moléculas de ácido nucleico que tiene una longitud de al menos 15, preferentemente al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 500, al menos 600, al menos 700, al menos 800, al menos 1000, al menos 1100 o al menos 1200 o más, nucleótidos contiguos que se hibridan en condiciones rigurosas a una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o una secuencia nucleotídica de EpT253, EpTm253, EpT257, EpTm257, EpT258, EpTm258, EpT281 o EpTm281 en la ATCC® como número de acceso 207222, número de acceso 207215, número de acceso 207217, número de acceso 207221, número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas, en donde dichas moléculas de ácido nucleico codifican polipéptidos o proteínas que muestran al menos una peculiaridad funcional y/o estructural de un polipéptido descrito en la presente memoria.

La presente descripción incluye una molécula de ácido nucleico aislada que es antisentido a la hebra codificante de un ácido nucleico descrito en la presente memoria.

Otro aspecto de la invención da a conocer vectores, p. ej., vectores de expresión recombinantes, que comprenden una molécula de ácido nucleico de la invención. En otra realización, la invención da a conocer células hospedadoras que contienen tal vector, o que están modificadas genéticamente para que contengan y/o expresen una molécula de ácido nucleico de la invención. La invención también da a conocer métodos para producir un polipéptido de la invención al cultivar, en un medio adecuado, una célula hospedadora de la invención, de tal forma que se sintetice un polipéptido de la invención.

Otro aspecto de esta invención presenta proteínas y polipéptidos aislados o recombinantes de las invenciones que se describen en las reivindicaciones. Las proteínas y polipéptidos preferentes poseen al menos una actividad biológica que posee el correspondiente polipéptido humano que se sintetiza de forma natural. Una actividad, una actividad biológica, o una actividad funcional de un polipéptido o ácido nucleico de la invención se refiere a una actividad ejercida por una proteína, polipéptido o molécula de ácido nucleico de la invención en una célula que responde, tal y como se determina *in vivo* o *in vitro*, según las técnicas estándares. Tales actividades pueden ser una actividad directa, tal como una asociación a una segunda proteína o una actividad enzimática sobre ella, o una actividad indirecta, tal como una actividad de señalización celular mediada por la interacción de la proteína con una segunda proteína.

Para TANGO 268, las actividades biológicas incluyen, p. ej., (1) la capacidad para modular, p. ej., estabilizar, promover, inhibir o destruir, las interacciones entre proteínas (p. ej., homófilas y/o heterófilas) y las interacciones entre el ligando y la proteína, p. ej., en el reconocimiento entre el ligando y el receptor; (2) la capacidad para modular las interacciones entre célula y/o las interacciones de la matriz extracelular (MEC) con las células, p. ej., modulando las interacciones de las plaquetas con los componentes subendoteliales, p. ej., colágeno, integrinas y otras proteínas de la MEC; (3) la capacidad para modular la respuesta inmunitaria del hospedador, p. ej., modulando uno o más elementos en la respuesta inflamatoria; (4) la capacidad para modular la proliferación, diferenciación y/o actividad de los megacariocitos y/o plaquetas; (5) la capacidad para modular las cascadas de señalización intracelular (p. ej., cascadas de transducción de señales); (6) la capacidad para modular las funciones inmunorreguladoras; (7) la capacidad para modular en las plaquetas su forma, migración, agregación, desgranulación y/o funcionamiento; (8) la

capacidad para interactuar (p. ej., fijarse directa o indirectamente, por ejemplo, como parte de un complejo que comprende TANGO 268) con una o más moléculas de colágeno; (9) la capacidad para modular la unión del colágeno a las plaquetas; (10) la capacidad para mediar y/o modular la concentración intracelular de Ca^{2+} , el metabolismo y/o el recambio de los fosfatidilinosítidos, y la fosforilación de las proteínas (p. ej., c-Src, Syk, PLC γ 2 y/o FcR γ) a través, por ejemplo, de sus restos de tirosina; (11) la capacidad para mediar y/o modular la adhesión y la agregación plaquetarias inducidas por el colágeno (p. ej., formación de trombos), por ejemplo, al mediar y/o modular la secreción del contenido de los gránulos de las plaquetas; (12) la capacidad para mediar y/o modular la adhesión y agregación plaquetarias; (13) la capacidad para interactuar (p. ej., fijarse directa o indirectamente, por ejemplo, como parte de un complejo que comprende TANGO 268) con la convulxina; (14) la capacidad para modular la fijación de la convulxina a las plaquetas; (15) la capacidad para fijarse a un anticuerpo de un paciente con púrpura trombocitopénica idiopática (PTI); (16) la capacidad para asociarse y/o coexpresarse con FcR γ , p. ej., FcR γ en las plaquetas; (17) la capacidad para inducir y/o modular la formación de tumores, la migración de células tumorales y/o la metástasis de células tumorales; (18) la capacidad para inducir y/o modular las enfermedades coronarias (p. ej., aterosclerosis); y (19) la capacidad para inducir y/o modular enfermedades cerebrovasculares (p. ej., accidentes cerebrovasculares e isquemia).

En una realización, un polipéptido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos suficientemente idéntica a un dominio identificado de un polipéptido de la invención. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «suficientemente idéntico» se refiere a una primera secuencia de aminoácidos o de nucleótidos que contiene un número mínimo o suficiente de restos aminoacídicos (p. ej., con una cadena lateral similar) o nucleótidos idénticos o equivalentes a una segunda secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, de tal forma que la primera y segunda secuencias nucleotídicas o aminoacídicas tengan o codifiquen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, en la presente memoria se definen como suficientemente idénticas las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que contienen o codifican un dominio estructural común que tienen una identidad de aproximadamente el 60%, preferentemente una identidad del 65%, más preferentemente una identidad del 65%, más preferentemente una identidad del 75%, 85%, 95%, 98% o más.

En una realización, una proteína TANGO 268 incluye al menos uno o más de los dominios siguientes: una secuencia señal, un dominio extracelular, un dominio de tipo inmunoglobulina, un dominio transmembranario y un dominio intracelular.

Los polipéptidos de la presente invención, o las porciones biológicamente activas de los mismos, pueden estar operativamente unidos a una secuencia de aminoácidos heteróloga para formar proteínas de fusión. La invención presenta adicionalmente anticuerpos, tales como anticuerpos monoclonales o policlonales, que se fijan específicamente a un polipéptido de la invención. Además, los polipéptidos de la invención o las porciones biológicamente activas de los mismos se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas, que incluyen opcionalmente vehículos farmacéuticamente aceptables.

La presente descripción incluye métodos para detectar la presencia, actividad o expresión de un polipéptido de la invención en una muestra biológica al poner en contacto la muestra biológica con un agente capaz de detectar un indicador de la presencia, actividad o expresión tal como la presencia, actividad o expresión de un polipéptido de la invención en la muestra biológica.

La presente descripción incluye métodos para modular la actividad de un polipéptido de la invención que comprende poner en contacto una célula con un agente que modula (inhibe o estimula) la actividad o expresión de un polipéptido de la invención, de tal forma que se modula la actividad o la expresión en la célula. El agente pueden ser un anticuerpo que se fija específicamente a un polipéptido de la invención.

El agente puede modular la expresión de un polipéptido de la invención al modular la transcripción, ajuste o traducción de un ARNm que codifica un polipéptido de la invención. El agente puede ser una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica que es antisentido a la hebra codificante de un ARNm que codifica un polipéptido de la invención.

La presente descripción incluye anticuerpos o fragmentos de los mismos sustancialmente purificados, que incluyen anticuerpos humanos, humanizados, quiméricos y no humanos o fragmentos de los mismos, fijándose específicamente los anticuerpos o sus fragmentos a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc de EpthEa11d1 o EpTm268 del plásmido depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225.

La presente descripción incluye anticuerpos o fragmentos de los mismos sustancialmente purificados, que incluyen, p. ej., anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y humanizados, fijándose específicamente los anticuerpos o fragmentos de los mismos a un polipéptido que comprende al menos 15 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc de EpthEa11d1 o EpTm268 del plásmido depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225 o un complemento de las mismas.

La presente descripción incluye anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos, que incluyen, p. ej., anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y humanizados, fijándose específicamente los anticuerpos o fragmentos de los mismos a un polipéptido que comprende una identidad de al menos el 95% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc de EpthEa11d1 o EpTm268 del plásmido depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas, en donde el porcentaje de identidad se determina utilizando el programa ALIGN del paquete informático GCG con una tabla de ponderación de residuos PAM120, una penalización de la longitud del hueco de 12, y una penalización del hueco de 4.

- La presente descripción incluye anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos, que incluyen, p. ej., anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y humanizados, fijándose específicamente los anticuerpos o los fragmentos de los mismos a un polipéptido codificado por una molécula de ácido nucleico que se hibrida con la molécula de ácido nucleico de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc del plásmido depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225 en condiciones de hibridación de SSC a 6X a 45 °C y lavado en SSC a 0,2X y SDS al 0,1% a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C, o en SSC a 6X a 45 °C y lavado con SSC a 0,1X y SDS al 0,2% a 68 °C.

Cualquiera de los anticuerpos o fragmentos de los mismos se puede conjugar a un resto terapéutico o a una sustancia detectable. Ejemplos no limitantes de sustancias detectables que se pueden conjugar a los anticuerpos de la invención son una enzima, un grupo prostético, un material fluorescente, un material luminiscente, un material bioluminiscente y un material radioactivo.

- La presente descripción incluye un kit que contiene un anticuerpo como el descrito en la presente memoria o un fragmento del mismo conjugado a una sustancia detectable, e instrucciones para su uso. La presente descripción incluye una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo como el descrito en la presente memoria o un fragmento del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede contener un anticuerpo como el descrito en la presente memoria o un fragmento del mismo, un resto terapéutico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- En la presente descripción también se incluye un método para fabricar un anticuerpo que reconoce específicamente la GPVI, comprendiendo dicho método la inmunización de un mamífero con un polipéptido. El polipéptido utilizado como un inmunógeno comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del plásmido depositado en la ATCC® como número de acceso 207180, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del plásmido depositado en la ATCC® como PTA-225; un fragmento de al menos 15 restos aminoacídicos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48; una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos al 65% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, en la que el porcentaje de identidad se determina utilizando el programa ALIGN del paquete informático GCG con una tabla de ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4; y una secuencia de aminoácidos que está codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a una molécula de ácido nucleico que consiste en SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47 en condiciones de hibridación de SSC a 6X a 45 °C y lavado en SSC a 0,2X y SDS al 0,1% a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C, o SSC a 6X a 45 °C y lavado en SSC a 0,1X y SDS al 0,2% a 68 °C. Después de la inmunización, se recoge una muestra del mamífero que contiene un anticuerpo que reconoce específicamente la GPVI. Preferentemente, el polipéptido se genera con métodos recombinantes utilizando una célula hospedadora no humana. Opcionalmente, los anticuerpos se pueden purificar adicionalmente de la muestra utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. El método puede comprender adicionalmente la generación de una célula productora de anticuerpo monoclonal a partir de las células del mamífero. Opcionalmente, se recogen los anticuerpos de la célula productora de anticuerpos.

- En la presente descripción también se incluyen los métodos para tratar un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por la actividad anómala de un polipéptido descrito en la presente memoria o por la expresión anómala de un ácido nucleico descrito en la presente memoria mediante la administración al sujeto de un agente que es un modulador de la actividad de un polipéptido tal y como se describe en la presente memoria o de un modulador de la expresión de un ácido nucleico descrito en la presente memoria. En lo descrito dejar como válido en la presente memoria. En otra realización, el modulador es un ácido nucleico descrito en la presente memoria. El modulador puede ser un péptido, un peptidomimético u otra molécula pequeña.

- En la presente descripción también se incluyen los ensayos diagnósticos para identificar la presencia o ausencia de una lesión genética o mutación caracterizada por al menos uno entre: (i) modificación anómala o mutación de un gen que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria; (ii) regulación errónea de un gen que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria; y (iii) modificación postraducciona anómala en la que una forma de tipo salvaje del gen codifica una proteína que tiene la actividad del polipéptido descrito en la presente memoria.

- En la presente descripción también se incluye un método para identificar un compuesto que se fija a un polipéptido o que modula su actividad tal y como está descrito en la presente memoria. En general, tales métodos conllevan la medición de una actividad biológica del polipéptido en presencia y ausencia de un compuesto problema e identificar

estos compuestos que alteran la actividad del polipéptido. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «se fija selectivamente» se refiere a un compuesto (p. ej., un anticuerpo) que se fija preferentemente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo en comparación con otros polipéptidos sin relación con él. Un compuesto se fija preferentemente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo si tiene al

5 menos una afinidad y/o aidez mayor de un 10%, preferentemente al menos de un 25%, al menos de un 50%, al menos de un 75%, al menos de un 90%, al menos de un 95% o al menos de un 98%, por un polipéptido de TANGO 268 o un fragmento del mismo que un polipéptido sin relación con él.

También se describen en la presente memoria los métodos para identificar un compuesto que modula la expresión de un polipéptido o ácido nucleico de la invención midiendo la expresión del polipéptido o del ácido nucleico en

10 presencia o ausencia del compuesto.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

En las figuras 1A y 1B se representa la secuencia del ADNc de TANGO 268 de humano (SEQ ID n.º 1) y la

15 secuencia de aminoácidos predicha de TANGO 268 de humano (SEQ ID n.º 3). El marco abierto de lectura de la SEQ ID n.º 1 se extiende desde el nucleótido 36 hasta el nucleótido 1052 de la SEQ ID n.º 1 (SEQ ID n.º 2).

En la figura 2 se representa un gráfico de hidropatía de TANGO 268 de humano. Las regiones relativamente hidrófobas de la proteína están por encima de la línea horizontal discontinua, y las regiones relativamente hidrófilas de la proteína están por debajo de la línea horizontal discontinua. Los restos cisteína (Cys) están indicados mediante

20 líneas verticales pequeñas justo debajo del perfil de hidropatía. La línea vertical discontinua marca la separación entre la secuencia señal (aminoácidos 1 a 20 de la SEQ ID n.º 3; SEQ ID n.º 4) a la izquierda y la proteína madura (aminoácidos 21 a 339 de la SEQ ID n.º 3; SEQ ID n.º 5) a la derecha. Debajo del gráfico de hidropatía se representa la secuencia de aminoácidos de TANGO 268 de humano.

En las figuras 3A a 3D se representa un alineamiento de la secuencia nucleotídica del marco abierto de lectura para el precursor del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 24; número de acceso de GenBank U91928) y la secuencia nucleotídica del marco abierto de lectura para TANGO 268 de humano (SEQ ID n.º 2). Las secuencias nucleotídicas de las regiones codificantes del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano y de la TANGO 268 humana son idénticas al 37,7%. La secuencia nucleotídica completa, que incluye las regiones sin traducir (UTR) en 5' y en 3', del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 11; número de acceso a

25 GenBank U91928) es un 49,9% idéntica a la de TANGO 268 de humano. Estos alineamientos se realizaron con el programa de alineamiento ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.

En las figuras 4A y 4B se representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 12) y la secuencia de aminoácidos de TANGO 268 de humano (SEQ ID n.º 3). La secuencia de aminoácidos del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano es un 23,0% idéntica a la de TANGO 268 de humano. Este alineamiento se realizó con el programa de alineamiento ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.

35

En la figura 5A se representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de un dominio de inmunoglobulina típico (SEQ ID n.º 3; número de acceso a GenBank PF00047) y los restos aminoacídicos 41 a 90 de la TANGO 268 humana (SEQ ID n.º 3). Estos alineamientos se realizaron con el programa de alineamiento ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.

40

En la figura 5B se representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de un dominio de inmunoglobulina típico (SEQ ID n.º 13; número de acceso a GenBank PF00047) y los restos aminoacídicos 127 a 182 de la TANGO 268 humana (SEQ ID n.º 3). Este alineamiento se realizó con el programa de alineamiento ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.

45

En la figura 6 se representa una secuencia del ADNc de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 14) y la secuencia de aminoácidos predicha de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 15). El marco abierto de lectura de SEQ ID n.º 14 se extiende desde el nucleótido 63 al nucleótido 1001 de la SEQ ID n.º 14 (SEQ ID n.º 15).

En la figura 7 se representa un gráfico de hidropatía de TANGO 268 de ratón. Las regiones relativamente hidrófobas de la proteína están por encima de la línea horizontal discontinua, y las regiones relativamente hidrófilas de la proteína están por debajo de la línea horizontal discontinua. Los restos cisteína (Cys) están indicados mediante líneas verticales pequeñas justo debajo del perfil de hidropatía. La línea vertical discontinua marca la separación entre la secuencia señal (aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID n.º 16; SEQ ID n.º 17) a la izquierda y la proteína madura (aminoácidos 22 a 313 de la SEQ ID n.º 16; SEQ ID n.º 18) a la derecha. Debajo del gráfico de hidropatía se

50

55

representa la secuencia de aminoácidos de TANGO 268 de ratón.

En las figuras 8A y 8B se representa un alineamiento de la secuencia nucleotídica del marco abierto de lectura para

- el precursor del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 24; número de acceso a GenBank U91928) y la secuencia nucleotídica del marco abierto de lectura de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 15). La secuencia nucleotídica de la región codificante del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano es idéntica en un 34,4% a la de TANGO 268 de ratón. La secuencia nucleotídica completa, que incluye las regiones sin traducir (UTR) en 5' y en 3', del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 11; número de acceso a GenBank U91928) es idéntica en un 35,6% a la de TANGO 268 de ratón. Estos alineamientos se realizaron con el programa de alineamiento ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.
- En las figuras 9A y 9B se representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 12) y la secuencia de aminoácidos de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 16). La secuencia de aminoácidos del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano es idéntica en un 20,3% a la de TANGO 268 de ratón. Este alineamiento se realizó con el programa de alineamiento ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.
- En la figura 10A se representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de un dominio de inmunoglobulina (SEQ ID n.º 12; número de acceso a GenBank PF00047) y los restos aminoacídicos 42 a 91 de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 16). Este alineamiento se realizó con el programa de alineamiento ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.
- En la figura 10B se representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de un dominio de inmunoglobulina típico (SEQ ID n.º 12; número de acceso a GenBank PF00047) y los restos aminoacídicos 128 a 183 de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 16). Este alineamiento se realizó con el programa de alineamiento ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4.
- En la figura 11 se representa un alineamiento de la secuencia de aminoácidos de TANGO 268 de humano (SEQ ID n.º 3) y de la secuencia de aminoácidos de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 16). El alineamiento demuestra que las secuencias de aminoácidos de TANGO 268 de humano y de ratón son idénticas al 64,4%. El alineamiento se realizó con el programa ALIGN con una matriz de ponderación PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12, y una penalización por hueco de 4. Las secuencias dentro de las cajas corresponden a la secuencia señal de TANGO 268 de humano y de ratón; la línea por encima de las dos secuencias indica los dominios de tipo Ig para TANGO 268 de humano y de ratón; y la flecha por encima de las secuencias apunta al resto cargado (arginina) en TANGO 268 de humano y de ratón.
- En la figura 12 se representan los resultados del ensayo de inmunotransferencia del ligando con ¹²⁵I-convulxina (Cvx), donde se demuestra que TANGO 268 se fija específicamente a Cvx. El carril 1 contiene un lisado de plaquetas, el carril 2 contiene un lisado de células CHO transfectadas sólo con el vector de expresión, y el carril 3 contiene un lisado de células CHO transfectadas con TANGO 268. Los lisados celulares se separaron en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de PVDF y se incubaron las membranas con ¹²⁵I-Cvx. La interacción entre ¹²⁵I-Cvx y TANGO 268 se detectó por autorradiografía.
- En la figura 13A se representan los resultados del ensayo de inmunotransferencia con el anticuerpo de Ig anti-GPVI, donde se demuestra que TANGO 268 se fija específicamente al anticuerpo de Ig anti-GPVI. Se separaron los lisados celulares en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de PVDF, se incubaron las membranas con el anticuerpo de IgG anti-GPVI y luego se incubó con la proteína A conjugada a peroxidasa, y se detectó la expresión de TANGO 268 mediante quimioluminiscencia reforzada.
- En la figura 13B se representan los resultados de la fijación de la IgG anti-GPVI tras competir con Cvx, donde se demuestra que Cvx compete con el anticuerpo de Ig anti-GPVI por la fijación a TANGO 268. El carril 1 contiene un lisado de plaquetas, el carril 2 contiene un lisado de células CHO transfectadas sólo con el vector de expresión, y el carril 3 contiene un lisado de células CHO transfectadas con TANGO 268. Se separaron los lisados celulares en geles de poliacrilamida, se transfirieron a membranas de PVDF, se incubaron las membranas con el anticuerpo de IgG anti-GPVI en presencia de Cvx y luego se incubó con la proteína A conjugada a peroxidasa, y se detectó la expresión de TANGO 268 mediante quimioluminiscencia reforzada.
- Figura 14: expresión de la hGPVI y de la mGPVI en los tejidos mediante RT-PCR, análisis de transferencia Northern e ISH:
- Figura 14A: hibridación *in situ* de un embrión de ratón de 12,5 días. La hibridación se observa exclusivamente en el hígado durante la embriogénesis. No se observó ninguna señal con la sonda sentido (no se muestran los datos). La altísima resolución muestra que la única población celular positiva correspondía a los megacariocitos fetales (datos sin mostrar). En los adultos ya no se observaba la expresión en el hígado, sino que se observó una señal multifocal intensa en el bazo y en la médula ósea.
- Figura 14B: la altísima resolución de un procedimiento de fotoemulsión realizado en una sección de fémur de ratón de 6 semanas de edad muestra que la expresión se limita a los megacariocitos. No se observó ninguna señal en ningún otro tejido de adulto analizado (véanse los resultados).

Figura 14C: análisis por RT-PCR de la muestras humanas. Se coamplificaron los transcritos de la microglobulina β_2 y de la GPVI. El fragmento de alto peso molecular (830 pb) se genera con los cebadores de la GPVI, y el fragmento de bajo peso molecular (603 pb) se genera con los cebadores de la microglobulina β_2 . El producto de la PCR de la microglobulina β_2 , utilizado como control de carga, está presente en todas las muestras en una cantidad similar. En cambio, la GPVI sólo se amplifica en las muestras enriquecidas en megacariocitos (de adulto y de recién nacido), en las líneas celulares que muestran unos rasgos marcados de megacariocitos (HEL, MEG01, DAMI, MO7E, mpl-UT7) y, en menor medida, en los hepatocitos fetales. También se detectó una señal muy baja en las líneas celulares K562 y KG1, dos líneas celulares que también expresan la GPIIb en poca cantidad, pero no se detectó la expresión en las otras muestras.

- 10 Figura 14D: análisis por transferencia Northern de tejidos humanos. Se observa sólo un transcrito de 2 kb en la médula ósea y el hígado fetal. También se observa una señal con los leucocitos de sangre periférica (PBL). No obstante, cuando se hibridó la misma transferencia con una sonda de la GPIIb, una proteína de las plaquetas ausente en los PBL, también se detectaron los transcritos, lo que sugiere que la señal se debía a la contaminación con ARN de las plaquetas. No se observó ninguna señal en una muestra de PBL diferente, pero sí en cerebro, corazón, músculo esquelético, colon, timo, bazo, riñón, intestino delgado, placenta, pulmón o ganglios linfáticos (no se muestran los datos).

- 20 Figura 15: fijación de Cvx a líneas de células hematopoyéticas murinas. Se transdujeron las líneas celulares hematopoyéticas con un retrovirus que expresaba la rmGPVI. Se transdujeron las células de control con el vector vacío. Se incubaron las células con la Cvx conjugada a FITC o bothrojaracina conjugada a FITC como control y se analizaron por citometría de flujo. Figura 15A: FDC-P1, figura 15B: Ba/F3, figura 15C: 32D. Línea punteada: células de control transducidas con el vector vacío, línea continua: células transducidas con el retrovirus que lleva la rmGPVI.

- 25 Figura 16: adhesión de las células que expresan la rhGPVI o la rmGPVI a Cvx o colágeno inmovilizados. Se inmovilizaron SAB, Cvx o colágeno de tipo I en placas de microtitulación. Las células U937 (figura 16A) o FDC-P1 (figura 16B) de control o transducidas con GPVI se marcaron con ^{51}Cr y se incubaron durante 60 minutos en los pocillos. Después de aspirar las células que no se unen y de lavar, se contó la radioactividad asociada a los pocillos para determinar el número de células adherentes. Los resultados se expresan como el porcentaje de las células añadidas a los pocillos y son la media $\pm$ SEM de tres determinaciones. Barras huecas: células de control; barras rellenas: células que expresan la GPVI.

- 30 Figura 17: coexpresión de la GPVI humana recombinante con la cadena FcR γ . Los lisados de células U937 de control o transducidas con GPVI se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-FcR γ y proteína A-Sepharose. Las proteínas inmunoprecipitadas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a PVDF. Se incubaron las membranas con una mezcla de anticuerpos anti-FcR γ y anti-GPVI y se revelaron con proteína A conjugada a peroxidasa y quimioluminiscencia.

- 35 Figura 18: inhibición de la activación plaquetaria inducida por el colágeno o por la Cvx ocasionada por la GPVI:Fc soluble humana recombinante.

- 40 Figura 18A: trazado a: se activaron las plaquetas mediante Cvx a 100 pM; trazado b: se incubó la suspensión de plaquetas con 1 μg de GPVI:Fc soluble humana recombinante durante dos minutos antes de añadir la Cvx; trazados c y d: se incubó el colágeno, antes de añadirlo a las plaquetas, con 0,25 μg y 0,5 μg de GPVI:Fc soluble humana recombinante durante dos minutos, respectivamente.

- 45 Figura 18B: trazado a: se activaron las plaquetas con colágeno de tipo I; trazado b: se incubaron las plaquetas, antes de añadir el colágeno, con 5 μg de GPVI:Fc soluble recombinante durante dos minutos; trazados c a e: se incubó el colágeno, antes de añadirlo a las plaquetas, con 1 μg , 2,5 μg y 5 μg , respectivamente, de GPVI:Fc soluble recombinante durante dos minutos. Se usaron plaquetas lavadas marcadas con ^{14}C 5-HT. Se indicó el porcentaje de liberación de ^{14}C 5-HT en cada situación.

Figura 19: tiempo de hemorragia en los ratones trasplantados con células de médula ósea que expresan la GPVI. A los ratones irradiados a los que se trasplantaron células de la médula ósea que expresan la GPVI completa, el dominio extracelular de la GPVI, o un control, se les analizó el tiempo de recuperación de una pequeña incisión en la vena de la cola a los dos meses del trasplante.

- 50 Figura 20: inhibición de la fijación del colágeno a la GPVI ocasionada por anticuerpos monoclonales murinos. El gráfico describe la capacidad que tienen los anticuerpos monoclonales murinos para inhibir la fijación del colágeno a la GPVI-Fc humana soluble respecto a un control negativo (anticuerpo monoclonal 7120.2).

- 55 Figura 21: inhibición de la fijación de la convulxina a la GPVI ocasionada por anticuerpos monoclonales murinos. El gráfico describe la capacidad que tienen los anticuerpos monoclonales murinos para inhibir la fijación de la convulxina a la GPVI-Fc humana soluble respecto a un control negativo (anticuerpo monoclonal 7120.2).

Figura 22: titulaciones de fagos durante la selección de las células U937 que expresan la GPVI. Tras cada ronda de selección, se superinfectaron células de *E. coli* XL1-Blue con el fago seleccionado y se determinaron las titulaciones

del fago en un bioensayo.

Figura 23A: fijación de Fv de una sola cadena ("scFv") a células GPVI-U937. Se incubó el scFv bruto con células U937 que expresan la GPVI (células GPVI-U937) y se detectó la unión de scFv a células GPVI-U937 en un ELISA colorimétrico.

- 5 Figura 23B: fijación de los scFv a GPVI-Fc. Se incubó el scFv bruto con la proteína de fusión GPVI-Fc y se detectó la fijación de scFv a GPVI-Fc en un ELISA colorimétrico.

Figura 24: huellas genéticas con BstNI de los scFv específicos de GPVI. Se amplificaron los clones de scFv que se fijan a la GPVI en los ELISA con proteínas y con células, y se digirió el producto resultante con la enzima de restricción BstNI. El producto digerido se analizó en un gel de agarosa al 2%.

- 10 Figura 25: análisis por FACS de los siete scFv únicos. Se incubaron los scFv purificados con células U937 que expresan la GPVI (células GPVI-U937) y se detectó la unión de los scFv a las células GPVI-U937 mediante un análisis por FACS.

Figura 26: tinción con Coomassie de los scFv purificados. Se purificaron los scFv por cromatografía de Ni-quelato y se confirmó la pureza de los scFv mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie.

- 15 Figura 27: inhibición de la fijación de scFv a las células U937 que expresan la GPVI ocasionada por la proteína de fusión GPVI-Fc soluble.

Las proteínas TANGO 268 y sus moléculas de ácido nucleico comprenden una familia de moléculas que tienen determinados rasgos funcionales y estructurales conservados. Tal y como se utiliza en esta memoria, la terminología «familia» pretende significar dos o más proteínas o moléculas de ácido nucleico que tienen un dominio estructural común y que tienen una identidad de secuencia nucleotídica o aminoacídica suficiente tal y como se define en la presente memoria. Los miembros de la familia pueden ser de la misma especie o de especies diferentes. Por ejemplo, una familia puede comprender dos o más proteínas de origen humano, o puede comprender una o más proteínas de origen humano y una o más de origen no humano. Los miembros de la misma familia también pueden tener dominios estructurales comunes.

- 25 Por ejemplo, las proteínas TANGO 268 descritas en la presente memoria tienen secuencia señal. Tal y como se utiliza en esta memoria, una «secuencia señal» incluye un péptido de al menos unos 15 o 20 aminoácidos de longitud que aparece en el extremo amino de las proteínas secretadas y fijadas en la membrana y en la que al menos aproximadamente el 70% de los restos aminoacídicos son hidrófobos, tales como alanina, leucina, isoleucina, fenilalanina, prolina, tirosina, triptófano o valina. En una realización preferente, una secuencia señal contiene al menos unos 10 a 40 restos aminoacídicos, preferentemente unos 19 a 34 restos aminoacídicos, y tiene al menos de un 60% a un 80% de restos hidrófobos, más preferentemente del 65% al 75%, y más preferentemente al menos aproximadamente el 70%. Una secuencia señal sirve para dirigir una proteína que contiene tal secuencia a una bicapa lipídica. Por consiguiente, en una realización, una proteína TANGO 268 contiene una secuencia señal en aproximadamente los aminoácidos 1 a 20 de la SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 4) o en aproximadamente los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 17). La secuencia señal se escinde durante el procesamiento de la proteína madura.
- 30
- 35

- Un miembro de la familia de TANGO 268 consiste en uno o más de los dominios siguientes: (1) un dominio extracelular; (2) un dominio transmembranario; y (3) un dominio citoplasmático. En una realización, una proteína TANGO 268 contiene un dominio extracelular en aproximadamente los restos aminoacídicos 21 a 269 de la SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 9), un dominio transmembranario en aproximadamente los restos aminoacídicos 270 a 288 de la SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 8), y un dominio citoplasmático en aproximadamente los restos aminoacídicos 289 a 339 de la SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 10). En esta realización, la proteína TANGO 268 madura corresponde a los aminoácidos 21 a 339 de la SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 5). En otra realización, una familia de TANGO 268 contiene un dominio extracelular en aproximadamente los restos aminoacídicos 22 a 267 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 19), un dominio transmembranario en aproximadamente los restos aminoacídicos 268 a 286 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 20) y un dominio citoplasmático en aproximadamente los restos aminoacídicos 287 a 313 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 21). En esta realización, la proteína TANGO 268 madura corresponde a los aminoácidos 22 a 313 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 18).
- 40
- 45

- Un miembro de la familia de TANGO 268 contiene un resto cargado, tal como arginina, lisina, histidina, ácido glutámico y ácido aspártico, en su dominio transmembranario. En una realización, una proteína TANGO 268 contiene un resto aminoacídico cargado, preferentemente arginina, en el aminoácido 272 de la SEQ ID n.º 3. En otra realización, una proteína TANGO 268 contiene un resto aminoacídico cargado, preferentemente arginina, en el aminoácido 270 de la SEQ ID n.º 16.
- 50

- Un miembro de la familia de TANGO 268 incluye una secuencia señal. En una realización determinada, un miembro de la familia de TANGO 268 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, y la secuencia señal está localizada en los aminoácidos 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21 o 1 a 22. En otra realización determinada, un miembro de la familia de TANGO 268 tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 16, y la secuencia señal está localizada en los
- 55

aminoácidos 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22 o 1 a 23. En tales realizaciones de la invención, el dominio extracelular y la proteína madura resultantes de la escisión de tales péptidos señal también se incluyen en la presente memoria. Por ejemplo, la escisión de una secuencia señal que consiste en los aminoácidos 1 a 19 da lugar a un dominio extracelular que consiste en los aminoácidos 20 a 269 de la SEQ ID n.º 3 y la proteína TANGO 268 madura que

5 corresponde a los aminoácidos 20 a 339.

Un dominio de Ig típicamente tiene la siguiente secuencia consenso, que comienza a aproximadamente 1 a 15 restos aminoacídicos, más preferentemente a aproximadamente 3 a 10 restos aminoacídicos, y lo más preferentemente a aproximadamente 5 restos aminoacídicos del extremo carboxilo de una proteína: (FY)-Xaa-C-Xaa-(VA)-COO-, en la que (FY) es un resto de fenilalanina o bien de tirosina (preferentemente tirosina), en la que

10 «Xaa» es cualquier aminoácido, C es un resto de cisteína, (VA) es tanto un resto de valina como de alanina (preferentemente alanina), y COO- es el extremo carboxilo de la proteína. Un dominio de tipo Ig tal y como se describe en la presente memoria tiene la siguiente secuencia consenso, que comienza a aproximadamente 1 a 15 restos aminoacídicos, más preferentemente a aproximadamente 3 a 10 restos aminoacídicos, y lo más preferentemente a aproximadamente 5 restos aminoacídicos del dominio del extremo carboxilo: (FY)-Xaa-C, en la

15 que (FY) es un resto de fenilalanina o bien de tirosina (preferentemente tirosina), donde «Xaa» es cualquier aminoácido, y C es un resto de cisteína. En una realización, un miembro de la familia de TANGO 268 incluye uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%,

20 a los aminoácidos 48 a 88 y/o los aminoácidos 134 a 180 de la SEQ ID n.º 3, que son los dominios de tipo Ig de TANGO 268 de humano (estos dominios de tipo Ig también están representados como SEQ ID n.º 6 y 7, respectivamente).

En otra realización, un miembro de la familia de TANGO 268 incluye uno o más dominios de tipo Ig que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente el 55%, preferentemente al menos

25 aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 48 a 88 y/o los aminoácidos 134 a 180 de la SEQ ID n.º 3, que son los dominios de tipo Ig de TANGO 268 de humano (estos dominios de tipo Ig también están representados como SEQ ID n.º 6 y 7, respectivamente), incluye un resto de cisteína conservado unos 8 restos secuencia abajo del extremo amino del dominio de tipo Ig, y tiene una

30 o más secuencias consenso del dominio de tipo Ig al y como se describe en la presente memoria.

Un miembro de la familia de TANGO 268 puede incluir uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 48 a 88 y/o los aminoácidos 134 a

35 180 de la SEQ ID n.º 3, que son los dominios de tipo Ig de TANGO 268 de humano (SEQ ID n.º 6 y 7, respectivamente), incluye un resto de cisteína conservado 8 restos secuencia abajo desde el extremo amino del dominio de tipo Ig, tiene una o más secuencias consenso del dominio de tipo Ig tal y como se describe en la presente memoria, y tiene una cisteína conservada dentro de la secuencia consenso que forma un puente disulfuro con dicha primera cisteína conservada.

Un miembro de la familia de TANGO 268 puede incluir uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 48 a 88 y/o los aminoácidos 134 a

40 180 de la SEQ ID n.º 3, que son los dominios de tipo Ig de TANGO 268 de humano (SEQ ID n.º 6 y 7, respectivamente), incluye un resto de cisteína conservado 8 restos secuencia abajo desde el extremo amino del dominio de tipo Ig, tiene una o más secuencias consenso del dominio de tipo Ig tal y como se describe en la presente memoria, y tiene una cisteína conservada dentro de la secuencia consenso que forma un puente disulfuro con dicha primera cisteína conservada.

45

Un miembro de la familia de TANGO 268 puede incluir uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 48 a 88 y/o los aminoácidos 134 a

50 180 de la SEQ ID n.º 3, (SEQ ID n.º 6 y 7, respectivamente), incluye un resto de cisteína conservado 8 restos cadena abajo desde el extremo amino del dominio de tipo Ig, tiene una o más secuencias consenso del dominio de tipo Ig tal y como se describe en la presente memoria, tiene una cisteína conservada dentro de la secuencia consenso que forma un puente disulfuro con dicha primera cisteína conservada, y tiene al menos una actividad biológica de TANGO 268 como la descrita en la presente memoria.

55

El dominio de tipo Ig de TANGO 268 puede ser un dominio de Ig, que tiene la siguiente secuencia consenso en el extremo carboxilo del dominio: (FY)-Xaa-C-Xaa-(VA)-COO-, en la que (FY) es un resto de fenilalanina o bien de

60 tirosina (preferentemente tirosina), donde «Xaa» es cualquier aminoácido, C es un resto de cisteína, (VA) es un resto valina o alanina y COO- es el extremo carboxilo del dominio. En esta realización, un miembro de la familia de

TANGO 268 incluye uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95% a los aminoácidos 48 a 90 y/o los aminoácidos 134 a 182 de la SEQ ID n.º 3.

- 5 Un miembro de la familia de TANGO 268 puede incluir uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 49 a 89 y/o los aminoácidos 135 a 181 de la SEQ ID n.º 16, que son los dominios de tipo Ig de TANGO 268 de ratón (estos dominios de tipo Ig también están
- 10 representados como SEQ ID n.º 22 y 23, respectivamente). Un miembro de la familia de TANGO 268 puede incluir uno o más dominios de tipo Ig que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 49 a 89 y/o los aminoácidos 135 a 181 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º
- 15 22 y 23, respectivamente), incluye un resto de cisteína conservado unos 8 restos secuencia abajo del extremo amino del dominio de tipo Ig, y tiene una o más secuencias consenso de dominio de tipo Ig como se describe en la presente memoria.

- Un miembro de la familia de TANGO 268 puede incluir uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más
- 20 preferentemente al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 49 a 89 y/o los aminoácidos 135 a 181 de la SEQ ID n.º 16, (SEQ ID n.º 22 y 23, respectivamente), incluye un resto de cisteína conservado 8 restos secuencia abajo desde el extremo amino del dominio de tipo Ig, tiene una o más secuencias consenso de dominio de tipo Ig como se describe en la presente memoria, y tiene una cisteína conservada dentro de la secuencia
- 25 consenso que forma un puente disulfuro con dicha primera cisteína conservada.

- Un miembro de la familia de TANGO 268 puede incluir uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 49 a 89 y/o los aminoácidos 135 a
- 30 181 de la SEQ ID n.º 16, (SEQ ID n.º 22 y 23, respectivamente), incluye un resto de cisteína conservado 8 restos secuencia abajo desde el extremo amino del dominio de tipo Ig, tiene una o más secuencias consenso de dominio de tipo Ig como se describe en la presente memoria, y tiene una cisteína conservada dentro de la secuencia consenso que forma un puente disulfuro con dicha primera cisteína conservada.

- Un miembro de la familia de TANGO 268 puede incluir uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos aproximadamente el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85%, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 49 a 89 y/o los aminoácidos 135 a
- 35 181 de la SEQ ID n.º 16, (SEQ ID n.º 22 y 23, respectivamente), incluye un resto de cisteína conservado 8 restos secuencia abajo desde el extremo amino del dominio de tipo Ig, tiene una o más secuencias consenso de dominio de tipo Ig como se describe en la presente memoria, tiene una cisteína conservada dentro de la secuencia consenso que forma un puente disulfuro con dicha primera cisteína conservada, y tiene al menos 1 actividad biológica de
- 40 TANGO 268 como se describe en la presente memoria.

- El dominio de tipo Ig de TANGO 268 puede ser un dominio de Ig, que tiene la siguiente secuencia consenso en el extremo carboxilo del dominio: (FY)-Xaa-C-Xaa-(VA)-COO-, en la que (FY) es un resto de fenilalanina o bien de
- 45 tirosina (preferentemente tirosina), donde «Xaa» es cualquier aminoácido, C es un resto de cisteína, (VA) es un resto de valina o de alanina, y COO- es el extremo carboxilo del dominio. En esta realización, un miembro de la familia de TANGO 268 incluye uno o más dominios de tipo Ig que tienen una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente el 55%, preferentemente al menos aproximadamente el 65%, más preferentemente al menos el 75%, aún más preferentemente al menos aproximadamente el 85% y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, a los aminoácidos 49 a 91 y/o los aminoácidos 135 a 183 de la
- 50 SEQ ID n.º 16, que son los dominios de tipo Ig de TANGO 268 de ratón.

- Un miembro de la familia de TANGO 268 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 6, en la que los restos conservados del dominio de tipo Ig antes mencionados están localizados como sigue: el resto de cisteína conservado del extremo amino está localizado en el resto aminoacídico de la posición 48 (dentro del dominio de tipo
- 55 Ig de la SEQ ID n.º 3) y el resto de cisteína conservado del extremo carboxilo está localizado en el aminoácido de la posición 88 (dentro del dominio de tipo Ig de la SEQ ID n.º 3). Un miembro de la familia de TANGO 268 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 6, en la que los restos conservados del dominio de tipo Ig antes mencionados están localizados como sigue: el resto de cisteína conservado del extremo amino está localizado en el resto aminoacídico de la posición 135 (dentro del dominio de tipo Ig de la SEQ ID n.º 3) y el resto de cisteína
- 60 conservado del extremo carboxilo está localizado en el aminoácido de la posición 180 (dentro del dominio de tipo Ig de la SEQ ID n.º 3). Un miembro de la familia de TANGO 268 puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ

ID n.º 22, en la que los restos conservados del dominio de tipo Ig antes mencionados están localizados como sigue: el resto de cisteína conservado del extremo amino está localizado en el resto aminoacídico de la posición 49 (dentro del dominio de tipo Ig de la SEQ ID n.º 16) y el resto de cisteína conservado del extremo carboxilo está localizado en el aminoácido de la posición 89 (dentro del dominio de tipo Ig de la SEQ ID n.º 16). Un miembro de la familia de

5 TANGO 268 puede tener la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 23, en la que los restos conservados del dominio de tipo Ig antes mencionados están localizados como sigue: el resto de cisteína conservado del extremo amino está localizado en el resto aminoacídico de la posición 135 (dentro del dominio de tipo Ig de la SEQ ID n.º 16) y el resto cisteína conservado del extremo carboxilo está localizado en el aminoácido de la posición 181 (dentro del dominio de tipo Ig de la SEQ ID n.º 16).

10 A continuación se resumen varias peculiaridades de TANGO 268 de ratón y de humano.

TANGO 268 humana

Se identificó un ADNc que codifica la TANGO 268 humana al analizar las secuencias de los clones presentes en una genoteca de ADNc de megacariocitos humanos. Este análisis condujo a la identificación de un clon, jthea105e02, que codifica la TANGO 268 humana completa. El ADNc de la TANGO 268 humana de este clon tiene una longitud

15 de 2047 nucleótidos (figura 1; SEQ ID n.º: 1). El marco abierto de lectura de este ADNc, los nucleótidos de 36 a 1052 de la SEQ ID n.º 1 (SEQ ID n.º 2), codifica una proteína transmembranaria de 339 aminoácidos (figuras 1A-B; SEQ ID n.º 3) que, tal y como se explica más adelante, representa una glucoproteína receptora del colágeno expresada en las plaquetas.

20 El programa de predicción de péptidos señal SIGNALP (Nielsen, et al., 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6) predijo que la TANGO 268 humana incluye un péptido señal de 20 aminoácidos (del aminoácido 1 a aproximadamente el aminoácido 20 de la SEQ ID n.º 3; SEQ ID n.º 4) que precede a la proteína TANGO 268 humana madura (que corresponde aproximadamente del aminoácido 21 al aminoácido 339 de la SEQ ID n.º 3; SEQ ID n.º 5). La masa molecular de la TANGO 268 humana sin las modificaciones postraduccionales es de 36,9 kDa antes de la escisión del péptido señal, y de 34,9 kDa después de la escisión del péptido señal.

25 La TANGO 268 humana es una proteína transmembranaria que es un receptor del colágeno expresado en las plaquetas que consiste en uno o más de los dominios siguientes: (1) un dominio extracelular; (2) un dominio transmembranario; y (3) un dominio citoplasmático. La proteína TANGO 268 humana contiene un dominio extracelular aproximadamente en los restos aminoacídicos 21 a 269 de la SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 9), un dominio transmembranario aproximadamente en los restos aminoacídicos 270 a 288 de la SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 8), y un

30 dominio citoplasmático aproximadamente en los restos aminoacídicos 289 a 339 de la SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 10).

En la figura 2 se representa un gráfico de hidropatía de TANGO 268 de humano. Las regiones relativamente hidrófobas de la proteína están por encima de la línea horizontal, y las regiones relativamente hidrófilas de la proteína están por debajo de la línea horizontal. Los restos de cisteína (Cys) y los posibles sitios de N-glucosilación (Ngly) están indicados por líneas verticales pequeñas justo por debajo del trazado de hidropatía. La línea vertical

35 discontinua marca la separación entre la secuencia señal (aminoácidos 1 a 20 de la SEQ ID n.º 3; SEQ ID n.º 4) a la izquierda y la proteína madura (aminoácidos 21 a 339 de la SEQ ID n.º 3; SEQ ID n.º 5) a la derecha.

La TANGO 268 humana comprende dos secuencias de dominios de tipo inmunoglobulina en los aminoácidos 48 a 88 y en los aminoácidos 134 a 180 de la SEQ ID n.º 3; SEQ ID n.º 6 y SEQ ID n.º 7. En los aminoácidos 92 a 95 aproximadamente de la SEQ ID n.º 3 está presente un sitio único de N-glucosilación que tiene la secuencia NGSL.

40 En la TANGO 268 humana se encuentran presentes nueve sitios de fosforilación de la proteína cinasa C. El primero tiene la secuencia TLR (en los aminoácidos 45 a 47 de la SEQ ID n.º 3), el segundo tiene la secuencia SSR (en los aminoácidos 64 a 66 de la SEQ ID NO: 3), el tercero tiene la secuencia TYR (en los aminoácidos 177 a 179 de la SEQ ID n.º 3), el cuarto tiene la secuencia SSR (en los aminoácidos 184 a 186 de la SEQ ID n.º 3), el quinto tiene la secuencia TNK (en los aminoácidos 235 a 237 de la SEQ ID n.º 3), el sexto tiene la secuencia TSR (en los

45 aminoácidos 243 a 245 de la SEQ ID n.º 3), el séptimo tiene la secuencia SPK (en los aminoácidos 250 a 252 de la SEQ ID n.º 3), el octavo tiene la secuencia SRR (en los aminoácidos 293 a 295 de la SEQ ID n.º 3), y el noveno tiene la secuencia TRK (en los aminoácidos 318 a 320 de la SEQ ID n.º 3). En la TANGO 268 humana se encuentran presentes cuatro sitios de fosforilación de la caseína cinasa II. El primero tiene la secuencia SGGD (en los aminoácidos 126 a 129 de la SEQ ID n.º 3), el segundo tiene la secuencia SSRD (en los aminoácidos 184 a 187

50 de la SEQ ID n.º 3), el tercero tiene la secuencia SVAE (en los aminoácidos 219 a 222 de la SEQ ID n.º 3) y el cuarto tiene la secuencia SPKE (en los aminoácidos 250 a 253 de la SEQ ID n.º 3). La TANGO 268 humana tiene dos sitios de fosforilación de la tirosina cinasa que tienen las secuencias KEGDPAPY (en los aminoácidos 147 a 154 de la SEQ ID n.º 3) y KNPERWY (en los aminoácidos 155 a 161 de la SEQ ID n.º 3). La TANGO 268 humana tiene cinco sitios de N-miristoilación. El primero tiene la secuencia GLCLGR (en los aminoácidos 12 a 17 de la SEQ ID n.º

55 3), el segundo tiene la secuencia GSLWSL (en los aminoácidos 93 a 98 de la SEQ ID n.º 3), el tercero tiene la secuencia GGDVTL (en los aminoácidos 127 a 132 de la SEQ ID n.º 3), el cuarto tiene la secuencia GTYRCY (en los aminoácidos 176 a 181 de la SEQ ID n.º 3) y el quinto tiene la secuencia GGQDGG (en los aminoácidos 323 a 328 de la SEQ ID n.º 3). La TANGO 268 humana probablemente está implicada en la señalización celular a través de la interacción con un segundo componente receptor. En el dominio transmembranario de la TANGO 268 humana está

60 presente un resto cargado (arginina en el aminoácido 272 de la SEQ ID n.º 3), que es un distintivo de los receptores

plaquetarios del colágeno, y que pueden funcionar como un sitio de interacción para la asociación con otras proteínas de la membrana, un segundo componente receptor, por ej., FcRy.

En la figura 5A se representa el alineamiento entre el primer dominio de tipo inmunoglobulina de la TANGO 268 humana (desde el resto aminoacídico 41 al 90 de la SEQ ID n.º 3) y un dominio de inmunoglobulina típico (SEQ ID n.º 13; número de acceso PF00047). En la figura 5B se representa el alineamiento entre el segundo dominio de tipo inmunoglobulina de la TANGO 268 humana (desde los restos aminoacídicos 127 a 182 de la SEQ ID n.º 3) y un dominio de inmunoglobulina típico (SEQ ID n.º 13; número de acceso PF00047).

El análisis por transferencia Northern de la expresión de TANGO 268 humana demuestra que se expresa en la médula ósea, en el hígado fetal y en los leucocitos de la sangre periférica. La expresión en el hígado fetal revela una banda del ARNm de la TANGO 268 humana que mide aproximadamente 2 kb. La expresión de la TANGO 268 humana no se detectó en los tejidos siguientes: bazo, ganglio linfático, timo, cerebro, corazón, músculo esquelético, colon, riñón, hígado, intestino delgado, placenta o pulmón. Un análisis adicional predice que la TANGO 268 es específica de la línea de megacariocitos de las células hematopoyéticas.

El clon EpthEa11d1, que codifica la TANGO 268 humana, se depositó en la American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) el 30 de marzo de 1999, y se le asignó el número de acceso 207180. Este depósito se mantendrá bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento en Materia de Patentes. Este depósito se realizó simplemente por comodidad para los expertos en la técnica y no es un reconocimiento de que se requiera un depósito según 35 U.S.C. §112.

En las figuras 3A-3D semuestra un alineamiento de la región codificante de la TANGO 268 humana (SEQ ID n.º 2), con la región codificante de la proteína precursora del receptor inhibitor de monocitos humano (SEQ ID n.º 24). El receptor inhibitor de monocitos humano se ha demostrado que reprime las respuestas de activación mediante fosfatasas. La secuencia nucleotídica de la región codificante del precursor del receptor inhibitor de monocitos humano es idéntica al 37,7% con la de TANGO 268 humana. La secuencia de ácido nucleico completo de la TANGO 268 humana (SEQ ID n.º 1) muestra una identidad del 49,9% con el ácido nucleico completo del precursor del receptor inhibitor de monocitos humano (SEQ ID n.º 11; número de acceso U91928).

En las figuras 4A-4B se muestra que hay una identidad global del 23% entre la secuencia de aminoácidos de la proteína TANGO 268 humana y la secuencia de aminoácidos de la proteína del receptor inhibitor de monocitos humano (SEQ ID n.º 12; número de acceso U91928).

En general, la mayor homología de la TANGO 268 humana se obtiene con diferentes miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas que incluyen los receptores inhibidores y de activación de NK y los receptores de Fc. Específicamente, la TANGO 268 representa un receptor de colágeno específico de las plaquetas previamente descrito como glucoproteína VI (GPVI) y, por lo tanto, puede intervenir en la hemostasis y la trombosis. El hecho de que la TANGO 268 sea la GPVI fue sugerido por lo siguiente: (1) tanto la TANGO 268 como la GPVI se expresan preferentemente en las células megacariocíticas; (2) la masa molecular de la TANGO 268 de 40 kDa sin glucosilar se predice que es aproximadamente de 62 kDa, la masa molecular aparente de la GPVI cuando está N- y O-glucosilada; (3) la presencia de dos dominios de tipo inmunoglobulina en TANGO 268 indica que, al igual que la GPVI, TANGO 268 interacciona con el FcRy; (4) la ausencia de una larga cola intracitoplasmática, que sugiere que esta glucoproteína unida a la membrana no interviene en la señalización sino que se asocia a otro miembro de la familia de proteínas Ig (p. ej., FcRy) para transducir una señal; y (5) la presencia de un resto cargado (arginina) en el dominio transmembranario de TANGO 268, que se predice que está presente en la GPVI basándose en su asociación con el FcRy. Los datos experimentales que confirman que la TANGO 268 representa verdaderamente la GPVI, se presentan más adelante.

TANGO 268 de ratón

Se identificó un ADNc que codifica la TANGO 268 de ratón al analizar las secuencias de los clones presentes en una genoteca de ADNc de megacariocitos de ratón. Este análisis condujo a la identificación de un clon, jtmca105e02, que codifica la TANGO 268 completa de ratón. El ADNc de la TANGO 268 murina de este clon tiene una longitud de 1163 nucleótidos (figura 6; SEQ ID n.º 14). El marco abierto de lectura de este ADNc, los nucleótidos 63 a 1001 de la SEQ ID n.º 14 (SEQ ID n.º 15), codifica una proteína transmembranaria de 313 aminoácidos (figura 6; SEQ ID n.º 16).

El programa de predicción de péptidos señal SIGNALP (Nielsen, et al., 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6) predijo que la TANGO 268 de ratón incluye un péptido señal de 21 aminoácidos (del aminoácido 1 al aminoácido 21 de la SEQ ID n.º 16) (SEQ ID n.º 17) que precede a la proteína TANGO 268 de ratón madura (que corresponde a los aminoácidos 22 a 313 de la SEQ ID n.º 16) (SEQ ID n.º 18). La masa molecular de la TANGO 268 de ratón sin las modificaciones postraduccionales es de 34,5 kDa antes de la escisión del péptido señal, y de 32,3 kDa después de la escisión del péptido señal.

La TANGO 268 de ratón es una proteína transmembranaria que consiste en uno o más de los dominios siguientes: (1) un dominio extracelular; (2) un dominio transmembranario; y (3) un dominio citoplasmático. La proteína TANGO

268 de ratón contiene un dominio extracelular en los restos aminoacídicos 1 a 267 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 19), un dominio transmembranario en los restos aminoacídicos 268 a 286 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 20), y un dominio citoplasmático en los restos aminoacídicos 287 a 313 de la SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 21).

En la figura 7 se representa un gráfico de hidropatía de la TANGO 268 de ratón. Las regiones relativamente hidrófobas de la proteína están por encima de la línea horizontal, y las regiones relativamente hidrófilas de la proteína están por debajo de la línea horizontal. Los restos de cisteína (Cys) y los posibles sitios de N-glucosilación (Ngly) están indicados por líneas verticales pequeñas justo por debajo del trazado de hidropatía. La línea vertical discontinua separa la secuencia señal a la izquierda de la proteína madura a la derecha.

La TANGO 268 de ratón comprende dos secuencias de dominio de tipo inmunoglobulina en los aminoácidos 49 a 89 y en los aminoácidos 135 a 181 de la SEQ ID n.º 16; SEQ ID n.º 22 y SEQ ID n.º 23. En la TANGO 268 de ratón están presentes dos sitios de N-glucosilación que tienen las secuencias NGSH y NITA en los aminoácidos 93 a 96 y en los aminoácidos 244 a 247 de la SEQ ID n.º 16, respectivamente. En la TANGO 268 de ratón están presentes seis sitios de fosforilación de la proteína cinasa C. El primero tiene la secuencia TLK (en los aminoácidos 132 a 134 de la SEQ ID n.º 16), el segundo tiene la secuencia TYR (en los aminoácidos 178 a 180 de la SEQ ID n.º 16), el tercero tiene la secuencia SSR (en los aminoácidos 224 a 226 de la SEQ ID n.º 16), el cuarto tiene la secuencia TNK (en los aminoácidos 233 a 235 de la SEQ ID n.º 16), el quinto tiene la secuencia TEK (en los aminoácidos 239 a 241 de la SEQ ID n.º 16), y el sexto tiene la secuencia SRK (en los aminoácidos 291 a 293 de la SEQ ID n.º 16). En la TANGO 268 de ratón se encuentran presentes dos sitios de fosforilación de la caseína cinasa II. El primero tiene la secuencia SFDE (en los aminoácidos 140 a 143 de la SEQ ID n.º 16) y el segundo tiene la secuencia STTE (en los aminoácidos 237 a 240 de la SEQ ID n.º 16). La TANGO 268 de ratón tiene dos sitios de fosforilación de tirosina cinasa que tienen las secuencias KEGDTGPY (en los aminoácidos 148 a 155 de la SEQ ID n.º 16) y KRPEKWY (en los aminoácidos 156 a 162 de la SEQ ID n.º 16). La TANGO 268 de ratón tiene dos sitios de N-miristoilación. El primero tiene la secuencia GSHWSL (en los aminoácidos 94 a 99 de la SEQ ID n.º 16) y el segundo tiene la secuencia GTYRCY (en los aminoácidos 177 a 182 de la SEQ ID n.º 16). En la TANGO 268 de ratón se encuentra presente un sitio de fosforilación de proteína cinasa dependiente de AMPc y de GMPc que tiene la secuencia REPS (en los aminoácidos 226 a 229 de la SEQ ID n.º 16). En la TANGO 268 de ratón hay un distintivo de la familia de transportadores ABC que tiene la secuencia YAKGNLVRICLGATI (en los restos aminoacídicos 263 a 277 de la SEQ ID n.º 16). La TANGO 268 de ratón no incluye ningún motivo de activación o inhibidor claramente visible en el dominio citoplasmático. La TANGO 268 de ratón probablemente intervenga en la señalización celular a través de la interacción con un segundo componente receptor. En el dominio transmembranario de la TANGO 268 de ratón hay un resto cargado (arginina en el aminoácido 270 de la SEQ ID n.º 16), que puede funcionar como un sitio de interacción para la asociación con otras proteínas de la membrana, un segundo componente, p. ej., FcRγ.

En la figura 10A se representa el alineamiento entre el primer dominio de tipo inmunoglobulina de la TANGO 268 de ratón (desde los restos aminoacídicos 42 a 91 de la SEQ ID n.º 16) y un dominio de inmunoglobulina típico (SEQ ID n.º 13; n.º de acceso PF00047). En la figura 10B se representa el alineamiento entre el segundo dominio de tipo inmunoglobulina de la TANGO 268 de ratón (desde los restos aminoacídicos 128 a 183 de la SEQ ID n.º 16) y un dominio de inmunoglobulina típico (SEQ ID n.º 13; n.º de acceso PF00047).

Los experimentos de la expresión *in situ* con una sonda antisentido de TANGO 268 (nucleótidos 69 a 670 de la SEQ ID n.º 14) revelan que durante la embriogénesis, la TANGO 268 de ratón se expresa exclusivamente en el hígado. El patrón de la señal es intenso y multifocal, lo que sugiere que se expresa en una población de células diseminadas. En los tejidos adultos ya no se observa la expresión de TANGO 268 en el hígado, sino que se observa una señal multifocal e intensa en el bazo. El número de señales multifocales observadas en el bazo se ha reducido significativamente en comparación con el número observado en el hígado embrionario. Los otros tejidos de adulto dieron negativo para la TANGO 268 (esto es, no se observó ninguna señal en cerebro, ojo, glándula de Harder, glándula submandibular, vejiga, grasa blanca, estómago, grasa parda, corazón, glándula suprarrenal, colon, intestino delgado, hígado, placenta, timo, ganglio linfático, bazo, pulmón, médula espinal, páncreas, músculo esquelético o testículos). El análisis de los mismos tejidos con una sonda sentido análoga a la sonda antisentido de TANGO 268 no produjo ninguna señal.

El patrón de la señal y la expresión solo en determinados tejidos que se observaba durante la embriogénesis y en los tejidos adultos fueron idénticos a los observados con una sonda para TANGO 69, un gen que se sabe que se expresa en los megacariocitos (publicación PCT de la patente internacional WO 99/11662, publicada el 11 de marzo de 1999). Al igual que TANGO 69, TANGO 268 también se clonó a partir de una genoteca de megacariocitos. Por consiguiente, estos datos indican que la TANGO 268 se expresa en los megacariocitos durante la embriogénesis y en los ratones adultos.

En general, la mayor homología de la TANGO 268 de ratón se obtiene con diferentes miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas que incluye los receptores inhibidores y de activación de NK y los receptores de Fc. La secuencia de ácido nucleico completa de la TANGO 268 de ratón muestra una identidad del 35,6% con el ácido nucleico completo del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 11; número de acceso U91928). En las figuras 8A-8B se muestra un alineamiento de la región codificante de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 15) con la región codificante de la proteína precursora del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 24). La secuencia nucleotídica de la región codificante del precursor del receptor inhibidor de monocitos humano es

un 34,4% idéntica a la de TANGO 268 de ratón. La secuencia nucleotídica del precursor completo del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 11; número de acceso U91928) es un 35,6% idéntica a la de TANGO 268 de ratón completa (SEQ ID n.º 14). En las figuras 9A-9B se muestra que hay una identidad global del 20,3% entre la secuencia de aminoácidos de TANGO 268 de ratón y la secuencia de aminoácidos de la proteína del receptor inhibidor de monocitos humano (SEQ ID n.º 12; número de acceso U91928).

En la figura 11 se muestra que hay una identidad global del 64,4% entre la secuencia de aminoácidos del precursor de TANGO 268 de humano (SEQ ID n.º 3) y la secuencia de aminoácidos del precursor de TANGO 268 de ratón (SEQ ID n.º 16). Esta homología se extiende por toda la molécula, pero es ligeramente mayor (78%) en los dominios de tipo inmunoglobulina. Resulta interesante que la GPVI humana y de ratón contengan variantes conservadas de la caja WSXWS (restos 96-100 y 192-196). Este motivo es un distintivo de los receptores hematopoyéticos de clase I, pero en las secuencias de todos los receptores inhibidores de los linfocitos citolíticos (KIR) también se pueden encontrar variantes (Fan et al., 1997, *Nature* 389: 96-100). Se ha demostrado que estos motivos contribuyen al plegamiento terciario. La GPVI tiene una cola citoplasmática relativamente corta sin ningún motivo de señalización obvio análogo a las ITAM y a los motivos con tirosina de inhibición del inmunorreceptor (ITIM) de otros receptores de señalización. No obstante, la GPVI presenta un resto cargado positivamente en el dominio transmembranario, lo que le permite formar complejos con la cadena de FcRγ que actúa como una subunidad de señalización (Poole et al., 1997, citado más adelante).

El clon EpTm268, que codifica la TANGO 268 de ratón, se depositó en la American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) el 14 de junio de 1999, y se le asignó el número de acceso PTA-225. Este depósito se mantendrá bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Propósitos del Procedimiento en Materia de Patentes. Este depósito se realizó simplemente por comodidad para los expertos en la técnica y no es un reconocimiento de que se requiera un depósito según 35 U.S.C. §112.

Análisis funcionales y estructurales que demuestran que TANGO 268 es la glucoproteína VI

A continuación se describen los análisis funcionales (fijación del ligando, adhesión celular y activación plaquetaria) y estructurales (inmunotransferencia y expresión tisular) que demuestran que TANGO 268 es la glucoproteína VI.

A. Ensayo de fijación del ligando

La convulxina (Cvx) es una proteína purificada del veneno de *Crotallus durissus terrificus*. Se sabe que la Cvx actúa como un potente agonista de las plaquetas y se ha demostrado que se fija específicamente a la GPVI. A continuación se describen estudios de fijación del ligando Cvx que demuestran que la TANGO 268 fija específicamente la Cvx.

El ensayo de fijación del ligando se realizó como sigue: aproximadamente 5×10^9 plaquetas humanas por mililitro y 10^6 células CHO transfectadas sólo con el vector de expresión y células CHO transfectadas con el vector de expresión que contiene la TANGO 268 completa se lisaron durante 30 min a 4 °C en tampón de lisis que comprende Tris a 10 mM, NaCl a 100 mM, EDTA a 5 mM, pH 8, que contiene Nonidet P40 al 0,1%, PMSF a 2 mM, 5 UI de aprotinina y leupeptina a 20 µM (Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 27035-27041; Lagrue et al., 1999, *FEBS Lett.* 448(1): 95-100). Aproximadamente 8 µg de lisado de plaquetas y de 40 a 80 µg de lisados de células CHO (transfectadas sólo con el vector de expresión y transfectadas con TANGO 268) se separaron en geles planos de acrilamida al 10% (miniprotean II de Biorad) en presencia de SDS y luego se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham). La membrana se saturó con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en PBS. Se realizó la inmunotransferencia del ligando incubando la membrana en presencia de ^{125}I -Cvx (3×10^5 cpm/ml) en PBS pH 7,4 con leche en polvo al 0,5% y Tween al 0,2% durante 4 horas.

La Cvx utilizada en el ensayo de fijación del ligando se purificó a partir de veneno de *Crotallus durissus terrificus* en dos etapas de cromatografía sucesivas (Francischetti et al., 1997, *Toxicon* 35: 1217-28) y se radiomarcó.

Brevemente, el veneno liofilizado de *Crotallus durissus terrificus* se solubilizó en formiato de amonio a 0,1 M y NaCl a 0,3 M, pH 3,1, y las proteínas se separaron en una columna de G75 equilibrada en el mismo tampón. Se liofilizó la Cvx contenida en el primer pico de elución, según se había evaluado mediante electroforesis en gel y la actividad activadora de las plaquetas. Segundo, se solubilizó la Cvx en Tris a 0,1 M, pH 8,5 que contenía urea a 6 M (tampón de Tris-urea) y se purificó adicionalmente mediante cromatografía en una columna G100 equilibrada en el mismo tampón. Las fracciones que contenían la Cvx purificada se agruparon, se dializaron y se liofilizaron. Después de la solubilización en el tampón de Tris-urea, se dializó la Cvx frente a PBS (fosfato a 20 mM, NaCl a 150 mM, pH 7,4). Se radiomarcó la Cvx (100 µg) con 0,5 mCi de ^{125}I (Amersham) utilizando Iodogen (Pierce Chemical Corp.) de acuerdo con el procedimiento publicado (Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 27035-27041). Se separaron Cvx yodada y ^{125}I libre mediante filtración en gel en una columna de Sephadex G25 (Farmacia) en PBS. Se analizó la actividad de ^{125}I -Cvx sobre la agregación de plaquetas humanas.

Después de la incubación de la membrana con ^{125}I -Cvx, se lavó la membrana y se detectó la fijación del ligando mediante autorradiografía con películas X-Omat MA (Kodak). La transferencia del ligando con ^{125}I -Cvx (figura 12) reveló una banda específica en los lisados de plaquetas a 56-58 kDa (carril 1), que representa una banda

identificada anteriormente como GPVI (Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 27035-27041). No se observó ninguna banda positiva en los lisados (60 µg) de las células transfectadas de control solo con el vector de expresión (carril 2). En los lisados de células CHO transfectadas con el vector de expresión con TANGO 268 (60 µg), se observó claramente una banda positiva que migraba a 52-54 kDa (carril 3).

- 5 Los estudios de fijación del ligando demuestran que la convulxina se fija a una molécula presente en células transfectadas con TANGO 268 (y no a las células transfectadas solo con el vector), que tiene una masa molecular muy similar a la masa molecular de GPVI (figura 12). La diferencia de tamaño aparentemente pequeña entre la banda en los lisados de plaquetas y en los lisados de CHO se puede explicar por las discrepancias específicas del tipo de célula en la glucosilación de la proteína.
- 10 Este resultado demuestra que la convulxina se fija a la TANGO 268 y que la TANGO 268 tiene una masa molecular similar o idéntica a la de GPVI. Dado que la GPVI es el receptor plaquetario para la Cvx (Jandrot-Perrus et al., 1997, *Journal of Biological Chemistry* 272: 27035-27041) y que TANGO 268 se expresa preferentemente en los megacariocitos, esta prueba funcional indica que TANGO 268 es GPVI.

B. Ensayo de inmunotransferencia

- 15 En la presente memoria se presentan pruebas estructurales que también apoyan que TANGO 268 se corresponde con GPVI. En particular, los resultados de inmunotransferencia presentados en la presente memoria demuestran que una preparación de IgG que contiene anticuerpos dirigidos contra la GPVI se fija específicamente al polipéptido de TANGO 268. Estos estudios además demuestran que la fijación compite con éxito cuando se introduce la Cvx.

- 20 Se realizó el ensayo de inmunotransferencia como sigue: las plaquetas y los lisados de células CHO transfectadas sólo con el vector de expresión y con el vector de expresión que contiene la TANGO 268 se generaron como se describe en el punto A más arriba. Aproximadamente 8 µg de lisado de plaquetas y de 40 a 80 µg de lisados de células CHO (transfectadas sólo con el vector de expresión o transfectadas con TANGO 268) se separaron en geles planos de acrilamida al 10% (miniprotean II de Biorad) en presencia de SDS y luego se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham). Se saturó la membrana con leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en PBS y luego
- 25 se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con IgG anti-GPVI a 9 µg/ml en PBS, pH 8,6, que contiene Tween 20 al 0,02% (v/v).

Alternativamente, para el ensayo de competición, se incubó la membrana durante 2 horas a temperatura ambiente con IgG anti-GPVI a 9 µg/ml en PBS, pH 8,6, que contiene Tween 20 al 0,02% (v/v) en presencia de una concentración elevada de Cvx fría (0,5 µM).

- 30 La preparación de IgG utilizada en este ensayo se generó al purificar las IgG del suero de un paciente que padece púrpura trombocitopénica idiopática (PTI) (Sugiyama et al., 1987, *Blood* 69: 1712-1720) tal y como se describe en Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 27035-27041. Después de la incubación con la composición del anticuerpo, se lavó la membrana y se incubó con proteína A conjugada a peroxidasa (Amersham) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se revelaron las inmunotransferencias mediante la detección de quimioluminiscencia
- 35 reforzada (Amersham).

- 40 Tal y como se muestra en la figura 13A, la inmunotransferencia con las IgG reveló una banda de 56-58 kDa en los lisados de plaquetas (carril 1), que se corresponde con la masa molecular de la GPVI. La banda de alto peso molecular detectada en los lisados de plaquetas corresponde a las IgG de las plaquetas reveladas por la proteína A. Se detectó la presencia de una banda de 52-54 kDa en los lisados de células CHO transfectadas con la TANGO 268 (figura 13A, carril 3), pero no en los lisados de células CHO transfectadas con el vector de expresión solo (carril 2), lo que demuestra que la TANGO 268 comparte epítopos similares con la GPVI. Las bandas de bajo peso molecular de intensidad moderada observadas en la figura 13A, carriles 2 y 3, son bandas inespecíficas porque se detectaron tanto en los lisados de células CHO transfectadas solo con el vector de expresión como en los lisados de células CHO transfectadas con la TANGO 268.

- 45 Los resultados del ensayo de competición realizado demuestran aún más las similitudes entre TANGO 268 y GPVI. En particular, tal como se muestra en la figura 13B, la Cvx fría a 0,5 µM compite con éxito e inhibe la fijación de los anti-GPVI a la GPVI en los lisados de plaquetas (carril 1) y, asimismo, la banda de 52-54 kDa revelada por las IgG anti-GPVI en los lisados de células transfectadas con la TANGO 268 (carril 3) se inhibió en presencia de Cvx a 0,5 µM.
- 50 En resumen, los resultados de los ensayos de fijación del ligando y de los ensayos de inmunotransferencia que se acaban de describir proporcionan pruebas funcionales (a saber, fijación de Cvx a TANGO 268) e inmunitarias (a saber, reconocimiento por las IgG anti-GPVI) de que TANGO 268 representa, de hecho, el polipéptido de GPVI.

C. Expresión en tejidos de Tango 268/GPVI

- 55 Para estudiar más en profundidad la distribución en los tejidos de Tango 268/GPVI de humano y de ratón, se realizaron análisis de transferencia Northern, RT-PCR e hibridaciones *in situ*. Los resultados que se presentan en la presente memoria confirman y extienden los resultados experimentales presentados más arriba.

Material y métodos

Hibridación *in situ*: se realizó la hibridación *in situ* (ISH) con embriones de ratón C57BL/B6 de 12,5 días y fémures de ratón C57BL/6 normales de 4 a 6 semanas de edad. Los tejidos se fijaron en formol al 10%, se incluyeron en parafina y posteriormente se cortaron en secciones de 4 µm en platinas Superfrost / plus. Se descalcificaron los fémures en TBD-2 (Shandon, Pittsburgh, PA) antes de incluirlos en parafina. Se desparafinaron los cortes en xileno, se hidrataron mediante una serie de lavados con etanol cada vez más concentrado y se colocaron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS) tratada con DEPC, pH 7,4, antes de procesarlos para la ISH. Se incubaron los cortes con proteinasa K a 20 µg/ml (Sigma) en DEPC-PBS durante 15 minutos a 37 °C y a continuación se sumergieron en formaldehído al 4%/PBS durante 5 minutos. Los cortes se trataron con HCl a 0,2 N durante 10 minutos seguido de DEPC-PBS. Se enjuagaron los cortes en trietanolamina-HCl a 0,1 M (TEA, pH 8,0), se incubaron en anhídrido acético-TEA al 0,25% durante 10 minutos, se enjuagaron en DEPC-PBS, se deshidrataron mediante una serie de lavados en etanol cada vez más concentrado y se secaron al aire. La marcación y la hibridación de las sondas de ARN sentido y de ARNc antisentido radiomarcadas con ³⁵S (2,5 x 10⁷ cpm/ml) que codifican un fragmento de 599 pb del extremo en 5' del gen de GPVI (generadas con los cebadores de PCR directo 5'-CAGCCTCACCCACTTTCTTC-3' (SEQ ID n.º 25), nt 8-27 e inverso 5'-CCACAAGCACTAGAGGGTCA-3' (SEQ ID n.º 26), nt 607-588) se llevaron a cabo como se ha descrito previamente (Busfield et al., 1997, *Mol. Cell. Biol.* 17: 4007-14). Después de la hibridación, se deshidrataron los cortes rápidamente a través de una serie de etanol en acetato de sodio a 0,3 M antes de secarlos al aire, se sumergieron en una emulsión de seguimiento nuclear (NTB-2: Eastman Kodak, Rochester, NY) y se expusieron durante 60 días a temperatura ambiente. Se revelaron los portaobjetos con D-19 (Kodak, Rochester, NY), se tiñeron con hematoxilina y eosina-Y, y se cubrieron con un portaobjetos.

Líneas celulares: las líneas celulares HEL (eritroide/MK), U937 (monoblasto), K562 (eritroide), CEM (linfocito T), HEPG2 y Hela se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC®, Manassas, VA) y las células FDC-P1 y 32D se obtuvieron de D. Metcalf (The Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne, Australia). Las UT7 (eritroide/MK) transducidas mediante c-mpl (Hong et al., 1998, *Blood* 91: 813-822), TF1 (eritroide), KG1 (mieloblasto), HL60 (mieloblasto/promielocito), MO-7E (MK), Meg-01 (MK) y DAMI (MK) se obtuvieron de los diferentes laboratorios que las prepararon (Avanzi et al., 1988, *Br. J. Haematol.* 69: 359-366) (Collins et al., 1977, *Nature* 270: 347-349) (Greenberg et al., 1988, *Blood* 72: 1968-1977) (Kitamura et al., 1989, *J. Cell Physiol.* 140: 323-334) (Koeffler y Golde, 1977, *Science* 200: 1153-1155). (Komatsu et al., 1991, *Cancer Res.* 51: 341-348) (Ogura et al., 1985, *Blood* 66: 1364-1392).

Las líneas celulares humanas HEL, U937, HL60, Meg-01, KGland y K562 se cultivaron en IMDM (Gibco/BRL, Grand Island, NY), STF al 10 % (Stem cell technology, Vancouver, BC, Canadá). Las c-mpl UT7, TF1 y MO-7E son dependientes de factor y se hicieron crecer bien en presencia de GM-CSF a 2 ng/ml o PEG-rHuMGDF a 10 ng/ml en STF al 10% en IMDM. CEM y Hela se hicieron crecer en RPMI (GibcoBRL, Grand Island, NY). Las líneas celulares murinas FDC-P1, 32D y Ba/F3 se cultivaron en DMEM (GibcoBRL, Grand Island, NY), STF al 10 % (Stem cell technology, Vancouver, BC, Canadá). Se llevaron a cabo los cultivos a 37 °C en una atmósfera humidificada totalmente de CO₂ al 5%.

Muestras: se obtuvieron megacariocitos humanos como se ha descrito para las genotecas humanas de sangre de cordón umbilical CD34⁺ obtenidas de sangre de cordón umbilical normal o movilizada. Se obtuvo un hígado fetal de un aborto en la 12.^a semana de gestación después de obtener un consentimiento informado.

Análisis de transferencia Northern/RT-PCR: las membranas para Northern con muestras de varios tejidos humanos, compradas a Clontech (Palo Alto, Ca), se hibridaron con una sonda de GPVI humana de 1,0 kb como describe el fabricante. Se aisló el ARN total utilizando RNA PLUS (Bioprobe Systems, Francia), una modificación del método de extracción con ácido-tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo de Chomczynski y Sacchi (Chomczynski y Sacchi 1987). El ARN se retrotranscribió con hexámeros al azar utilizando la transcriptasa inversa SUPERScript (Gibco BRL/Life Technologies, Cergy Pontoise, Francia).

Para los tejidos y líneas celulares de humano, después de la retrotranscripción, se sometió cada muestra a una amplificación específica del ADNc de la GPVI y de la microglobulina β₂. Las secuencias de los cebadores específicos fueron: para la GPVI, el cebador sentido 5'-TTCTGTCTTGGGCTGTGTCTG-3' (SEQ ID n.º 27) y el cebador antisentido 5'-CCCGCCAGGATTATTAGGATC-3' (SEQ ID n.º 28), para la microglobulina β₂, el cebador sentido 5'-CCTGAAGCTGACAGCATTCGG-3' (SEQ ID n.º 29) y el cebador antisentido 5'-CTCCTAGAGCTACCTGTGGAG-3' (SEQ ID n.º 30). Se realizó la PCR en una mezcla de reacción de 25 µl que contenía 0,3 U de Taq polimerasa (ATGC Noisy-le-Grand, Francia), dNTP a 200 µM, 30 pmol del oligonucleótido sentido y 30 pmol del antisentido para la amplificación de la GPVI, y 10 pmol del oligonucleótido sentido y 10 pmol del antisentido para la amplificación de la microglobulina β₂, en tampón de ATGC. La mezcla de reacción se sometió a la desnaturalización durante 5 min a 95 °C y se amplificó durante 35 ciclos como sigue: desnaturalización durante 30 segundos a 94 °C, renaturalización durante 30 segundos a 60 °C y extensión a 72 °C durante 1 min, con una extensión final de 7 min a 72 °C en un termociclador 2400 (Perkin Elmer Co, Courtaboeuf, Francia). Los productos de la PCR (9 µl) se migraron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Se visualizaron los fragmentos con iluminación después de la tinción con bromuro de etidio. Se utilizó como marcador el MassRuler DNA Ladder, de intervalo bajo (MBI Fermentas, Amherst, NY).

Resultados

Los tejidos humanos se estudiaron mediante el análisis de transferencia Northern o por RT-PCR. El análisis de transferencia Northern (Figura 14D) no reveló ningún mensajero específico en cerebro, corazón, músculo esquelético, colon, timo, bazo, riñón, hígado, intestino delgado, placenta, pulmón o ganglios linfáticos. Sólo se observó un transcrito de 2 kb en la médula ósea y el hígado fetal. Se observó una señal inconstante con las células de la sangre periférica, probablemente debido a una contaminación con ARN de las plaquetas en algunas muestras. De hecho, los transcritos para la glucoproteína IIb (GPIIb) plaquetaria, una proteína específica de las plaquetas, también se detectaron en estas muestras positivas.

- Utilizando el análisis por RT-PCR, no se detectó ningún transcrito de la GPVI en las células sanguíneas, excepto en las plaquetas. En las líneas celulares se observó una señal intensa de PCR en las estirpes HEL, MEG01, DAMI, MO7E estimulada por TPO y UT7 transducida con mpl (Hong et al., 1998, *Blood* 91: 813-822). También se detectó una señal muy baja en las líneas celulares K562 y KG1, dos líneas celulares también expresaban la GPIIb en poca cantidad, pero no se detectó ninguna expresión en las células HEPG2, CEMT, TF1, U937, HL60 y Hela. Las células CD41+ (de las que el 95% son megacariocitos) aisladas de sangre de cordón umbilical normal o de sangre periférica movilizada inducida por quimioterapia mostraron una señal intensa por RT-PCR. Las células del hígado fetal expresaron una cantidad moderada en comparación con las muestras enriquecidas en megacariocitos (figura 14C).

- Se estudiaron los tejidos de ratón mediante transferencia Northern y el análisis de ISH. La ISH reveló que la GPVI se encontraba exclusivamente en el hígado durante la embriogénesis (figura 14A). El patrón de la señal era intenso y multifocal, lo que sugiere que se expresaba en una población de células diseminadas. Esta señal se observó en los días embrionarios 13,5, 14,5, 16,5 y disminuyó de intensidad el día 18,5 y en un recién nacido de 1,5 días. En los adultos ya no se observaba la expresión en el hígado, sino que se observó una señal multifocal intensa en el bazo y en la médula ósea. No se observó ninguna señal en ningún otro tejido, que incluye cerebro, ojo, glándula de Harder, glándula submandibular, vejiga, grasa blanca, estómago, grasa parda, corazón, glándula suprarrenal, colon, intestino delgado, hígado, placenta, timo, ganglio linfático, pulmón, médula espinal, páncreas, músculo esquelético, testículos. El procedimiento de fotoemulsión del bazo y de la médula ósea demostró que esta expresión estaba limitada a los megacariocitos (figura 14B).

- En conclusión, a pesar de haber rastreado una gran cantidad de tejidos humanos y de ratón, la expresión de la GPVI sólo se detectó en los megacariocitos/plaquetas. Este resultado indica claramente que la GPVI está limitada a esta estirpe hematopoyética. Actualmente, hay muy pocas moléculas que sean específicas de la estirpe de los megacariocitos. La GPIIb (integrina αIIb), que durante mucho tiempo se consideró que era el marcador prototípico de los megacariocitos, también se expresa en un subconjunto de progenitores hematopoyéticos. Otras proteínas de los megacariocitos, tales como la GPIb α , β y GPIX (CD42) también se expresan en las células endoteliales activadas. Sólo la PF4 parece ser específica de la línea de megacariocitos/plaquetas. Por este motivo, se ha utilizado el promotor de la PF4 para actuar selectivamente sobre los megacariocitos en distintos modelos transgénicos (Ravid et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1521-5.). Por lo tanto, el promotor de la GPVI también se puede utilizar para escoger específicamente la línea de los megacariocitos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la invención se pueden utilizar para situar específicamente, mediante la recombinación homóloga, un gen de interés en el locus GPVI bajo el control del promotor de la GPVI. Alternativamente, se puede clonar la región del promotor de la GPVI utilizando las técnicas estándares conocidas por los expertos en la técnica (p. ej., hibridando una genoteca genómica con una sonda del extremo 5' de los ADNc de la invención y, más específicamente, detectando la hibridación del clon de la TANGO 268 humana en una genoteca genómica humana del cromosoma 19 en particular).

D. Citometría de flujo para estudiar la expresión de Tango 268/GPVI en la superficie celular

- Para determinar si la GPVI recombinante se expresaba en la superficie celular, se transdujeron diferentes líneas celulares hematopoyéticas murinas o humanas con retrovirus recombinantes que expresan la GPVI humana o murina y con el retrovirus de control.

Material y métodos

- Líneas celulares que expresan la GPVI: se transfectaron las células CHO utilizando Lipofectamine (Gibco-BRL, Grand Island, NY), según las instrucciones del fabricante. El vector de expresión (pMET, Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA) que contiene el ADNc completo de la GPVI, transcrito por un promotor SR α , se aisló de la genoteca de ADNc. Se transfectaron las células CHO de control con el vector vacío. Las células se recogieron 2 días después de la transfección y se lisaron con Tris a 12 mM, NaCl a 300 mM, EDTA a 12 mM, que contiene leupeptina a 2 μ M, PMSF a 2 mM, 5 kUI de aprotinina y NP40 (Sigma, St. Louis, MO) al 0,2% (v/v). Después de 20 min a 4 °C con agitación, se centrifugaron las muestras a 13 000 g durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes se congelaron a -80 °C para el análisis.
- Se modificaron genéticamente las líneas celulares humanas HEL, U937 y K562 y las líneas celulares murinas FDC-P1, 32D y Ba/F3 (Bums et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033-7) para que expresaran la GPVI utilizando el retrovirus pMSCVpac (Hawley et al., 1994, *Gene Ther.* 1: 136-8). Brevemente, los virus que llevan el ADNc completo que codifica la GPVI humana o la GPVI murina se construyeron con fragmentos de los ADNc amplificados

por PCR de hibridación perfecta (Clontech Laboratories Inc, Palo Alto, CA). Se generaron los sobrenadantes víricos en las células 293-EBNA (Invitrogen, Carlsbad, CA) al transfectar la construcción retrovímica y dos vectores pN8ε que contenían los genes gag/pol del virus de la leucemia de Moloney murino (MMLV) o el gen de la glucoproteína G de envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). Se prepararon sobrenadantes víricos concentrados mediante centrifugación a 4 °C en un rotor SW28 a 50 000 x g (25 000 rpm) durante 2 horas. Se resuspendieron los sedimentos en 1,5 ml de DMEM durante 24 horas a 4 °C, se agitaron a 4 °C durante 24 horas y se congelaron a -80 °C. Para la transducción, las estirpes celulares se incubaron con el sobrenadante vírico durante una noche en placas de 24 pocillos, 10 x 10⁵ células/ml, y se seleccionaron durante una semana con puromicina (4 µg/ml, Sigma, St. Louis, MO). La GPVI humana y murina se introdujeron por transducción en las líneas celulares humanas y murinas, respectivamente. La expresión de los genes se verificó por análisis con PCR. Las células de control se introdujeron por transducción con el virus vacío.

Preparación de la convulxina y la bothrojaracina: se purificó la convulxina (Cvx) del veneno de *Crotalus durissus terrificus* como se describe esencialmente en Francischetti et al, mediante un procedimiento de filtración en gel de dos etapas, con Sephadex G75 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) seguido de Sephacryl S100 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Se marcó la Cvx con ¹²⁵I utilizando el procedimiento Iodogen (Pierce Chemical Co, Rockford, IL) y Na¹²⁵I (Amersham, Les Ulis, Francia). Se conjugó la Cvx a FITC mezclando la Cvx en NaHCO₃ a 50 mM y NaCl a 150 mM, pH 9,5, con un exceso molar de 100 veces de FITC (Aldrich, St Quentin Fallavier, Francia) durante una noche a 4 °C. La Cvx conjugada a FITC se separó de la FITC libre mediante cromatografía en una columna de Sephadex G25 (PD10 Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) en fosfato a 20 mM y NaCl a 150 mM, pH 7,4 (PBS). La bothrojaracina, un inhibidor de la trombina específico purificado del veneno de *Bothrops jararaca* como se describió previamente (Arocas et al., 1996, *Biochemistry* 35: 9083-9) se conjugó a FITC mediante el mismo procedimiento.

Citometría de flujo: las células transducidas con los virus de GPVI murina o humana o el virus control se incubaron en presencia de FITC-Cvx o FITC-bothrojaracina a 20 nM durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la dilución en PBS, las células se analizaron mediante un citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ).

Resultados

Se observó que las líneas celulares utilizadas para este estudio expresan la cadena FcRγ, como se indica mediante los estudios de inmunotransferencia con un anticuerpo policlonal anti-FcRγ. La caracterización funcional de la GPVI recombinante se realizó utilizando las células transfectadas que o bien no tenían GPVI endógena (U937, FDC-P1) o bien la tenían en poca cantidad (HEL). A diferencia de las células DAMI que expresan el ARNm de GPVI, esto nos permitió medir las respuestas independientemente de la GPVI endógena.

Se analizaron las células transducidas mediante citometría de flujo utilizando Cvx conjugada a FITC. Como control, se utilizó la bothrojaracina conjugada a FITC, otra proteína de veneno de serpiente con una estructura muy cercana a la Cvx, pero que es una inhibidora pura de la trombina que no se fija a las plaquetas. La transducción de las células 32D murinas con un retrovirus que expresa la GPVI murina dio lugar a una tinción más intensa asociada a la Cvx que las células transducidas con el virus de control, lo que indica que estas células expresan la GPVI en su superficie (figura 15). Se obtuvieron resultados similares con FDC-P1 y Ba/F3 (todas ellas líneas celulares murinas) y con K562 y U937, lo que indica que la GPVI murina o humana se expresa en la superficie de todas estas líneas celulares después de la transducción. Se encontró que la Cvx se fija a las células HEL de tipo salvaje, pero la fijación aumentó claramente después de la transducción retrovímica, lo que indica un aumento de la expresión en las células que ya expresan constitutivamente la GPVI.

Discusión

Este análisis por fluorescencia de fijación al ligando demuestra que la Cvx se fija a la proteína recombinante humana en las células U937 y K562, y a la proteína recombinante de ratón en FDC-P1, 32D y Ba/F3. Se sabe que la Cvx reconocía a la GPVI de ratón por los estudios que demuestran que la Cvx es un potente activador de las plaquetas, tanto de las plaquetas humanas como de las de ratón. La expresión de la GPVI recombinante en la superficie celular puede haber estado facilitada por la coexpresión de la cadena FcRγ en estas células. Se ha demostrado previamente que la expresión de la cadena FcRγ se requiere para que FcγRI, FcγRIII y FcεRI se expresen en la superficie, y para que el colágeno active las plaquetas (Poole et al., 1997, *EMBO J.* 16 (9): 2333-2341) en los ratones que carecen de FcRγ.

E. Adhesión celular

Como la GPVI se expresó en la superficie celular de las células transfectadas, se comprobó su capacidad para promover la adhesión celular en un sistema estático, tanto a la Cvx como al colágeno inmovilizados, y se comparó luego este resultado con el de la SAB inmovilizada.

Material y métodos

Adhesión celular: se inmovilizaron colágeno de tipo I (2 µg, Chrono-log corp. Haverton, PA), Cvx (1,4 µg) o SAB (2

µg, Sigma, St Louis, MO) en 100 µl de PBS sobre placas Immulon II (Dynatech, St Cloud, Francia) durante una noche a 4 °C. A continuación se saturaron las placas con SAB a 2 mg/ml en PBS durante una hora y se lavaron con PBS. Las células en el medio de cultivo se marcaron con ⁵¹Cr (CIS Bio International, Gif-sur-Yvette, Francia) durante una hora a 37 °C. Después de la centrifugación a 150 g durante 10 min, se lavaron las células con tampón de Hanks
 5 que contiene SAB (2 mg/ml) y se resuspendieron en el mismo tampón. Las células se añadieron a los pocillos. Después de 60 min a temperatura ambiente, los pocillos se vaciaron y se lavaron, y se contó el ⁵¹Cr de las muestras.

Resultados

Se analizaron dos líneas celulares: U937 y FDC-P1. A la SAB inmovilizada no se fijaron ni las células que expresan la GPVI ni las células de control. Sin embargo, la expresión de la GPVI recombinante humana o murina en U937 o
 10 FDCP-1, respectivamente, promueve claramente la adhesión de estas células al colágeno inmovilizado y, en mayor medida, a la Cvx inmovilizada (figura 16). Este resultado indica que la proteína GPVI funciona como un receptor para el colágeno I. Además, la GPVI es un receptor para el colágeno III.

F. Asociación de la GPVI recombinante a la cadena FcRγ

Para analizar si la GPVI recombinante (que también se denomina en la presente memoria Tango 268 o
 15 glucoproteína VI) se expresaba asociada a la cadena FcRγ, realizamos estudios de inmunoprecipitación con un anticuerpo policlonal anti-FcRγ en lisados de células U937 transducidas en comparación con las plaquetas.

Material y métodos

Análisis de proteínas: las diferentes células (plaquetas, megacariocitos y líneas celulares) se lisaron en un tampón compuesto por Tris a 12 mM, NaCl a 300 mM y EDTA a 12 mM, que contiene leupeptina a 2 µM, PMSF a 2 mM, 5
 20 kUI de aprotinina y NP40 al 0,2% (v/v). Después de 20 min a 4 °C con agitación, se centrifugaron las muestras a 13 000 g durante 15 min a 4 °C y los sobrenadantes se congelaron a -80 °C. Se determinó la concentración de proteínas utilizando el ensayo de proteínas de Bio-Rad (Bio-Rad, Ivry-sur-Seine, Francia). Para los experimentos de transferencia, las proteínas además se solubilizaron con SDS al 2% durante 5 min a 100 °C. Se separaron las proteínas mediante electroforesis en geles planos de acrilamida (Mini protean II, Bio-Rad Laboratories, Ivry-sur-
 25 Seine, Francia) y se transfirieron a PVDF. Las membranas se empaparon con leche en polvo desnatada al 5% y se incubaron con ¹²⁵I-Cvx (6 x 10³ Bq/ml) en PBS, pH 7,4, que contiene Tween 20 al 0,1 % (v/v), o con IgG anti-GPVI (9 µg/ml en PBS, pH 8, que contiene Tween 20 al 0,02% (v/v) en ausencia o presencia de Cvx fría a 0,5 µM. Las IgG anti-GPVI se obtuvieron como se ha descrito anteriormente (Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 27035-27041) a partir de plasma de paciente amablemente cedido por el Dr. M. Okuma (Kyoto, Japón). Se revelaron los
 30 anticuerpos utilizando proteína A conjugada a la peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y quimioluminiscencia reforzada (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Para las inmunoprecipitaciones, los lisados celulares se dejaron transparentes previamente mediante incubación con proteína A-Sepharose a 4 °C durante 30 min y posterior centrifugación. Los lisados transparentes se incubaron durante una noche a 4 °C con anticuerpos policlonales contra la cadena FcRγ a 10 µg/ml (Upstate Biotechnology, NY) y después se le añadió la
 35 proteína A/G-Sepharose (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) durante 2 horas a temperatura ambiente. Se eluyeron las proteínas inmunoprecipitadas con SDS al 2% y se sometieron a SDS-PAGE seguido de la transferencia a membranas de PVDF y después se realizó el escrutinio con anticuerpos anti-GPVI y contra la cadena FcRγ como se describe más arriba.

Resultados

En la figura 17 se muestra el análisis de las proteínas precipitadas mediante inmunotransferencia con una mezcla de anticuerpos anti-FcRγ y una preparación de IgG que contiene anticuerpos dirigidos contra la GPVI. Se observaron tres bandas en todas las muestras: una banda de alto peso molecular que corresponde a las IgG, una banda sin
 40 identificar de aproximadamente 50 kDa y un doblete a 14 kDa que corresponde a la cadena FcRγ. Además, una banda correspondiente a la GPVI está presente en las plaquetas y también se observa en las células U937 transducidas con el virus con GPVI, pero no en las células transducidas con el virus de control, lo que indica que la GPVI recombinante está asociada físicamente a la cadena FcRγ. Al igual que con FcαRI, en la unión probablemente
 45 intervengan restos cargados dentro del dominio transmembranario: R272 o R270 respectivamente para la hGPVI y la mGPVI, y D11 para la cadena FcRγ.

G. Inhibición mediante rhusGPVI:Fc de la activación plaquetaria inducida por la Cvx y por el colágeno

Se sintetizó una proteína GPVI soluble humana de fusión con Fc (rhusGPVI:Fc) y se purificó para investigar su capacidad de competir con la GPVI fijada a la membrana de las plaquetas.

Material y métodos

Preparación de las proteínas: el marco abierto de lectura del dominio extracelular predicho de la T268 se amplificó por PCR a partir de la secuencia de Kozak delante de la primera metionina hasta la asparragina 269 inmediatamente
 55 antes de la secuencia transmembranaria predicha. El fragmento de la PCR se ligó en un vector hospedador pCDM8 que contiene la secuencia genómica del dominio Fc de la IgG1 humana (hFc) de tal manera que la parte extracelular

del ADNc de la hGPVI se fusionó en su extremo carboxilo a través de un conector de 3 alaninas a la secuencia de hFc. La construcción de ADN secuenciada se transfectó transitoriamente en las células HEK 293T en placas de 150 mm utilizando Lipofectamine (GibcoBRL, Grand Island, NY) según el protocolo del fabricante. Transcurridas 72 horas desde la transfección, se recogió el medio condicionado sin suero (OptiMEM, GibcoBRL, Grand Island, NY), se centrifugó y se filtró. Se volvieron a alimentar las células con medio nuevo y se recogieron una 72 horas más tarde. El análisis de los sobrenadantes en una inmunotransferencia después de la SDS-PAGE en condiciones reductoras utilizando un anticuerpo policlonal contra la Fc de IgG humana mostró unas cantidades significativas de la proteína de fusión GPVI soluble humana recombinante (rhusGPVI:Fc) en los sobrenadantes con una masa molecular relativa de aproximadamente 75-80 kDa respecto al cóctel de los estándares de masas moleculares Mark 12 (Novex, San Diego, CA).

El medio acondicionado se pasó sobre una columna Prosep-G con proteína G (10 ml, Bioprocessing Inc., Princeton, NJ); a continuación se lavó la columna con PBS, pH 7,4 y se eluyó con glicina a 200 mM, pH 3,0, a 7 ml/min. Las fracciones del pico de elución a 280 nm que contiene la rhusGPVI:Fc humana se agruparon y se dializaron en un tubo de diálisis 8000 MWCO frente a dos cambios de 4 l de PBS, pH 7,4, a 4 °C con agitación constante. Entonces, el material intercambiado tamponado se esterilizó por filtración (0,2 µm, Millipore Corporation, Bedford, MA) y se congeló a -80 °C.

Preparación de plaquetas: se recogió sangre de voluntarios sanos mediante punción en vena con anticoagulante de ácido-citrato-dextrosa (ACD-A). Cuando fue necesario, se marcaron las plaquetas incubando el plasma rico en plaquetas (PRP) con (¹⁴C) 5-hidroxitriptamina a 0,6 µM durante 30 min a 37 °C. Se obtuvieron sedimentos de plaquetas por centrifugación del PRP y se lavaron dos veces tal y como se describe más arriba (Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 27035-27041).

Agregación y secreción de las plaquetas: la agregación de las plaquetas lavadas (3 x 10⁸/ml) en tampón de reacción se inició mediante el colágeno de tipo I (Bio/Data Corp, Horsham, PA) o Cvx. Se llevaron a cabo experimentos con agitación a 37 °C en un agregómetro Chrono-Log (Chronolog Corp. Haverton, PA). Se midió la liberación de la (¹⁴C) 5-hidroxitriptamina tal y como se describe más arriba (Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 27035-27041).

Resultados

La rhusGPVI:Fc no indujo la agregación plaquetaria ni la secreción de gránulos por sí misma. Cuando se incubaron las plaquetas con la Cvx, la adición de rhusGPVI:Fc (0,25 a 5 µg/ml) inhibió totalmente la agregación plaquetaria y la secreción de gránulos densos (figura 18). Además, cuando se añadió rhusGPVI:Fc a la suspensión de plaquetas antes que Cvx, también inhibió la agregación y la secreción, lo que indica que podría competir con la GPVI plaquetaria por la Cvx (figura 18A). La incubación del colágeno con rhusGPVI:Fc induce una pérdida en su capacidad para inducir en las plaquetas la agregación y la secreción (figura 18B). No obstante, se necesitó una concentración diez veces mayor de rhusGPVI:Fc que la requerida para Cvx para producir este efecto inhibitor. Además, cuando la GPVI soluble recombinante se añadió a las plaquetas antes que al colágeno, no se observó ninguna inhibición (figura 18B). Estos resultados demuestran que el dominio extracelular de la GPVI es activa a la hora de bloquear la agregación plaquetaria inducida por el colágeno y por la Cvx.

Discusión

La GPVI, a pesar de su función esencial en la agregación plaquetaria inducida por el colágeno, se describe que tiene una función menor en la adhesión de las plaquetas al colágeno. Otros receptores tales como el complejo GPIb-IX-V o la integrina α2β1 sí tienen una función importante en la adhesión de las plaquetas al colágeno. Sin embargo, la Cvx inmovilizada es capaz de inducir la adhesión de las plaquetas, lo que indica que la GPVI puede intervenir en la adhesión en estas condiciones. Los resultados anteriores demuestran que la expresión de la GPVI en las células U937 y FDCP-1 induce la adhesión celular a una superficie revestida con colágeno o con Cvx. El número de células que se fijan a la Cvx inmovilizada fue significativamente mayor que las que se fijaron al colágeno. Este resultado indica diferencias en la densidad de los sitios de fijación de GPVI en las dos superficies. La Cvx es un ligando de la GPVI puro y, cuando se inmoviliza, genera una superficie muy reactiva, mientras que los sitios de fijación a la GPVI deben estar diseminados sobre las fibras de colágeno, lo que da lugar a una superficie menos reactiva.

Sin embargo, estos resultados indican que la GPVI recombinante imita la función fisiológica de la GPVI de las plaquetas (a saber, la fijación al colágeno). La diferencia en la reactividad entre el colágeno y la Cvx se resalta aún más con las diferencias en el efecto inhibitor que la GPVI soluble recombinante tiene sobre la activación de las plaquetas inducida por la Cvx y por el colágeno. De hecho, la GPVI recombinante soluble inhibe la activación de las plaquetas inducida por la Cvx en ausencia de preincubación con la Cvx al mismo tiempo que requiere una preincubación con colágeno para inhibir la activación de las plaquetas inducida por el colágeno. Probablemente, esto refleja la cinética rápida de interacción entre la GPVI y la Cvx en comparación con la cinética entre la GPVI y el colágeno. La afinidad de la GPVI soluble recombinante por la Cvx es probablemente muy elevada por dos razones: (i) la GPVI soluble se expresa en una forma de fusión de Fc divalente y (ii) la Cvx es multivalente debido a su estructura hexamérica. Por lo tanto, los sitios de fijación a la GPVI sobre las fibras de colágeno probablemente están dispersos y poco accesibles. Alternativamente, estas observaciones también podrían sugerir que la fijación del colágeno a sus otros receptores, incluida la integrina α2β1, promueve su interacción posterior con la GPVI.

La GPVI desempeña una función importante en el desarrollo de los trombos, probablemente porque es el receptor que parece gobernar la activación de las plaquetas cuando entran en contacto con el colágeno y, por lo tanto, se induce la acumulación de plaquetas. De hecho, los pacientes con deficiencia de la GPVI o con suero que contiene anticuerpos contra la GPVI mostraban trastornos hemorrágicos (véanse los Antecedentes, más arriba). La clonación molecular de la GPVI proporciona la oportunidad de caracterizar el mecanismo de estas deficiencias, la interacción precisa entre la GPVI y la integrina $\alpha 2\beta 1$ en la activación de las plaquetas inducida por el colágeno, pero también la función de la GPVI en las enfermedades tromboembólicas. La GPIIb-IIIa (integrina $\alpha IIb \beta 3$) es el único receptor plaquetario contra el que se han desarrollado hasta ahora los antagonistas eficientes (Lefkowitz et al., 1995, *N. Engl. J. Med.* 332: 1553-9). Incluso aunque GPIIb-IIIa pueda estar implicado en la adhesión a plaquetas, su principal función es fijarse al fibrinógeno para permitir la agregación plaquetaria y servir como la vía común final de la formación de trombos de plaquetas, independientemente de la vía metabólica que inicia la activación de las plaquetas. En cambio, la GPVI está implicada en una etapa temprana de activación de plaquetas que se produce inmediatamente cuando las plaquetas entran en contacto con la matriz subendotelial.

La GPVI representa una alternativa y una diana más específica para los nuevos compuestos antitrombóticos. El antagonista se puede dirigir contra cualquiera de los dos participantes, a saber, los sitios de fijación a la GPVI del colágeno o la propia GPVI. Dado que estas observaciones sugieren que los sitios de fijación a la GPVI no son fácilmente accesibles en fibras de colágeno, un antagonista dirigido contra el GPVI puede ser más eficaz que un antagonista dirigido contra el colágeno.

H. Tiempo de hemorragia en los ratones trasplantados con células de la médula ósea que expresan la GPVI.

Los resultados presentados en la presente memoria apoyan la participación de la GPVI en la formación de agregados de plaquetas y el desarrollo de un trombo hemostático.

Material y métodos

Aislamiento de células de la médula ósea Lin⁻: se recogieron células de la médula ósea de ratones a los que se les había administrado 150 mg/kg de 5-fluorouracilo (5-FU) por vía intravenosa durante cuatro días. Las células se resuspendieron en una solución salina tamponada con fosfato (PBS), suero de ternera fetal (STF) al 0,5%, y se incubaron durante 20 minutos a 4 °C con una mezcla de cuatro anticuerpos monoclonales de rata conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) fluorescente contra CD3e, CD11b, CD45R, y Ly-6G de ratón (Pharmingen, San Diego, California). Después de la marcación, las células se lavaron y se incubaron a 4 °C con anticuerpos contra microperlas con FITC (Miltenyi Biotec, Auburn, California). Después de una incubación de 15 minutos, se lavaron las células, se filtraron por un filtro con un tamaño de poro grande y se aplicaron en una columna magnética de retirada para clasificación de células (tipos BS, Miltenyi Biotec) sostenida en un separador magnético (Super MACS, Miltenyi Biotec). La retirada de las células marcadas magnéticamente (linaje positivo) de la muestra de la médula ósea se realizó según las instrucciones del fabricante. En algunos experimentos, se aislaron células Sca-1⁺/Lin⁻ utilizando un kit multiSort para Sca-1 (Miltenyi Biotec). Después de la separación, se lavaron las células (Lin⁻ o Sca-1⁺/Lin⁻) y se resuspendieron en DMEM, STF al 10% (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canadá).

Procedimiento de infección: las células de la médula ósea Lin⁻ o Sca-1⁺/Lin⁻ se estimularon a 37 °C, CO₂ al 10% con 10 ng/ml de interleucina-3 recombinante de ratón (rmIL-3; Endogen, Woburn, Massachusetts), 10 ng/ml de interleucina 6 recombinante de ratón (rmIL-6; Endogen), 100 ng/ml de factor de células troncales (SCF) recombinante de ratón (rmSCF; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN), 100 ng/ml de ligando de la tirosina cinasa 3 de tipo FMS recombinante de ratón (rmFlt-3L; R&D Systems, Inc) y el 1% de un medio acondicionado que contiene trombopoyetina de ratón (mTPO). El medio acondicionado con mTPO (que contiene aproximadamente 10⁴ U/ml de mTPO) se recogió de células en confluencia productoras del virus MPZenTPO, se filtró, y el virus se inactivó a 56 °C durante 1 hora. Después de dos días de estimulación, las células de la médula ósea se infectaron con retrovirus recombinante que contiene el ADNc que codifica la GPVI completa murina, conteniendo el retrovirus recombinante el ADNc que codifica el dominio extracelular de la GPVI murina, o un retrovirus de control.

Ensayo de hemorragia: se trasplantaron células de médula ósea infectadas en ratones mortalmente irradiados y, dos meses después del trasplante se analizó el tiempo de recuperación de los ratones de una pequeña incisión en la vena de la cola. Se midió el torrente circulatorio de la incisión a 37 °C en solución salina.

Resultados y discusión:

En la figura 19 se representa el tiempo de hemorragia de los ratones mortalmente irradiados trasplantados con células de la médula ósea modificadas genéticamente para que expresen la GPVI completa, el dominio extracelular de la GPVI o un control. Los ratones trasplantados con células de la médula ósea modificadas genéticamente para que expresen el dominio extracelular de la GPVI, un producto soluble, tuvieron el tiempo de recuperación más largo de una pequeña incisión en la vena de la cola. No se observó ninguna diferencia significativa en el tiempo de recuperación de una incisión en la vena de la cola entre los ratones trasplantados con células de la médula ósea modificadas genéticamente para que expresen la GPVI completa y el control. Estos resultados sugieren que la forma soluble de la GPVI inhibe la interacción entre el colágeno y las plaquetas necesaria para la agregación plaquetaria y el desarrollo de un trombo hemostático.

Anticuerpos anti-TANGO 268

A continuación se describen anticuerpos que se fijan inmuno-específicamente a la TANGO 268 (también denominada en la presente memoria glucoproteína VI o GPVI).

A. Anticuerpos de ratón anti-GPVI humana5 Generación de hibridomas de ratón

La proteína de fusión GPVI humana-Fc de IgG₁ humana («hGPVI-Fc de IgG₁ humana») que consiste en la secuencia líder de la CD5 humana más el dominio extracelular de la GPVI humana se preparó mediante transfección transitoria de células COS de mamífero utilizando Lipofectamine (Gibco BRL) según las instrucciones del fabricante. Se recogieron los sobrenadantes el día 3 y el día 7. Se purificó la proteína de fusión utilizando perlas de vidrio con proteína G ProsepTM.

Se inmunizaron ratones Balb/c con ADN que codifica la proteína de fusión descrita más arriba utilizando la técnica de disparo génico con ADN que codifica la proteína de fusión tal y como se describió en Kilpatrick et al., 1998, *Hybridoma* 17: 569-576. Se pudo detectar una titulación de suero contra la proteína de fusión hGPVI-Fc de IgG₁ humana mediante ELISA (inmunoensayo enzimático) utilizando la metodología estándar (véase, p. ej., «Antibodies : A Laboratory Manual» de Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory; *Current Protocols in Immunology*, eds. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober y Richard Coico; John Wiley & Sons).

Los ratones se «estimularon» con la proteína de fusión hGPVI-hFc de IgG₁ por vía intravenosa 4 días antes de recoger los bazos. Se realizaron las fusiones utilizando los protocolos estándares. Los esplenocitos de un ratón se fusionaron con células de mieloma SP2/0 utilizando el protocolo de polietilenglicol (PEG) estándar (véase, p. ej., «Antibodies : A Laboratory Manual» de Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory; *Current Protocols in Immunology*, eds. John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober y Richard Coico; John Wiley & Sons).

Las líneas de hibridoma se detectaron selectivamente por la secreción de anticuerpos específicos contra la GPVI humana («hGPVI») mediante ELISA utilizando placas recubiertas con hGPVI-Fc de IgG₁ humana o IgG₁ humana (Sigma) o la proteína hGPVI con etiqueta de His. Igualmente, las líneas de hibridoma se detectaron selectivamente por la secreción de anticuerpos específicos contra la hGPVI mediante análisis de FACS. Brevemente, se infectaron células U937 o HEL con un virus pMSCVpac pseudotipado como VSV-G (Hawley et al., 1994, *Gene Therapy* 1: 166) que contenía la GPVI humana completa y se seleccionó por resistencia a la puromicina. Se detectó selectivamente la capacidad de fijación de los sobrenadantes de los hibridomas mediante FACS utilizando estas células U937 o HEL transducidas con la GPVI. Se detectaron selectivamente mediante FACS los sobrenadantes de hibridoma por su capacidad de fijación a la GPVI humana expresada en la superficie celular.

Se aislaron nueve anticuerpos secretados por hibridomas que eran específicos contra la GPVI según se determinó mediante el análisis de FACS. Todos estos anticuerpos eran IgG₁. A estos anticuerpos se les analizó su capacidad para fijarse a plaquetas de mono y humano sin fijar purificadas como se describe más adelante.

Se clonaron las líneas celulares de hibridoma murino seleccionadas utilizando ClonalCellTM-HY Medium D (StemCell Technologies Inc) según las instrucciones del fabricante.

Fijación de los anticuerpos a las plaquetas humanas y de babuino

En tampón Tyrodes-hepes a pH 7,4, que contiene apirasa a 75 mU/ml y PGE1 a 100 nM, EDTA a 2 mM y SAB a 3,5 mg/ml, se diluyeron 100 µl de plaquetas lavadas humanas o de babuino (recogidas mediante venopunción en anticoagulante de ácido-citrato-dextrosa [ACD-A]) a 10⁶/ml. Se añadieron 5 µl de una solución de anticuerpo monoclonal a las plaquetas lavadas. Se incubaron el anticuerpo y las plaquetas juntos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se añadieron 2 µl de F(ab)₂ de cabra anti-IgG de ratón conjugado a FITC, y se incubó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Los controles utilizados en el estudio fueron las plaquetas en reposo (autofluorescencia) y el anticuerpo secundario solo. Además, se incluyeron como controles la convulxina y los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma 7120.2 y 7H14.1. Se determinó el análisis de fijación mediante citometría de flujo. Se repitió el experimento varias veces y los datos presentados son un resumen de todos estos experimentos.

Como se esperaría de los anticuerpos anti-GPVI, los anticuerpos monoclonales de ratón producidos por las líneas celulares de hibridoma 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J4.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.3, 7H4.6 y 9012.2 se fijaron a las plaquetas humanas y de babuino (tabla 1). El valor medio de la intensidad de fluorescencia de las plaquetas marcadas y el porcentaje de células plaquetarias marcadas varió de un anticuerpo a otro. Como se ilustra en la tabla 1, los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J4.2, 6E12.3 y 1P10.2 marcaron el porcentaje más elevado de plaquetas humanas y de babuino. Los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J4.2, 6E12.3 y 1P10.2 marcaron las plaquetas de babuino con la intensidad de fluorescencia más elevada. Además, los anticuerpos

monoclonales producidos mediante las líneas celulares de hibridoma 3F8.1, 9E18.3, 3J4.2, 6E12.3, 1P10.2 y 7H4.6 marcaron las plaquetas humanas con la intensidad de fluorescencia más elevada.

Tabla 1: Resumen del análisis FACS

Clones y controles	Células U937 o HEL transducidas con GPVI	% de plaquetas humanas positivas	% de plaquetas de babuino positivas	Intensidad de fluorescencia en humano	Intensidad de fluorescencia en babuino
8M14.3	+++	64,2	94	27	59
3F8.1	+++	85	93	42	73
9E18.3	+++	71	92,5	31	62
3J24.2	+++	82	73,8	36	26
6E12.3	+++	80,7	93	38	68
1P10.2	+++	80	88,8	35	46
4L7.1	neg.	1,7	7	7	10
4L7.3	937	62	SD	SD	SD
7H4.6	++	51	16	39	10
9012.2	++	21	33,8	14	18
7120.2*	neg.	1,6	9	7	10
7H.4.1*	neg.	1,4	6,8	7	9
Convulxina**	SD	93	95	76	72
Control negativo (*); Control positivo (**); Negativo (neg.); Sin determinar (SD); Moderado (++); Elevado (+++)					

Actividad de agregación plaquetaria de los anticuerpos monoclonales de ratón

- 5 Plaquetas lavadas humanas o de babuino a 3×10^8 /ml en tampón Tyrodes-hepes, pH 7,4. Incubación con los anticuerpos (concentración final de 10 a 20 μ g/ml) a 37 °C con agitación (1100 rpm) en la cubeta del agregómetro (Chronolog). La agregación plaquetaria se midió por el cambio en la transmisión óptica inducida por el anticuerpo solo o mediante la adición del colágeno de tipo I.
- 10 Como cabría esperar de los anticuerpos anti-GPVI, los anticuerpos monoclonales de ratón producidos por las líneas celulares de hibridoma 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J4.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.3, 7H4.6 y 9012.2 indujeron la agregación espontánea y cambios en la forma de las plaquetas humanas. No obstante, ninguno de los anticuerpos probados indujeron la agregación espontánea de las plaquetas de babuino, aunque algunos anticuerpos probados fueron capaces de inducir cambios de forma en las plaquetas de babuino. No se detectó el bloqueo de la agregación de las plaquetas de babuino inducidas por el colágeno a una concentración de anticuerpo de 10 μ g/ml. Sin embargo,
- 15 los anticuerpos monoclonales de ratón producidos por las líneas celulares de hibridoma 7H4.6 y 8M14.3 acortaron el tiempo de agregación de las plaquetas de babuino inducidas por el colágeno, lo que sugiere que estos anticuerpos pueden sensibilizar la plaqueta para la activación.

Tabla 2: Resumen de la agregación plaquetaria

Clones y controles	Agregación espontánea de las plaquetas humanas	Cambio de forma de las plaquetas humanas con el anticuerpo	Agregación espontánea de las plaquetas de babuino	Colágeno bloquea la agregación de las plaquetas de babuino	Cambio de forma de las plaquetas de babuino con el anticuerpo
8M14.3	+++	Sí	0	0*	Sí
3F8.1	++	Sí	0	0	Sí
9E18.3	+++	Sí	0	0	Ligeramente
3J24.2	+	No	0	0	No
6E12.3	SD	SD	SD	SD	SD
1P10.2	+	Ligeramente	0	0	No
7H4.6	+++	Sí	0	0*	Ligeramente
9012.2	+	Ligeramente	0	0	No
7120.2**	0	No	0	0	No
Rápido (+++); Moderado (++); Lento (+); Retraso acortado (*); Sin determinar (SD); Control negativo (**)					

Afinidad de fijación de los anticuerpos monoclonales de ratón

- Se llevaron a cabo análisis cinéticos de diferentes anticuerpos específicos contra la GPVI utilizando la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (RPS) en el BIAcore. La proteína de fusión GPVI-Fc (el dominio extracelular de la GPVI fusionado a Fc) se conjugó covalentemente al chip sensor en 3 células de flujo con densidades superficiales diferentes. Se probaron los anticuerpos a 5 concentraciones dentro del margen de 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, 3,13 nM y 1,56 nM. Se calcularon la velocidad de asociación, la velocidad de disociación y la afinidad de la fijación con el programa informático de evaluación de BIAcore, Inc. utilizando un análisis global que modeliza las interacciones bivalentes. Antes de llevar a cabo los experimentos de cinética, se utilizó T75-Fc como un control para determinar que la fijación era específica de la parte GPVI. También se analizó la especificidad con la GPVI-his y la MT93-his, cuyos resultados muestran que la especificidad es buena. La tabla 3 que sigue resume las constantes de disociación de los anticuerpos monoclonales analizados.

Análisis de inmunotransferencia

- Las plaquetas lavadas se solubilizaron en SDS al 2% en ausencia o presencia de β -mercaptoetanol al 5% (5 min a 100 °C). Se separaron las proteínas de las plaquetas mediante electroforesis en geles planos de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Se incubaron las membranas con los anticuerpos monoclonales (2 μ g/ml en PBS, pH 8,1, que contiene SAB al 0,2% y Tween al 0,1%) solos o con colágeno durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubaron las membranas con IgG de cabra antirratón conjugados a peroxidasa (Amersham) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se detectaron las IgG mediante quimioluminiscencia (ECL Amersham) en películas X-Omat AR de Kodak.

- Los resultados resumidos en la tabla 3 que viene a continuación indican que los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares del hibridoma se fijan específicamente a la GPVI. En particular, cada uno de los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares del hibridoma recogido en la tabla 3 que se analizó reconocía una proteína de la misma masa molecular que GPVI en un gel no reductor. Además, como se espera de los anticuerpos anti-GPVI, la adición de la convulxina a la solución que contiene los anticuerpos monoclonales dio lugar a la reducción de la intensidad de la proteína marcada.

Inhibición de la fijación del colágeno y/o convulxina a la TANGO 268 humana soluble ocasionada por anticuerpos monoclonales de ratón

- Los pocillos de placas de microtitulación (Immulon II, Dynex) se cubrieron con colágeno de tipo I o de tipo III (40 μ g/ml en CH₃COOH a 20 mM) durante una noche a 4 °C. A continuación, los pocillos de las placas se saturaron con 2 mg/ml de SAB durante dos horas a temperatura ambiente. Solo o en combinación con anticuerpos (10 μ g/ml), la GPVI-Fc humana soluble (el dominio extracelular de GPVI fusionada a Fc; 5 nM en PBS, pH 7,4, que contiene SAB al 0,2% y Tween al 0,1%) se añadió a los pocillos de las placas de microtitulación y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar los pocillos de las placas de microtitulación, a los pocillos de las placas se les añadió proteína A conjugada a peroxidasa (Amersham) y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos de las placas de microtitulación y se añadió el sustrato de la

peroxidasa OPD a los pocillos de las placas. Se leyeron las placas a 495 nm en un espectrofotómetro.

Se revistieron las placas de microtitulación (Immulon II, Dynex) con un anticuerpo monoclonal que no bloquea la fijación de la convulxina a la GPVI (5 µg/ml de anticuerpo monoclonal 1P10.2 en PBS) durante una noche a 4 °C. A continuación se saturaron los pocillos de las placas con 2 mg/ml de SAB durante dos horas a temperatura ambiente.

- 5 La GPVI-Fc humana soluble (el dominio extracelular de GPVI fusionada a Fc; 5 nM en PBS, pH 7,4, que contiene SAB al 0,2% y Tween al 0,1%) se añadió a los pocillos de las placas de microtitulación, y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar los pocillos de las placas de microtitulación, se añadieron el tampón o los anticuerpos (10 µg/ml) a los pocillos de las placas, y se incubaron las placas durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió convulxina marcada con ¹²⁵I (~1 nM) a los pocillos de las placas de microtitulación, y se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar los pocillos de las placas de microtitulación, se contó la convulxina marcada con ¹²⁵I que se fijó a las placas con un contador gamma.

- 15 Los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma 4L7.3, 7H4.6, 9E18.2, 8M14.3 y 9012.2 bloquearon significativamente la fijación al colágeno de la GPVI-Fc humana soluble (figura 20; resumida en la tabla 3) en comparación con el anticuerpo de control negativo (7120.2), lo que indica que estos anticuerpos se fijan a una porción de la GPVI que fija el colágeno o que estos anticuerpos inhiben estéricamente la fijación del colágeno a la GPVI. Todos los anticuerpos monoclonales recogidos en la figura 21 y la tabla 3 que se analizaron bloquearon la fijación de la GPVI-Fc humana a la convulxina. En particular, los anticuerpos monoclonales producidos por las líneas celulares de hibridoma 3F8.1, 3J24.2, 9E18.2, 9012.2 y 4L7.3 redujeron significativamente la fijación de la GPVI-Fc humana soluble a la convulxina. Estos resultados indican que estos anticuerpos se fijan a una porción de la GPVI que se fija a la convulxina o que estos anticuerpos inhiben estéricamente la fijación del colágeno a la GPVI.

Tabla 3: Resumen de BIAcore, análisis de inmunotransferencia, y ensayos de la actividad de bloqueo

Clones y control	K _d (nM)	Análisis de inmunotransferencia	% de inhibición de fijación del colágeno a la hrGPVI	% de inhibición de fijación de la convulxina a la hrGPVI
7120.2*	210	SD	5	0
8M14.3	2,5	+++	32	12
3F8.1	1,6	+++	9	65
9E18.3	42	+++	44	42
3J24.2	55	+++	0	33
6E12.3	54	SD	0	20
IP10.2	16	+++	10	SD
4L7.3	13	SD	20	33
7H4.6	46	+++	41	19
9012.2	18	+++	58	75
Sin determinar (SD); Expresión elevada (+++); Control negativo (*); GPVI recombinante humana soluble (hrGPVI)				

B. Anticuerpos humanos neutralizantes de las plaquetas específicos de la GPVI que se han aislado de una genoteca combinatoria de exposición en bacteriófagos

- 25 A continuación se describen los anticuerpos de una sola cadena de origen humano que neutralizan la agregación plaquetaria mediante la fijación específica a la GPVI que se aislaron de una genoteca combinatoria de exposición en bacteriófagos.

Material y métodos

Selección de anticuerpos

- 30 Un repertorio no inmunitario de $1,5 \times 10^{10}$ clones independientes procedentes de linfocitos B humanos mediante PCR se visualizaron sobre la superficie de bacteriófago filamentosos como fusiones de Fv-plII de una sola cadena. Los 5×10^{12} fagos que representan este repertorio se agotaron primero en 3×10^7 células U937 que se habían transducido con el retrovirus vacío. Antes de añadir los fagos, se bloquearon estas células en una solución de bloqueo que comprende PBS, leche al 2%, SAB al 1%, PMSF a 1 mM y EDTA a 2,5 mM durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, los fagos agotados se transfirieron a 3×10^7 células U937 transducidas con retrovirus que expresan la GPVI completa que se habían bloqueado en una solución que comprende PBS y SAB al 1% (PBSB). El fago y las células que expresan la GPVI se incubaron juntos durante 2

horas en un mezclador rotatorio calefactado con una rotación suave para permitir que el fago se fijara a las células que expresaban la GPVI. Se centrifugaron las células durante 5 minutos a 500 g y se retiró el sobrenadante. Las células se lavaron una vez con una solución que comprende PBSB y Tween 20 al 0,1%, nueve veces con una solución que comprende PBS y SAB al 0,1%, y dos veces con PBS. Después de la centrifugación y la resuspensión de las células en 1,5 ml de dH_2O , se eluyeron los fagos mediante la adición gota a gota de un volumen igual de trietilamina a 200 mM. Después de una incubación de 7 minutos, se neutralizó la solución al añadirle un volumen igual de Tris-HCl a 1 M, pH 7,4.

Los fagos eluidos se sobreinfectaron en *E. coli* XL1-Blue que se había hecho crecer a $A_{600} = 0,5$ en 2YT + 10 $\mu\text{g/ml}$ de tetraciclina. A continuación, las bacterias infectadas se esparcieron en placas de bioensayo y se las dejó crecer durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, las bacterias se retiraron de las placas de bioensayo y se hicieron crecer utilizando los procedimientos estándares para generar los fagos a utilizar en la siguiente ronda de selección. Se realizaron otras tres rondas de selección mediante el procedimiento que se describió más arriba. Se midieron las titulaciones de entrada y de salida de los fagos en cada ronda para seguir el enriquecimiento de fagos específicos de la GPVI. No se observó ningún enriquecimiento adicional en la cuarta ronda de selección.

15 Caracterización de los anticuerpos:

Después de la cuarta ronda de selección, se analizó la fijación a la GPVI en 43 clones independientes. Se hicieron crecer colonias aisladas de células XL1-Blue en 0,3 ml de cultivos de 2YT + glucosa al 1% + ampicilina a 100 $\mu\text{g/ml}$ en placas de pocillos profundos a 37 °C durante 16 horas. Después se centrifugaron las placas a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Beckman ALLEGRA 6R. Se volvieron a suspender los sedimentos de *E. coli* en 0,15 ml de medio nuevo que contiene IPTG a 1 mM y MgCl_2 a 20 mM. Estos cultivos se hicieron crecer a 30 °C con agitación vigorosa durante 4 a 6 horas. Los cultivos inducidos se centrifugaron y se resuspendieron en 0,15 ml de PBS. A continuación, estos cultivos se sometieron a 6 ciclos de congelación, en un baño con hielo seco y etanol, y descongelación, en un baño de agua a 37 °C. Los scFv brutos se sometieron entonces a ELISA con células GPVI-U937, ELISA con proteínas GPVI-Fc y análisis FACS con células GPVI-U937 para analizar la fijación de GPVI.

25 ELISA con células GPVI-U937:

Las células GPVI-U937 se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en tampón de bloqueo (PBS, leche al 2% y SAB al 1%). Se añadieron 150 μl de una suspensión de células (2×10^6 células/ml) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos y la placa se agitó suavemente durante 45 minutos a temperatura ambiente (TA). Se incubaron 50 μl de scFv brutos con 50 μl de tampón de bloqueo a 2x que contenía anti-HA conjugados a biotina (dilución 1: 500, Covance, n.º de cat. Biotin-101L) a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. A continuación, esta mezcla de tampón de bloqueo y scFv brutos se añadió a los pocillos de la placa de 96 pocillos, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Las células se lavaron dos veces con una solución que comprende PBS, SAB al 0,1% y Tween 20 al 0,05%, y una vez con una solución que comprende PBS y SAB al 0,1%. Las células se incubaron después con 75 μl de HRP-ExtrAvidina (dilución 1: 1000, Sigma, n.º de cat. E-2886) en tampón de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron las células dos veces con una solución que comprende PBS y Tween 20 al 0,05% y una vez con PBS. Se centrifugaron las células y se volvieron a suspender los sedimentos celulares en 130 μl de TMB y se incubaron durante 10 minutos para permitir que se revele el color. Se centrifugaron las células y se transfirieron 100 μl de cada sobrenadante a los pocillos de una placa Falcon flexible (Falcon 3912), que se había llenado con 50 μl de H_2SO_4 a 0,5 M por pocillo. Se leyeron las placas a 450 nm.

ELISA con proteínas GPVI-Fc

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc MaxiSorp) con 50 μl de proteína GPVI-Fc a 2,5 $\mu\text{g/ml}$ disuelta en PBS. Una proteína de fusión irrelevante con Fc (Tango 75-Fc; publicación PCT de patente internacional n.º WO 99/15663, presentada el 1 de abril de 1999) se revistió de igual forma a modo de control. Las placas se sellaron y se incubaron a 4 °C durante 16 horas. Al día siguiente, se lavaron las placas cuatro veces con PBS + Tween al 0,05% y se bloquearon los pocillos con 250 μl de leche desnatada al 2% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después se le añadieron 50 μl de scFv brutos al pocillo y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora. Se lavaron las placas cuatro veces con PBS + Tween al 0,05% y se le añadieron 50 μl de anti-HA conjugado a biotina (dilución 1: 500, Covance, n.º de cat. Biotin-101L), y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación suave. Se lavaron las placas cuatro veces con PBS + Tween al 0,05% y 50 μl de TMB, y se dejó revelar el color. La reacción se paró al añadir 50 μl de H_2SO_4 a 0,5 M y se leyeron las placas a 450 nm (SpectraMax Plus, Molecular Devices).

Análisis FACS con células GPVI-U937

Se utilizaron 5×10^5 células U937 que expresan la GPVI por cada scFv. Se lavaron las células una vez con tampón de lavado (PBS frío sin Ca^{2+} , Mg^{2+} , SAB al 0,1% y azida de sodio al 0,02%), se resuspendieron en 100 μl de una solución de bloqueo (IgG humana al 2% y SAB al 1% en tampón de lavado) y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. A continuación se centrifugaron las células y se resuspendieron en 5 μg de scFv puros en 100 μl de tampón de lavado y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Se lavaron las células 3 veces con tampón de lavado, se

resuspendieron en 100 µl de anticuerpo monoclonal anti-HA (Covance, anticuerpo a 10-20 µg/ml en tampón de lavado) y se incubó a 4 °C durante 1 hora. Después se lavaron las células 3 veces con tampón de lavado y se incubaron con 100 µl de Ig antirratón marcada con FITC (anticuerpo a 20 µg/ml en tampón de lavado) a 4 °C durante 1 hora. Se lavaron las células 3 veces con tampón de lavado y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de lavado.

- 5 Entonces se analizaron las células por la fijación de scFv a GPVI con un citómetro de flujo (Becton-Dickinson). Se realizó el mismo procedimiento utilizando un scFv irrelevante como control negativo. Se analizaron todos los scFv con células U937 que simulaban transducción.

Secuenciación de anticuerpos

Los clones que se fijan a la GPVI en los ELISA con proteínas y con células se sometieron a un análisis adicional.

- 10 Primero, el gen del scFv se amplificó por PCR y el producto resultante se digirió con la enzima de restricción BstNI. Se analizó el producto digerido en un gel de agarosa al 2%. Los clones que tenían patrones de restricción únicos se secuenciaron completamente entonces mediante la química de terminador con fluoróforo.

Purificación de anticuerpos

Se expresaron anticuerpos de una sola cadena en *E. coli* ligando primero el fragmento Sfil, que contiene el gen del scFv del vector de exposición en bacteriófagos pDISP4, en el vector de expresión denominado pDISP4-His. Se utilizaron colonias aisladas de células Top10 (Invitrogen) para inocular cultivos de 40 ml de 2YT + glucosa al 1 % + 100 µg/ml de ampicilina que se hicieron crecer en matraces de 500 ml a 37 °C durante 16 horas. Después se centrifugaron las células de *E. coli* a 3000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Beckman ALLEGRA 6R y se resuspendieron en un volumen igual de medio recién preparado con IPTG a 1 mM y MgCl₂ a 20 mM. Estos cultivos se hicieron crecer a 30 °C durante 4 a 6 horas, tras lo cual se recogieron las bacterias por centrifugación.

- Los sedimentos bacterianos se resuspendieron en 2 ml de tampón de fijación (fosfato de sodio a 50 mM + NaCl a 300 mM + imidazol a 10 mM, pH 8,0) con PMSF a 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas (Boehringer Mannheim) y se sometieron a 6 ciclos de congelación/descongelación utilizando un baño de etanol con hielo seco y un baño de agua a 37 °C. A continuación se centrifugaron las bacterias brevemente y se rescató el sobrenadante. Este material se cargó entonces en columnas Ni-NTA QuickSpin (Qiagen) y el scFv etiquetado con la cola de poli-His se iba capturando mientras que las proteínas contaminantes fluían por la columna. La proteína fijada se lavó en dos etapas con tampón de fijación + imidazol a 20 mM y 35 mM. Finalmente, se eluyó la proteína en tampón de fijación + imidazol a 250 mM. Se recogieron 2 fracciones de 100 µl por cada cromatografía. Estas fracciones se agruparon y se dializaron frente a PBS. Se comprobó la pureza del scFv mediante SDS-PAGE y tinción con Coomassie (Novex). Se determinó el rendimiento del scFv mediante la A₂₈₀ con un factor de 0,7 mg/ml de scFv por cada unidad de absorbancia.

Ensayos de inhibición

- Las células U937 que expresan la GPVI («células GPVI-U937») se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron a 2×10^6 células/ml con tampón de bloqueo (PBS, leche al 2%, y SAB al 1%). Se bloquearon las células en placas de 96 pocillos a temperatura ambiente durante 45 minutos. Se centrifugaron las células a 500g durante 5 minutos y se diluyeron 25 µl de la proteína GPVI-Fc purificada en 25 µl de tampón de bloqueo mezclado con 25 µl de scFv. La concentración final de GPVI-Fc varió de 0,45 nM a 1000 nM, mientras que la concentración del scFv se fijó a 100 nM. Se dejó que la fijación tuviera lugar a temperatura ambiente durante 2 horas con adición suave. Después, las células se lavaron dos veces con una solución que comprende PBS, SAB al 0,1% y Tween 20 al 0,05% y una vez con una solución que comprende PBS y SAB al 0,1%. Se les añadieron 50 µl de anticuerpo anti-HA conjugado a biotina (dilución 1: 1000, Covance n.º BIOTIN 101L) y se incubaron las células a temperatura ambiente durante 1 hora. Las células se lavaron como se ha descrito más arriba y se incubaron con 50 µl de HRP-ExtrAvidina (dilución 1: 1000, Sigma, n.º de cat. E-2886) en tampón de bloqueo durante 45 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células dos veces en una solución que comprende PBS y Tween 20 al 0,05%, y una vez con PBS, los sedimentos celulares se resuspendieron en TMB a 110 µl y se revelaron durante 10 minutos. Se centrifugaron las células como anteriormente y se transfirieron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo a placas Falcon nuevas (Falcon 39128) que se acababan de rellenar con 50 µl por pocillo de H₂SO₄ a 0,5 M. Se leyeron las placas a 450 nm.

Bloqueo de la fijación de GPVI-Fc al colágeno o a la convulxina

- Placas de microtitulación (ImmulonII, Dynex) se recubrieron con colágeno de tipo I o de tipo III (40 µg/ml en CH₃COOH a 20 mM) durante una noche a 4 °C y luego se saturaron con SAB a 2 mg/ml durante dos horas a temperatura ambiente. A los pocillos de la placa de microtitulación se les añadió la GPVI-Fc humana soluble (5 nM en PBS, pH 7,4, que contiene SAB al 0,2% y Tween al 0,1%) en ausencia o presencia de anticuerpos (10 µg/ml) y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar los pocillos, se añadió proteína A conjugada a peroxidasa (Amersham) a los pocillos y se incubaron las placas durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió el sustrato de la peroxidasa y se midió la DO a 495 nm.

Placas de microtitulación (ImmulonII, Dynex) se recubrieron con anticuerpo monoclonal 1P10.2 (5 µg/ml en PBS) durante una noche a 4 °C y luego se saturaron con SAB a 2 mg/ml dos horas a temperatura ambiente. La GPVI-Fc humana soluble (0,5 nM en PBS, pH 7,4, que contiene SAB al 0,2% y Tween al 0,1%) se añadió a los pocillos de la

placa y se incubó la placa durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar los pocillos, se añadió el tampón o los anticuerpos (10 µg/ml) a los pocillos, y se incubaron las placas durante una hora a temperatura ambiente. A continuación se añadió la convulxina marcada con ¹²⁵I (~1 nM) a los pocillos, y se incubaron las placas durante 10 minutos aproximadamente. Se lavaron los pocillos y se contó la ¹²⁵I-convulxina fijada en un contador gamma.

Agregación de plaquetas

PRP (plasma rico en plaquetas) y PPP (plasma pobre en plaquetas) humanos de sangre completa. Se recogió sangre completa en un tubo con ACD (de VWR) y se obtuvo el PRP mediante centrifugación a 900 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el PRP con una pipeta de polipropileno a un tubo de polipropileno. Se centrifugó la sangre restante a 3400 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener el PPP, y se transfirió el PPP a un nuevo tubo.

Se preincubaron 300 µl de PRP con concentraciones diferentes de los scFv de A10, B4, C9, C10 o A9 durante 5 o 6 minutos a temperatura ambiente y, luego, se añadió colágeno (el reactivo de colágeno Horm que contiene 1 mg/ml de fibrillas de colágeno nativas de tipo I de tendones equinos se adquirió a NYCOMED ARANEIMITTEL GmbH, Alemania). Se midió la agregación de PRP en una cubeta con agrometría AG-10E de KOWA.

Resultados:

Las titulaciones de los fagos en cada ronda de selección se muestran en la figura 22. Después de cuatro rondas de selección, la titulación del fago inoculado permaneció relativamente constante, mientras que la titulación del fago eluido de las células U937 que expresan la GPVI aumentó en un factor de más de 500. Esto sugiere que se ha enriquecido el fago específico de la GPVI.

Se picaron 43 clones independientes después de la cuarta ronda de selección y se les analizó su capacidad para fijarse específicamente a la GPVI mediante ELISA con células y ELISA con proteínas. La figura 23A muestra 28 de estos scFv fijados específicamente a GPVI en las células U937 en comparación con las células que simulan la transducción. Estos clones también se fijaron específicamente a GPVI-Fc purificada en los ELISA en comparación con una proteína de control (figura 23B). Estos resultados sugieren que los scFv son realmente específicos de la GPVI.

La huella genética de BstNI de los 28 clones positivos se muestra en la figura 24. Se encontraron siete clones únicos en el conjunto. Los siete clones reconocieron la GPVI en las células transducidas en un experimento de FACS (figura 25). Las secuencias de las CDR de los scFv se muestran en la tabla 7 que aparece más adelante.

Se purificaron los siete scFv únicos mediante cromatografía de quelato de níquel. La figura 26 muestra la pureza y el rendimiento de los scFv a juzgar por la tinción de Coomassie y el SDS-PAGE.

La figura 27 muestra los datos sobre la inhibición de tres scFv anti-GPVI (A10, B4 y C3) utilizando GPVI-Fc soluble. La proteína GPVI-Fc inhibió específicamente a los scFv analizados. La constante de inhibición (CI₅₀) para los clones de scFv A10, B4 y C3 se determinó que era 4,5 nM, 5 nM y 38 nM, respectivamente.

Se analizaron los cuatro scFv específicos de la GPVI y un anticuerpo de control por su capacidad para bloquear la fijación de la GPVI-Fc humana soluble a colágeno o convulxina. Los scFv 4L7.3, 7H4.6, 9E18.2 y 912.2 bloquearon significativamente la fijación de la GPVI-Fc humana soluble al colágeno en comparación con el anticuerpo de control. Los scFv 3F8.1, 3J24.2, 4L7.3, 9E18.2 y 912.2 bloquearon la fijación del GPVI-Fc humano soluble recombinante a la convulxina en más del 25% en comparación con el anticuerpo irrelevante de control.

Se determinó la capacidad que los scFv A10, B4, C9, C10 y A9 tenían para bloquear la agregación plaquetaria inducida por el colágeno. Los resultados muestran que 110 µg/ml de A10 y 140 µg/ml de B4 pueden bloquear la agregación plaquetaria inducida por 2 µg/ml de colágeno, pero que 160 µg/ml de A9, C9 o C10 no pudieron bloquear la agregación plaquetaria inducida por colágeno a 2 µg/ml. Estos resultados sugieren que los scFv A10 y B4 son agentes bloqueantes de la agregación plaquetaria inducida por el colágeno.

C. Método para generar anticuerpos humanos

Ratones HuMAb-Mouse™ (Medarex, Annandale, NJ) que expresan la Ig humana se inmunizaron por vía intraperitoneal con la proteína de fusión GPVI-Ig a 20 µg/ratón en adyuvante completo de Freund. Se repitió la inmunización tres veces más a intervalos de 14 días con 10 µg/ratón de la proteína de fusión en adyuvante incompleto de Freund. Dos semanas después de la última inmunización, a los ratones se les dio 30 µg de la proteína de fusión de GPVI soluble por vía intravenosa y cuatro días después se llevó a cabo la fusión utilizando esplenocitos de los ratones inmunizados, mediante los métodos descritos previamente (Coligan et al. (eds), *Current Protocols in Immunology*, página 2.5.1, John Wiley and Sons, Nueva York 1992).

Se identificaron los anticuerpos anti-GPVI mediante ELISA estándar con las modificaciones siguientes: las placas se revistieron con la proteína de fusión GPVI-Ig a 2 µg/ml en PBS durante una noche y se bloquearon con una solución

que comprende PBS y SAB al 1% a 37 °C durante 2 horas. Se añadieron los sobrenadantes del cultivo de tejido en placas de ELISA, y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación se lavaron las placas 4 veces en una solución que comprende PBS y Tween 20 al 0,01%. Se utilizó un anticuerpo contra la cadena ligera κ humana (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido, n.º de catálogo AP015) conjugado a peroxidasa para detectar los anticuerpos humanos fijados. Se transfirieron los pocillos teñidos positivamente para la caracterización adicional mediante citometría de flujo.

Las células transfectadas con GPVI se incubaron con 50 μ l de sobrenadante en hielo durante 30 minutos. Los anticuerpos fijados se detectaron con Ig antihumano para teñir tanto IgG como IgM e IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, n.º de cat: 115-096-151) o con un anticuerpo secundario específico contra γ para teñir sólo IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, n.º de cat: 115-096-008). Se analizaron los resultados mediante un FACScan (Becton-Dickinson).

D. Capacidad de los scFv y de los anticuerpos monoclonales para impedir que la GPVI se fije al colágeno

Se seleccionaron los anticuerpos por su capacidad para bloquear la fijación de la GPVI al colágeno mediante un ensayo inmunohistoquímico desarrollado a partir de los procedimientos descritos previamente (Tonra y Mendell, 1987, *Journal of Neuroimmunology* 80: 97-105).

Material y métodos

Preparación de las muestras:

Los ratones SJL/J sin tratar de 8 a 12 semanas de edad se anestesiaron con una inyección por vía intraperitoneal de 125 mg de avertina (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI) por kilogramo de masa corporal. A continuación se expuso el corazón y los ratones se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con 3 ml de solución salina que contenía 2500 UI de heparina (Steris Laboratories, Inc., Phoenix, AZ) por litro de solución. A esto le siguió una perfusión de 5 ml de fijador que contenía paraformaldehído (Sigma, St. Louis, MO) al 2% y ácido pícrico saturado (Sigma) al 15% en tampón de fosfato a 0,1 M, pH 6,9. Se diseccionó la aorta descendente y se fijó posteriormente durante 1,5 horas en el mismo fijador a temperatura ambiente. A continuación, la aorta descendente se puso a 4 °C durante una noche en sacarosa al 25% más azida al 0,008% (Sigma). La solución de sacarosa se cambió después de 12-24 horas y se incubó el tejido a 4 °C durante otras 24-48 horas en sacarosa al 25% más azida al 0,008%. Después se congeló la aorta descendente en Tissue Tek OCT (Sakura; Tokyo, Japón). Se cortaron secciones transversales congeladas de 12 μ m de la aorta descendente mediante un criostato (Microm, VWR, West Chester, PA) sobre portaobjetos de microscopio Superfrost Plus (VWR) revestidos con poli-L-lisina (3 mg/ml; Sigma). Los portaobjetos se guardaron a -80 °C hasta que se tiñeron.

Tinción del tejido:

Los portaobjetos que contienen las secciones de la aorta descendente se colocaron a 37 °C durante 6 minutos y, luego, las secciones de tejido se rodearon con la sustancia hidrófoba contenida en un rotulador PAP (RPI, Mount Prospect, IL). Después se lavaron los portaobjetos 2 veces, cada una de 7,5 minutos, en tampón de fosfato al 0,1 M, pH 6,9 (PB). Entonces se incubaron las secciones durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución combinada, bordeada por los márgenes hidrófobos rotulados, que contiene una dilución de 1:50 de suero de burro normal (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) diluido con PBX. El PBX se fabrica añadiendo 300 μ l de Triton X-100 (Sigma) a 100 ml of PB a 0,1 M. A continuación se lavaron los portaobjetos tres veces, cada una de 10 minutos, en PB a 0,1 M. Después se incubaron las secciones durante una noche a 4 °C con la GPVI humana conjugada a la Fc humana (lote HT268CO2 fabricado en Millennium Pharmaceuticals, Inc.; 0,1 μ g/ml diluidos con PBX). Luego se lavaron los portaobjetos tres veces, cada una de 10 minutos, en PB a 0,1 M. Entonces se incubaron las secciones en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente con un anticuerpo de burro conjugado a fluoresceína FITC o a rodamina RedX (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) que reconoce la Fc humana (2 μ g/ml). A continuación se lavaron los portaobjetos tres veces, cada una de 10 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, los portaobjetos se cubrieron con portaobjetos utilizando Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se observaron en un microscopio de fluorescencia los sitios de fijación de la GPVI a las secciones de la aorta descendente de ratón. La gran mayoría de la fijación de la GPVI estaba localizada en la capa adventicia de la aorta descendente de ratón en todas las secciones, con una marcación menor entre la lámina elástica en algunas secciones.

Validación del ensayo:

La fijación observada de la GPVI humana conjugada a la Fc humana en las secciones de la aorta descendente de ratón en el ensayo descrito más arriba se demostró que se debía a la GPVI humana y no a la Fc humana, al demostrar que otras dos proteínas de control negativo, la neurotactina humana y la TANGO 75 de ratón (publicación PCT de patente internacional n.º WO 99/15663, presentada el 1 de abril de 1999) conjugadas a la Fc humana, no mostraban fijación a las secciones de la aorta de ratón. Además, la conclusión de que la GPVI humana se fijaba al colágeno estaba apoyada por la colocalización de la fijación de la GPVI y la inmunorreactividad del colágeno de tipo III en la capa adventicia, utilizando un anticuerpo generado contra el colágeno humano de tipo III (RDI, Flanders, NJ). Además, la localización del colágeno de tipo III a la capa adventicia en la aorta de ratón es idéntica a la descrita

para el colágeno de tipo III en la arteria coronaria humana normal (Henrita van Zanten et al., 1993, *Journal of Clinical Investigation* 93: 615-632).

Ensayo para la capacidad de bloqueo:

- 5 Para evaluar la capacidad de bloqueo que tienen los anticuerpos monoclonales de ratón o los scFv contra la fijación de la GPVI al colágeno, la solución que contiene la GPVI humana conjugada a la Fc humana descrita más arriba (0,1 µg/ml diluidos con PBX) se preincubó con 10 µg/ml del reactivo de revelado durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se colocó esta solución sobre las secciones de la aorta descendente durante una noche y se comparó la señal fluorescente resultante con la tinción de control obtenida cuando un reactivo sin relacionar con la GPVI o el vehículo (solución salina tamponada de fosfato) se preincubó con la GPVI humana conjugada a la Fc humana.
- 10 La capacidad para bloquear la fijación de la GPVI se graduó como ningún bloqueo (-), bloqueo bajo (+), bloqueo medio (++) , bloqueo medio/alto (+++) o bloqueo completo (++++). Se validó el ensayo al demostrar que un anticuerpo monoclonal contra la neurotactina (5a11) y una Fv monocatenaria específica de ICOS no eran capaces de bloquear la fijación de la GPVI humana conjugada a la Fc humana al colágeno de ratón en las secciones de la aorta descendente.

15 *Resultados*

La tabla 4 que sigue resume la capacidad de los anticuerpos monoclonales o scFv de ratón que se incluyen para bloquear la fijación de la GPVI humana conjugada a la Fc humana al colágeno de ratón utilizando el ensayo descrito más arriba.

Tabla 4

Nombre	Anticuerpo o scFv	Capacidad para inhibir la fijación de la GPVI
7120.2	Anticuerpo monoclonal	-
8M14.3	Anticuerpo monoclonal	+
3F8.1	Anticuerpo monoclonal	++++
9E18.3	Anticuerpo monoclonal	++
3J24.2	Anticuerpo monoclonal	++++
6E12.3	Anticuerpo monoclonal	++++
IP10.2	Anticuerpo monoclonal	++++
4L7.1/3	Anticuerpo monoclonal	+
7H4.6	Anticuerpo monoclonal	+
9012.2	Anticuerpo monoclonal	++++
7H14.1	Anticuerpo monoclonal	-
9E18.2	Fv de una sola cadena	-
A9	Fv de una sola cadena	-
A10	Fv de una sola cadena	++++
C9	Fv de una sola cadena	-
A4	Fv de una sola cadena	+
C10	Fv de una sola cadena	+
B4	Fv de una sola cadena	++++
C3	Fv de una sola cadena	+++
D11	Fv de una sola cadena	++++
Ningún bloqueo (-), bloqueo bajo (+), bloqueo medio (++) , bloqueo medio/alto (+++) o bloqueo completo (++++)		

Usos de los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus polipéptidos y sus moduladores

Como la TANGO 268 se encontraba originalmente en una genoteca de megacariocitos, y a la luz del hecho de que en la presente memoria se ha demostrado que la TANGO 268 es la GPVI, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular la proliferación, morfología, migración, diferenciación y/o función de los megacariocitos y de las plaquetas, incluso durante el desarrollo, p. ej., la embriogénesis. También se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular las interacciones entre leucocitos y plaquetas, y entre plaquetas y endotelio, durante la inflamación y/o la trombosis. Además, los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores se pueden utilizar para modular la agregación y la desgranulación de las plaquetas. Por ejemplo, antagonistas de la acción de TANGO 268, tales como péptidos, anticuerpos o moléculas pequeñas que disminuyen o bloquean la fijación de TANGO 268 a los componentes de la matriz extracelular (p. ej., colágeno o integrinas), o anticuerpos que impiden la señalización de la TANGO 268, se pueden utilizar como bloqueantes de la agregación y de la liberación del colágeno o de las plaquetas. En un ejemplo específico, se puede utilizar un polipéptido que comprende el dominio extracelular de TANGO 268 para disminuir o bloquear la fijación de TANGO 268 a los componentes de la matriz extracelular (a saber, colágeno), o para impedir la agregación plaquetaria. En otro ejemplo, los agonistas que imitan la actividad de la TANGO 268, tales como péptidos, anticuerpos o moléculas pequeñas, se pueden utilizar para inducir la liberación y la agregación de las plaquetas.

A la luz también del hecho de que la TANGO 268 representa la GPVI, y de que su expresión está limitada a las células de la línea de los megacariocitos, los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores se pueden utilizar para modular los trastornos asociados a la proliferación, diferenciación, morfología, migración, agregación, desgranulación y/o funcionamiento anómalos o aberrantes de los megacariocitos y/o de las plaquetas. Ejemplos de estos trastornos incluyen, pero sin limitarse a ellos, trastornos hemorrágicos (p. ej., propensión a las hemorragias y/o tiempo de hemorragia prolongado) tales como trombocitopenia (p. ej., púrpura trombocitopénica idiopática [PTI] o trombocitopenia inmunitaria o trombocitopenia inducida por la quimioterapia o la radioterapia).

Como la TANGO 268 representa la GPVI, y la GPVI es un componente de los procesos que implican la fijación de las plaquetas al subendotelio vascular, la activación de las plaquetas y los procesos de inflamación, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular los trastornos tromboticos (p. ej., oclusión trombotica de las arterias coronarias), los trastornos hemorrágicos, las enfermedades que muestran una disfunción cuantitativa y cualitativa de las plaquetas, y las enfermedades que muestran disfunción endotelial (endotelopatías). Estas enfermedades incluyen, pero sin limitarse a ellas, enfermedades de la arteria coronaria y de la arteria cerebral. Además, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular las enfermedades cerebrovasculares, que incluyen el accidente cerebrovascular y la isquemia, enfermedades de tromboembolia venosa (p. ej., enfermedades que implican hinchazón, dolor y úlcera de la pierna, embolia pulmonar, trombosis venosa abdominal), microangiopatías tromboticas, púrpura vascular y deficiencias de la GPVI como las descritas en, p. ej., Moroi y Jung, 1997, *Thrombosis and Haemostasis* 78: 439-444. Se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular los síntomas asociados a trastornos y/o enfermedades de la plaquetas (p. ej., trastornos hemorrágicos). En particular, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular los síntomas asociados a la PTI, tales como púrpura y problemas hemorrágicos graves.

Como se ha demostrado que la GPVI es importante para la adhesión y la agregación de las plaquetas, y que la adhesión y la agregación de las plaquetas intervienen decisivamente en las enfermedades coronarias agudas, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular enfermedades coronarias (por ejemplo, enfermedades cardiovasculares que incluyen angina de pecho inestable, infarto de miocardio, infarto de miocardio agudo, arteriopatía coronaria, revascularización coronaria, reestenosis coronaria, tromboembolia ventricular, aterosclerosis, arteriopatías coronarias (p. ej., trastornos oclusivos arteriales), formación de placas, isquemia cardíaca, que incluye las complicaciones relacionadas con los procedimientos coronarios, tales como procedimientos de angioplastia de la arteria coronaria percutánea [angioplastia con balón]). Con respecto a los procedimientos coronarios, se puede conseguir tal modulación a través de la administración de moduladores de la GPVI antes, durante o después del procedimiento. En una realización preferente, tal administración se puede utilizar para prevenir la isquemia cardíaca aguda después de la angioplastia.

Por lo tanto, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular trastornos ocasionados por alguna lesión de vasos sanguíneos que acabe dando lugar a la agregación plaquetaria. Tales lesiones de vasos sanguíneos incluyen, pero sin limitarse a ellas, lesión a la pared del vaso, tales como lesiones de vaso que dan lugar a la exposición de una superficie muy trombógena en el interior de un vaso sanguíneo que, de no lesionarse, hubiera permanecido intacto, p. ej., lesiones de la pared del vaso que dan lugar a la liberación de ADP, trombina y/o epinefrina, estrés de cizalla por líquidos que se produce en el sitio de estrechamiento del vaso, rupturas y/o desgarros en los sitios de las placas ateroscleróticas, y lesión que es resultado de la angioplastia con balón o la aterectomía.

Preferentemente, los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores (p. ej., anticuerpos anti-TANGO 268) no afectan a la adhesión inicial de las plaquetas a la superficie del vaso, ni efectúan tal adhesión en

una relativamente menor medida que el efecto sobre la agregación entre las propias plaquetas, p. ej., agregación desregulada entre plaquetas, que sigue a la adhesión de plaquetas inicial. Además, en algunas realizaciones se prefiere que los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores (p. ej., anticuerpos anti-TANGO 268) no afecten a otros atributos o funciones de las plaquetas, tales como el cambio de forma de las plaquetas inducido por los agonistas (por ejemplo, aglutinación de las plaquetas mediada por la GPIb-vWF inducida por la ristocetina), la liberación de los componentes granulares internos de las plaquetas, la activación de las vías de transducción de señales o la inducción de la movilización del calcio durante la activación de las plaquetas.

Además, los polimorfismos asociados con determinados alelos de TANGO 268, tales como los de la glucoproteína la/IIa receptora de las plaquetas que están relacionadas con el riesgo de enfermedad coronaria (véase, p. ej., Moshfegh et al., 1999, *Lancet* 353: 351-354), se pueden utilizar como un marcador para diagnosticar la función coronaria anómala (p. ej., enfermedades coronarias tales como el infarto de miocardio, la aterosclerosis, arteriopatía coronaria, formación de placas).

A la luz del hecho de que la TANGO 268 es la GPVI, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular los trastornos asociados a la transducción de señales anómala en respuesta al colágeno o a otras proteínas de la matriz extracelular.

Además de lo anterior, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular los trastornos relacionados con los niveles anómalos de expresión y/o actividad de TANGO 268 tanto en las células que normalmente expresan la TANGO 268 como en las células que no expresan la TANGO 268. Por ejemplo, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular los trastornos relacionados con la expresión anómala de TANGO 268 en las células cancerosas (p. ej., tumor) que normalmente no expresan la TANGO 268. Tales trastornos pueden incluir, por ejemplo, los asociados con la migración de las células tumorales y la progresión a metástasis.

A la luz del hecho de que se ha demostrado que la TANGO 268 (a saber, la GPVI) interacciona con el colágeno, y de que ha demostrado que la progresión, migración y metástasis de las células cancerosas se correlaciona con la adhesión de las células cancerosas al colágeno intersticial (véase, p. ej., Martin et al., 1996, *Int. J. Cancer* 65: 796-804), la expresión anormal y/o atípica de TANGO 268 (p. ej., expresión de TANGO 268 en las células, tales como las células tumorales, que no la expresan normalmente o un aumento de la expresión de TANGO 268 en las células que normalmente la expresan) se puede utilizar como un marcador de la progresión, migración y metástasis de las células cancerosas. En particular, se puede utilizar la expresión anormal y/o atípica de TANGO 268 como un marcador para la progresión, migración y metástasis del cáncer de colon y del cáncer de hígado.

A la luz de que TANGO 268 presenta homología con el receptor inhibitorio de los monocitos humano, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para mediar la disminución de la activación celular a través de fosfatasa. A la luz de que TANGO 268 contiene dos dominios de tipo Ig, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular las funciones inmunorreguladoras. Además, como la TANGO 268 se expresa en hígado, embrión, médula ósea y sangre periférica, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para tratar trastornos de estas células, tejidos u órganos, p. ej., trastornos hepáticos y trastornos inmunitarios.

TANGO 268 se expresa sobre la superficie de las plaquetas. Como tal, se convierte en una diana celular y terapéutica de los moduladores de TANGO 268 (p. ej., anticuerpos anti-TANGO 268) de acceso fácil para las pruebas y los análisis (p. ej., pruebas y análisis *in vitro*). Esto junto con la disponibilidad de varios ensayos de plaquetas relevantes diferentes (véase más adelante) proporciona una oportunidad de desarrollo de fármacos inusual para los moduladores de TANGO 268. Por ejemplo, la caracterización farmacodinámica *in vivo* de los moduladores de TANGO 268 se puede ver facilitada al disponerse de diferentes ensayos de plaquetas (p. ej., prolongación del tiempo de hemorragia, medición cuantitativa del bloqueo del receptor TANGO 268, inhibición de la agregación plaquetaria *ex vivo*) que se pueden correlacionar unos con otros para permitir una evaluación más eficaz de las consecuencias funcionales de un modulador. Por lo tanto, la correlación que pueda existir entre tales ensayos garantiza que la caracterización *in vitro* de un modulador de TANGO 268 se aplique más directamente a la medición del efecto terapéutico del modulador.

Además de utilizar la disponibilidad de las plaquetas y de los ensayos de plaquetas para evaluar la eficacia terapéutica, incluida la eficacia clínica, de un modulador de TANGO 268, también se puede utilizar esta disponibilidad para los aspectos de desarrollo preclínico de fármacos tales como determinar la respuesta a la dosis del modulador, toxicología, magnitud del efecto (por ejemplo, magnitud del efecto inicial y magnitud de la duración del efecto), función, especificidad (p. ej., especificidad con respecto a determinadas funciones de las plaquetas), especificidad del receptor y especificidad de la especie (que, a su vez, puede identificar modelos de animales apropiados para los estudios de farmacología).

También se pueden utilizar los moduladores de TANGO 268 de la agregación plaquetaria, p. ej., para procedimientos *ex vivo*, p. ej., inhibición *ex vivo* de la agregación plaquetaria.

Ensayos para la detección de la expresión o de la actividad de TANGO 268

Se puede detectar fácilmente la expresión de TANGO 268, por ejemplo, mediante la cuantificación de la proteína y/o del ARN de TANGO 268. Por esta razón se pueden emplear muchos métodos estándares en la técnica que incluyen, pero sin limitarse a ellos, inmunoensayos para detectar y/o visualizar la expresión génica (por ejemplo, análisis de inmunotransferencia, inmunoprecipitación seguida por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio [SDS-PAGE], inmunocitoquímica, etc.) y/o ensayos de hibridación para detectar la expresión génica mediante la detección y/o exposición, respectivamente, del ARNm que codifica un gen (p. ej., método de transferencia Northern, transferencias puntiformes, hibridación *in situ*, etc.), etc. Los ensayos de fijación a ligando, tales como los descritos más arriba, se pueden realizar para valorar el funcionamiento de TANGO 268.

- La actividad de una proteína TANGO 268 se puede medir mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la actividad de una proteína TANGO 268 se puede analizar tratando con colágeno o con convulxina las plaquetas o las células transfectadas con TANGO 268 y midiendo el efecto de tal tratamiento sobre el nivel de fosforilación de las tirosinas de las moléculas de señalización, tales como FcR γ , Syk y PLC γ 2 (p. ej., la fosforilación de las tirosinas se puede detectar mediante inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE, ensayos cinásicos, etc.). La actividad de una proteína TANGO 268 también se puede analizar midiendo los cambios de concentración de Ca²⁺ intracelular libre que se induce por el tratamiento con colágeno o con convulxina de plaquetas o de las células transfectadas con TANGO 268. Brevemente, las células transfectadas con TANGO 268 o las plaquetas se incuban con fluorescencia fura-2 a 37 °C y luego se incuban con CaCl₂ a 2 mM antes de incubarse con convulxina, colágeno o trombina (una sustancia que no activa la TANGO 268). Se lisan las células en tampón de lisis y se mide la concentración de Ca²⁺ intracelular libre mediante fluorescencia a 37 °C con un espectrofotómetro (véase, p. ej., Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. of Biol. Chem.* 272: 27035-27041).

- La actividad de una proteína TANGO 268 también se puede analizar mediante un ensayo de adhesión de plaquetas. Brevemente, el ensayo de adhesión se realiza como sigue: se incuban plaquetas marcadas con ⁵¹Cr en placas de microtitulación en cuyos pocillos se han inmovilizado colágeno, convulxina o SAB, se lavan las células, se añade SDS al 2% a cada pocillo, y se determina el número de plaquetas adherentes mediante el recuento de ⁵¹Cr en un contador de centelleo (véase, p. ej., Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. of Biol. Chem.* 272: 27035-27041). Además, se puede analizar la actividad de una proteína TANGO 268 mediante ensayos de agregación de plaquetas o ensayos de secreción conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Moroi et al., 1989, *J. Clin. Invest.* 84: 1440-1445 y Poole et al., 1997, *EMBO J.* 16(9): 2333-2341). Brevemente, la agregación plaquetaria se realiza como sigue: se incuban las plaquetas con colágeno o convulxina en una cubeta a 37 °C al tiempo que se agita, y se sigue la marcha de la suspensión celular mediante un lumiagregómetro.

Tales ensayos se pueden utilizar como parte de los ensayos diagnósticos de TANGO 268. Además, tales ensayos se pueden utilizar como parte de los métodos de detección para identificar compuestos que modulan la actividad y/o la expresión de TANGO 268.

Ensayos para la función de TANGO 268

- La función de una proteína TANGO 268 se puede analizar en ratones mortalmente irradiados trasplantándoles células hematopoyéticas modificadas genéticamente para que expresen la TANGO 268 o un control. El efecto de la expresión de TANGO 268 sobre la función, el desarrollo y la proliferación de las células hematopoyéticas, específicamente las plaquetas, se puede determinar al comparar los ratones trasplantados con células hematopoyéticas que expresan TANGO 268, con los ratones trasplantados con células hematopoyéticas que expresan un control. Por ejemplo, la función de TANGO 268 en la agregación plaquetaria se puede analizar trasplantándoles a los ratones células hematopoyéticas modificadas genéticamente para que expresen TANGO 268 o fragmentos de la misma. Los ratones irradiados pueden ser normales, transgénicos o genosuprimidos, y las células hematopoyéticas se pueden obtener de ratones normales, transgénicos o genosuprimidos.

- La eficacia de utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas o sus moduladores para modular la expresión de un gen determinado se puede analizar con ratones irradiados trasplantados con células hematopoyéticas que se han modificado genéticamente para que expresen TANGO 268 o sus moduladores. El efecto de los ácidos nucleicos de TANGO 268, de sus proteínas o de sus moduladores sobre la expresión de un gen de interés se puede medir analizando los niveles de ARN o de la proteína del gen de interés. Se pueden utilizar las técnicas conocidas por los expertos en la técnica para medir los niveles del ARN y de la proteína *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, se puede detectar la expresión del ARN *in vivo* mediante hibridación *in situ*. Además, la eficacia de utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas o sus moduladores para tratar, inhibir o prevenir una enfermedad o trastorno particular se puede analizar con ratones irradiados o con modelos de rata de una enfermedad o trastorno trasplantados con células hematopoyéticas modificadas genéticamente para que expresen TANGO 268 o sus moduladores.

Ensayos para el análisis de los moduladores de TANGO 268

Se pueden utilizar numerosos ensayos para analizar una proteína TANGO 268, su ácido nucleico o su modulador. Tales ensayos pueden incluir ensayos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*, como los descritos en la presente memoria. Véase, también, Loscalzo y Schaefer (eds), 1998, «Thrombosis and Hemorrhage», 2.ª edición, capítulo 16, Williams and Wilkins: Baltimore, Maryland; Horton (ed), 1995, «Adhesion Receptors as Therapeutic Targets», capítulo 15, CRC

Press, Inc., Londres, Reino Unido; y la patente de los Estados Unidos n.º 5 976 532.

Por ejemplo, en vista del hecho de que TANGO 268 es un receptor de la superficie celular, en particular, un receptor plaquetario, se pueden utilizar estudios de fijación cuantitativa estándares para medir la fijación del modulador a las plaquetas. Horton (ed), 1995, *Adhesion Receptors as Therapeutic Targets*, capítulo 15, CRC Press, Inc., Londres, Reino Unido. Tales ensayos de fijación también se pueden utilizar para realizar estudios de bloqueo del receptor para medir el número de sitios celulares disponibles para la fijación del modulador, al comparar el número de moléculas de modulador marcadas (por ejemplo, anticuerpos anti-TANGO 268 marcados) fijadas por plaqueta a una serie de concentraciones con el número de moléculas de modulador fijadas a saturación. Véase, por ejemplo, Collier et al., 1985, *J. Clin. Invest.* 76: 101 o la patente de los EE. UU. n.º 5 854 005.

- 10 La reversibilidad de la fijación de la molécula moduladora (por ejemplo, anticuerpos anti-TANGO 268) a las plaquetas también se puede analizar utilizando, p. ej., técnicas tales como las descritas en Collier et al., 1985, *J. Clin. Invest.* 76: 101, y la patente de los EE. UU. n.º 5 976 532. Además, en condiciones no competitivas, la velocidad de disociación del modulador se puede valorar mediante, por ejemplo, análisis de citometría de flujo de las plaquetas cuando las plaquetas recubiertas con el modulador marcado con fluorescencia (por ejemplo, anticuerpos anti-TANGO 268) se mezclan con un número igual de plaquetas sin tratar y se incuban a temperatura fisiológica. En los casos en los que hay una reversibilidad apreciable, se está indicando que el efecto inhibitorio de una única inyección *in vivo* puede tener una vida relativamente corta, lo que sugiere que lo que sería más eficaz es una posología de administración que implique un bolo inicial seguido de la infusión continua.

- 20 También se pueden utilizar los ensayos *in vitro* y *ex vivo* de inhibición de la agregación plaquetaria. Tales ensayos los conocen bien los expertos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a él, el método de turbidimetría, en el que se mide la agregación como un aumento de la transmisión de la luz visible a través de una suspensión de plaquetas en agitación o removidas. Véase, por ejemplo, Chanarin, L., 1989, *Laboratory Haematology*, capítulo 30, Churchill, Livingstone, Londres; y Schmidt, R. M. (ed), 1979, *CRC Handbook Series in Clinical Laboratory Science*, CRC Press, Inc., Boca Ratón, Florida.

- 25 La agregación plaquetaria también se puede ensayar por medio de métodos tales como los descritos en la patente de los EE.UU. n.º 5 976 532. Por ejemplo, en un ejemplo no limitante de tal método, la concentración de plaquetas en el plasma rico en plaquetas (PRP) obtenido de muestras de sangre normales o de paciente se ajusta de 200 000 a 300 000/mm³. En un ensayo *in vitro*, el PRP se distribuye en alícuotas y se incuba en presencia o ausencia de un modulador de TANGO 268 (p. ej., un anticuerpo anti-GPVI) durante un periodo de tiempo (p. ej., 15 minutos a 37 °C) antes de añadir un agonista inductor de plaquetas (p. ej., ADP, trombina, colágeno, epinefrina y ristocetina). En un ensayo *ex vivo*, el PRP obtenido de individuos tratados con TANGO 268 o con un placebo se distribuye en alícuotas y se incuba en presencia de un agonista inductor de plaquetas (p. ej., ADP, trombina, colágeno, epinefrina y ristocetina). La agregación plaquetaria se mide al valorar un aumento de la transmisión de luz visible a través de una suspensión de plaquetas mediante un espectrofotómetro.

- 35 En algunas realizaciones, se prefiere que el modulador de TANGO 268 no afecte a los atributos ni a las funciones de las plaquetas que no tengan que ver con la agregación plaquetaria. Tales otros atributos o funciones de las plaquetas incluyen, por ejemplo, cambio de forma de la plaqueta inducida por el agonista (p. ej., la aglutinación de las plaquetas mediada por GPIIb-vWF inducido por la ristocetina), liberación de los componentes granulados del interior de las plaquetas, activación de las vías de transducción de señales o inducción de la movilización del calcio durante la activación de las plaquetas. Los ensayos para estos atributos y funciones de las plaquetas los conocen bien los expertos en la técnica y se pueden utilizar para analizar, desarrollar e identificar sistemáticamente moduladores de TANGO 268 que muestran una especificidad por la modulación de la agregación plaquetaria.

Se puede analizar la forma de una plaqueta en cualquier ensayo *in vitro* conocido por los expertos en la técnica. Brevemente, las plaquetas se ponen en contacto, en presencia o ausencia de un modulador de TANGO 268, con un agonista inductor de plaquetas (p. ej., ADP, trombina, colágeno, epinefrina y ristocetina) y se evalúa la forma de las plaquetas mediante microscopía o citometría de flujo. La desgranulación de las plaquetas se puede analizar, por ejemplo, midiendo la presencia de ATP *in vitro* después de la estimulación con un agonista inductor de plaquetas en presencia o ausencia de un modulador de TANGO 268 (véase, p. ej., Loscalzo y Schaefer (eds), 1998, «Thrombosis and Hemorrhage», 2.ª edición, capítulo 16, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland). La activación de las vías de transducción de señales de las plaquetas se puede analizar en ensayos *in vitro* y *ex vivo* mediante los ensayos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la activación de las vías de transducción de señales *in vitro* se puede analizar poniendo en contacto muestras de plasma rico en plaquetas con agonistas de las plaquetas (p. ej., colágeno y convulxina) en presencia o ausencia de un modulador de TANGO 268 y medir el efecto de tal tratamiento sobre la cantidad de tirosinas fosforiladas en las moléculas de señalización, tales como Fry, Syk y PLC γ 2 (p. ej., la fosforilación de las tirosinas se puede detectar mediante inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE, ensayos de cinasa, etc.). En un ensayo *ex vivo*, la activación de las vías de transducción de señales se puede analizar poniendo en contacto las muestras de plasma rico en plaquetas obtenidas de individuos tratados con TANGO 268, o con un placebo, con un agonista de las plaquetas (p. ej., colágeno y convulxina) y medir el efecto de tal tratamiento sobre la cantidad de tirosinas fosforiladas en las moléculas de señalización, tales como FcR γ , Syk y PLC γ 2 (p. ej., la fosforilación de las tirosinas se puede detectar mediante inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE, ensayos de cinasa, etc.). El efecto de la activación de las plaquetas sobre la movilización del calcio se puede analizar midiendo

- 45
- 50
- 55
- 60

los cambios de la concentración de Ca^{2+} intracelular libre inducidos en los ensayos *in vitro* y *ex vivo* mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica. Brevemente, las plaquetas ricas en plaquetas se incuban con fluorescencia fura-2 a 37 °C y entonces se incuban con CaCl_2 a 2 mM en presencia o ausencia de un modulador de TANGO 268 antes de incubarse con un agonista de las plaquetas (p. ej., convulxina, colágeno y trombina). Se lisan las células en tampón de lisis, y se mide la concentración de Ca^{2+} intracelular libre mediante fluorescencia a 37 °C con un espectrofotómetro (véase, p. ej., Jandrot-Perrus et al., 1997, *J. of Biol. Chem.* 272: 27035-27041).

Otros ensayos para las plaquetas incluyen ensayos *in vivo* tales como la valoración de la prolongación del tiempo de hemorragia. Por ejemplo, el tiempo de hemorragia que se obtiene con una lesión (p. ej., una pequeña incisión en la vena de la cola) en un modelo animal tratado con un modulador de TANGO 268 se puede comparar con un modelo animal tratado con un placebo. En los humanos, el número de episodios hemorrágicos y la duración de la hemorragia durante un episodio hemorrágico para un humano tratado con un modulador de TANGO 268 se pueden comparar con los de un humano tratado con un placebo.

La eficacia de los moduladores de TANGO 268 se puede evaluar en numerosos modelos animales de trombosis arterial, incluidos, pero sin limitarse a ellos, el modelo de Folts, el modelo de lesión electrolítica, el modelo de trombosis arterial inducida por la trombina y un modelo de trombosis aguda resultante de una lesión inducida por la angioplastia coronaria con balón (véase, p. ej., Loscalzo y Schaefer (eds), 1998, «Thrombosis and Hemorrhage», 2.^a edición, capítulo 16, Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland). El modelo de Folts, que es el modelo más ampliamente utilizado de la trombosis de la arteria carótida y de la coronaria, se produce por un estrechamiento concéntrico mecánico del vaso mediante un cilindro colocado alrededor de la arteria. El modelo electrolítico, que se utiliza para la lesión arterial profunda, se produce mediante la introducción de una corriente eléctrica a través de un electrodo hasta la capa íntima de un vaso estenosado. Aplicando datos de especificidad de especies que se pueden obtener fácilmente, por ejemplo, con los ensayos de agregación plaquetaria descritos en la presente memoria, se pueden elegir modelos de animales particularmente bien adaptados al estudio de cualquier modulador determinado de TANGO 268.

Las tablas 5 y 6 que vienen a continuación proporcionan un resumen de la información de secuencias para la TANGO 268.

TABLA 5: Resumen de la información de secuencias de TANGO 268

Gen	ADNc	ORF	Figura	Número de acceso
TANGO 268 de humano	SEQ ID n.º 1	SEQ ID n.º 2	Figura 1	207180
TANGO 268 de ratón	SEQ ID n.º 14	SEQ ID n.º 15	Figura 6	PTA-225

TABLA 6: Resumen de los dominios de las proteínas de TANGO 268

Proteína	Secuencia señal	Proteína madura	Extracelular	De tipo Ig	Transmembrana	Citoplasmática
TANGO 268 de humano	aa 1-20 de SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 4)	aa 21-339 de SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 5)	aa 21-269 de SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 9)	aa 48-88; 134-180 de SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 6; SEQ ID n.º 7)	aa 270-288 de SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 8)	aa 289-339 de SEQ ID n.º 3 (SEQ ID n.º 10)
TANGO 268 de ratón	aa 1-21 de SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 17)	aa 22-313 de SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 18)	aa 22-267 de SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 19)	aa 49-89; 135-181 de SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 22; (SEQ ID n.º 23)	aa 268-286 de SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 20)	aa 287-313 de SEQ ID n.º 16 (SEQ ID n.º 21)

En los subapartados siguientes se describen diferentes aspectos de la invención con más detalle:

30 I. Moléculas de ácido nucleico aisladas

Un aspecto de la invención está relacionado con moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de la invención o una porción biológicamente activa del mismo, así como con moléculas de ácido nucleico suficientes para uso como sondas de hibridación para identificar moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de la invención y fragmentos de tales moléculas de ácido nucleico adecuadas para utilizarlas como cebadores de PCR para la amplificación o mutación de moléculas de ácido nucleico. Tal y como se utiliza en la

presente memoria, la terminología «molécula de ácido nucleico» pretende incluir las moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y las moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y los análogos de ADN o de ARN que se generan mediante análogos nucleotídicos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. En una realización, las moléculas de ácido nucleico de la invención comprenden un marco abierto de lectura continuo que codifica un polipéptido de la invención.

Una molécula de ácido nucleico «aislada» es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Preferentemente, una molécula de ácido nucleico «aislada» está libre de secuencias (preferentemente secuencias que codifican proteína) que flanquean por naturaleza el ácido nucleico (a saber, las secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del cual procede el ácido nucleico. Por ejemplo, en diferentes realizaciones, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de unas 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de las secuencias nucleotídicas que flanquean de forma natural la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que procede el ácido nucleico. La terminología molécula de ácido nucleico «aislada» se puede referir a una molécula de ácido nucleico de la invención que carece de secuencias intrónicas. Además, una molécula del ácido nucleico «aislada», tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando se sintetiza químicamente. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «aislada», cuando se refiere a una molécula de ácido nucleico, no incluye un cromosoma aislado.

Una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente memoria, p. ej., una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o un complemento de las mismas, se puede aislar mediante técnicas de biología molecular estándares y la información de secuencia dada a conocer en la presente memoria. Utilizando toda o una parte de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47 como una sonda de hibridación, las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden aislar mediante técnicas de hibridación y clonación estándares (p. ej., como se describen en Sambrook et al., eds., «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

Se puede amplificar una molécula de ácido nucleico de la invención utilizando ADNc, ARNm o, alternativamente, ADN genómico como plantilla y los cebadores oligonucleotídicos adecuados según las técnicas estándares de amplificación por PCR. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector adecuado y caracterizar mediante el análisis de la secuencia del ADN. Además, los oligonucleótidos que corresponden a toda o a una parte de una molécula de ácido nucleico de la invención se pueden preparar con técnicas sintéticas estándares, p. ej., mediante un sintetizador de ADN automático.

En otra realización preferente, una molécula de ácido nucleico aislada como se describe en la presente memoria comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o una secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o una parte de las mismas. Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de nucleótidos determinada es una que es lo suficientemente complementaria a dicha secuencia de nucleótidos como para que se pueda hibridar a dicha secuencia de nucleótidos y por esta razón forme un dúplex estable.

Además, la molécula de ácido nucleico de la invención puede comprender sólo una porción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido completo de la invención, por ejemplo, un fragmento que se puede utilizar como sonda o cebador, o un fragmento que codifica una porción biológicamente activa de un polipéptido de la invención. La secuencia nucleotídica determinada a partir de la clonación de un gen permite generar sondas y cebadores diseñados para uso en la identificación y/o clonación de homólogos en otros tipos de células, p. ej., de otros tejidos, así como homólogos de otros mamíferos. La sonda o cebador comprende típicamente un oligonucleótido sustancialmente purificado. En una realización, el oligonucleótido comprende una región de una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas a al menos aproximadamente 12, preferentemente aproximadamente 25, más preferentemente aproximadamente 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350 o 400 nucleótidos consecutivos de la secuencia sentido o antisentido de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o la secuencia nucleotídica del inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un mutante que se genera de forma natural de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47. En otra realización, el oligonucleótido comprende una región de una secuencia nucleotídica que se hibrida en condiciones rigurosas a al menos aproximadamente 400, preferentemente 450, 500, 530, 550, 600, 700, 800, 900, 1000 o 1150 oligonucleótidos consecutivos de la secuencia sentido o antisentido de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o la secuencia de nucleótidos del inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un mutante que se genera de forma natural de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47.

Se pueden utilizar sondas basadas en la secuencia de una molécula de ácido nucleico de la invención para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican la misma molécula de proteína que codifica una molécula de ácido nucleico determinada. La sonda comprende un grupo de marcación unido a ella, p. ej., un radioisótopo, un

compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático. Tales sondas se pueden utilizar como parte de un kit de prueba diagnóstica para identificar células o tejidos que expresan indebidamente la proteína, tal como midiendo la cantidad de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína en una muestra de células de un sujeto, p. ej., detectando los niveles de ARNm o determinando si se ha mutado o eliminado un gen que codifica la proteína.

- 5 Se puede preparar un fragmento de ácido nucleico que codifica una porción biológicamente activa de un polipéptido de la invención aislando una porción de una cualquiera de las SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47 que exprese la porción codificante de la proteína polipeptídica (p. ej., mediante expresión recombinante *in vitro*) y evaluando la actividad de la porción codificada del polipéptido.

- 10 La descripción además engloba moléculas de ácido nucleico que difieren de la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47 debido a la degeneración del código genético y, por lo tanto, codifica la misma proteína que la codificada por la secuencia de nucleótidos de las SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47.

- Además de las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, los expertos en la técnica apreciarán que pueden existir polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a cambios en la secuencia de aminoácidos dentro de una población (p. ej., la población humana). Tales polimorfismos genéticos pueden existir entre los individuos dentro de una población debido a la variación alélica natural. Un alelo es uno entre un grupo de genes que aparece alternativamente en un locus genético determinado. Por ejemplo, se ha cartografiado la TANGO 268 humana en el cromosoma 19 y, por lo tanto, los miembros de la familia de TANGO 268 pueden incluir polimorfismos de secuencia nucleotídica (p. ej., secuencias de nucleótidos que presentan variaciones respecto a la SEQ ID n.º 1 y a la SEQ n.º 2) que se localizan en este locus cromosómico (p. ej., región del cromosoma 19q13) y tales secuencias representan variantes alélicas de TANGO 268. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la frase «variante alélica» se refiere a una secuencia nucleotídica que se produce en un locus determinado o a un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «gen» y «gen recombinante» se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco abierto de lectura que codifica un polipéptido de la invención. Tales variaciones alélicas naturales típicamente pueden dar lugar a una variación del 1 al 5% en la secuencia de nucleótidos de un gen determinado. Se pueden identificar alelos alternativos al secuenciar el gen de interés en una serie de individuos diferentes. Esto se puede llevar a cabo fácilmente utilizando sondas de hibridación para identificar el mismo locus genético en una serie de individuos. Se pretende que estén dentro del alcance de la invención todos y cada uno de las variaciones nucleotídicas y los polimorfismos o variaciones de aminoácido resultantes que son el resultado de la variación alélica natural y que no alteran la actividad funcional. En una realización, los polimorfismos que se asocian a una enfermedad particular y/o trastorno se utilizan como marcadores para diagnosticar dicha enfermedad o trastorno. En una realización preferente, se utilizan los polimorfismos como un marcador para diagnosticar la función coronaria anormal (p. ej., enfermedades coronarias tales como el infarto de miocardio, aterosclerosis, arteriopatía coronaria, formación de placas).

- Las moléculas de ácido nucleico que corresponden a variantes alélicas naturales y homólogos de un ADNc de la invención se pueden aislar basándose en su identidad con la molécula de ácido nucleico humana descrita en la presente memoria mediante los ADNc humanos descritos, o una parte de los mismos, como sonda de hibridación de acuerdo con las técnicas de hibridación estándares en condiciones de hibridación rigurosas. Por ejemplo, un ADNc que codifica una forma soluble de una proteína unida a la membrana de la invención que se ha aislado basándose en su hibridación a una molécula de ácido nucleico que codifica toda o parte de la forma unida a la membrana. Asimismo, un ADNc que codifica una forma unida a la membrana se puede aislar basándose en su hibridación a una molécula de ácido nucleico que codifica toda o parte de la forma soluble.

- En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico aislada de la invención con una longitud de al menos 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 o 2000 nucleótidos contiguos y que se hibrida en condiciones rigurosas a la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos, preferentemente la secuencia codificante, de la SEQ ID n.º 1, o un complemento de la misma.

- En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico aislada de la invención con una longitud de al menos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 nucleótidos contiguos y que se hibrida en condiciones rigurosas a la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 2, o un complemento de la misma.

- En la presente memoria también se describe una molécula aislada de ácido nucleico de la invención que tiene una longitud de al menos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 o 1500 nucleótidos contiguos y que se hibrida en condiciones rigurosas a la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos, preferentemente la secuencia codificante, de la SEQ ID n.º 14, o un complemento de la misma.

Una molécula aislada de ácido nucleico de la invención que tiene una longitud de al menos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 o 900 nucleótidos contiguos y que se hibrida en condiciones rigurosas a la molécula de ácido

nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 15, o un complemento de la misma.

En la presente memoria también se describe una molécula aislada de ácido nucleico que tiene una longitud de al menos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 o 1500 nucleótidos contiguos y que se hibrida en condiciones rigurosas a la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 41, 43, 45 o 47, o un complemento de las mismas.

En la presente memoria también se describe una molécula aislada de ácido nucleico de la invención que tiene una longitud de al menos 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 o 1500 nucleótidos contiguos y que se hibrida en condiciones rigurosas a la molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID n.º 33, 35, 37 o 39, o un complemento de las mismas.

- 10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «se hibrida en condiciones rigurosas» pretende describir las condiciones para la hibridación y el lavado en las que las secuencias de nucleótidos con una identidad de al menos el 60% (65%, 70%, preferentemente 75%) entre sí típicamente permanecen hibridadas la una con la otra. Tales condiciones rigurosas son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En un ejemplo no limitante, las
- 15 condiciones de hibridación rigurosas son hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 6X a unos 45 °C, seguido de uno o más lavados en SSC a 0,1X y SDS al 0,2% a unos 68 °C. Las condiciones de hibridación rigurosas de un ejemplo no limitante preferente son hibridación en SSC a 6X a unos 45 °C, seguida de unos o varios lavados en SSC a 0,2X y SDS al 0,1% a 50-65 °C (a saber, uno o más lavados a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C). Preferentemente, una molécula de ácido nucleico aislada que se hibrida en condiciones rigurosas a la secuencia de
- 20 SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o un complemento de las mismas, corresponde a una molécula de ácido nucleico que se produce de forma natural. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una molécula de ácido nucleico «que se produce de forma natural» se refiere a una molécula de ARN o ADN que tiene una secuencia de nucleótidos que aparece en la naturaleza (por ejemplo, codifica una proteína natural).

- Además de las variantes alélicas que se producen de forma natural en una molécula de ácido nucleico de la secuencia de la invención que pueden existir en la población, el experto en la técnica apreciará además que se
- 25 pueden introducir cambios mediante mutación que conducen por consiguiente a cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, sin alterar la actividad biológica de la proteína. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de nucleótidos que conducen a sustituciones de aminoácidos en restos aminoacídicos «no esenciales». Un resto aminoacídico «no esencial» es un resto de la secuencia de tipo salvaje que se puede alterar sin afectar a la actividad biológica, dado que se requiere un resto aminoacídico «esencial» para la actividad biológica. Por ejemplo, los restos aminoacídicos que no están conservados o sólo están semiconservados entre los
- 30 homólogos de diferentes especies pueden ser no esenciales para la actividad y, por esta razón, probablemente serían dianas para una alteración. Ejemplos específicos de las alteraciones de aminoácidos conservativas de la secuencia de aminoácidos original de la SEQ ID n.º 3 o 16 se muestran en la SEQ ID n.º 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47. Alternativamente, los restos aminoacídicos que están conservados entre los homólogos de diferentes especies (p. ej., ratón y humano) pueden ser esenciales para la actividad y, por ese motivo, probablemente no serían dianas para una alteración.

- En consecuencia, otro aspecto de la invención hace referencia a las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de la invención que contiene cambios en los restos aminoacídicos que no son esenciales para la actividad. Tales polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 34, 36, 38 o 40, siguen
- 40 conservando la actividad biológica. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que incluye una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente al 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 34, 36, 38 o 40.

- En consecuencia, otro aspecto de la invención hace referencia a las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de la invención que contiene cambios en los restos aminoacídicos que no son esenciales para la actividad. Tales polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 16, 42, 44, 46 o 48, siguen
- 45 conservando la actividad biológica. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada incluye una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que incluye una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos aproximadamente al 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 75%, 85%, 95% o 98% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 16, 42, 44, 46 o 48.

- Se puede crear una molécula de ácido nucleico aislada que codifique una proteína variante mediante la introducción de una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia nucleotídica de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47 de tal forma que se introducen una o varias sustituciones, adiciones o
- 55 deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Se pueden introducir mutaciones mediante técnicas estándares, tal como la mutagénesis específica de sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Preferentemente, se realizan sustituciones conservativas de aminoácidos en uno o más restos aminoacídicos que se predice que no son esenciales. Una «sustitución conservativa de aminoácido» es una en la que el resto de aminoácido se reemplaza por un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos
- 60 aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales

- básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales β -ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como mediante la mutagénesis de saturación, y se pueden seleccionar los mutantes resultantes por la actividad biológica para identificar los mutantes que conservan la actividad. Después de la mutagénesis, se puede expresar la proteína codificada de manera recombinante y se puede determinar la actividad de la proteína.
- 10 En una realización preferente, a un polipéptido mutante que es una variante de un polipéptido de la invención al que se le puede ensayar: (1) la capacidad para formar interacciones proteína:proteína con proteínas en una vía de señalización del polipéptido de la invención (p. ej., la capacidad que un polipéptido TANGO 268 variante tiene para asociarse con FcRy); (2) la capacidad para fijarse a un ligando del polipéptido de la invención (p. ej., la capacidad que un polipéptido TANGO 268 variante tiene para fijarse al colágeno o a la convulxina); (3) la capacidad para fijarse a una proteína diana intracelular del polipéptido de la invención; (4) la capacidad para activar una molécula de señalización intracelular activada por el polipéptido de la invención (p. ej., la capacidad que un polipéptido TANGO 268 variante tiene para activar Syk, fosfolipasa Cy2 o fosfatidilinositol 3-cinasa); o (5) la capacidad para inducir y/o modular la actividad de las plaquetas (p. ej., la capacidad que un polipéptido TANGO 268 variante tiene para inducir y/o modular la activación de las plaquetas o la agregación de las plaquetas. Aún en otra realización preferente, al polipéptido mutante se le puede ensayar la capacidad para modular la proliferación celular, la migración celular o quimiotaxia, o la diferenciación celular.

- En la presente memoria también se describen moléculas de ácido nucleico antisentido, a saber, moléculas que son complementarias a un ácido nucleico sentido que codifica un polipéptido de la invención, p. ej., complementarias a la hebra codificante de una molécula de ADN bicatenaria o complementaria a una secuencia de ARNm. En consecuencia, el ácido nucleico antisentido es capaz de unirse por puentes de hidrógeno a un ácido nucleico sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario a toda una hebra codificante o sólo a una parte de la misma, por ejemplo, a toda o parte de la región codificante de la proteína (o marco abierto de lectura). Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido a toda o una parte de una región no codificante de la hebra codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la invención. Las regiones no codificantes (las «regiones sin traducir en 5' y 3'») son las secuencias en 5' y en 3' que flanquean la región codificante y no se traducen en aminoácidos.

- Un oligonucleótido antisentido puede tener una longitud de, por ejemplo, unos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos o más. Se puede construir un ácido nucleico antisentido de la invención mediante la síntesis química y las reacciones de ligación enzimática utilizando los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (p. ej., un oligonucleótido antisentido) se puede sintetizar químicamente con los nucleótidos que se producen de forma natural o con nucleótidos con diversas modificaciones diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleico antisentido y sentido, p. ej., se pueden utilizar derivados de fosforotioato y nucleótidos con sustituciones de acridina. Ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar el ácido nucleico antisentido incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, β -D-galactosilqueosina, inosina, N^6 -isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N^6 -adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminoetil-2-tiouracilo, β -D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil- N^6 -isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, uracil-5-oxiacetato de metilo, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Alternativamente, se puede producir biológicamente el ácido nucleico antisentido utilizando un vector de expresión en el que se ha subclonado el ácido nucleico en una orientación antisentido (es decir, el ARN transcrito a partir del ácido nucleico introducido tendrá la orientación antisentido a un ácido nucleico diana de interés, descrito nuevamente en el subapartado siguiente).

- Las moléculas de ácido nucleico antisentido normalmente se administran a un sujeto o se generan *in situ* de tal forma que se hibridan, o se fijan, al ARNm celular y/o al ADN genómico que codifica un polipéptido seleccionado de la invención, de forma que inhibe la expresión, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o la traducción. La hibridación se puede realizar mediante complementariedad de nucleótidos convencional para formar un dúplex estable o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a un dúplex de ADN, mediante interacciones específicas en el surco mayor de la doble hélice. Un ejemplo de una vía de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención incluye la inyección directa en un tejido. Alternativamente, se pueden modificar moléculas de ácido nucleico antisentido para que actúen selectivamente sobre determinadas células y administrarlas sistémicamente después. Por ejemplo, para la administración sistémica, se pueden modificar las moléculas antisentido de tal forma que se unan específicamente a receptores o antígenos expresados en una superficie celular determinada, por ejemplo, uniendo las moléculas de ácido nucleico antisentido a péptidos o anticuerpos que se fijan a receptores o antígenos de la superficie celular. También se pueden dirigir las moléculas de ácido nucleico antisentido a las células mediante los vectores descritos en la presente memoria. Para conseguir

una concentración intracelular suficiente de las moléculas antisentido, se prefieren construcciones de vectores en las que la molécula de ácido nucleico antisentido esté colocada bajo el control de un promotor fuerte de pol II o de pol III.

- Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser una molécula de ácido nucleico α -anomérica. Una molécula de ácido nucleico α -anomérica forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, al contrario que las unidades β usuales, las hebras transcurren paralelas entre sí (Gaultier et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-O-metilribonucleótido (Inoue et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue et al., 1987, *FEBS Lett.* 215: 327-330).
- 10 La presente descripción también engloba las ribozimas. Las ribozimas son moléculas de ARN catalítico con actividad ribonucleasa que son capaces de escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el que tienen una región complementaria. Por lo tanto, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas en cabeza de martillo [descritas en Haselhoff y Gerlach (1988) *Nature* 334: 585-591]) se pueden utilizar para escindir catalíticamente los transcritos de ARNm, por lo que inhiben la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Se puede diseñar una ribozima que
- 15 tiene especificidad por una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención basándose en la secuencia nucleotídica de un ADNc descrito en la presente memoria. Por ejemplo, se puede construir un derivado del ARN L-19 IVS de *Tetrahymena* en el que la secuencia nucleotídica del centro activo es complementaria a la secuencia de nucleótidos a escindir en Cech et al., patente de los EE.UU. n.º 4 987 071; y Cech et al., patente de los EE.UU. n.º 5 116 742. Alternativamente, se puede utilizar un ARNm que codifica un polipéptido de la invención para
- 20 seleccionar un ARN catalítico que tiene una actividad ribonucleásica específica entre un conjunto de moléculas de ARN. Véase, p. ej., Bartel y Szostak, 1993, *Science* 261: 1411-1418.

- La presente descripción también incluye y también engloba las moléculas de ácido nucleico que forman estructuras helicoidales triples. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de la invención se puede inhibir dirigiendo secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora del gen que codifica el polipéptido (p. ej., el
- 25 promotor y/o el potenciador) para formar estructuras helicoidales triples que impiden la transcripción del gen en las células diana. Véase, de forma general, Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84; Helene, 1992, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 660: 27-36; y Maher, 1992, *Bioassays* 14(12): 807-15.

- En diferentes realizaciones se pueden modificar las moléculas de ácido nucleico de la invención en la parte de la base, en la parte del azúcar o en el esqueleto de fosfatos para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridación o la
- 30 solubilidad de la molécula. Por ejemplo, se puede modificar el esqueleto del fosfatos y desoxirribosas de los ácidos nucleicos para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase, Hyrup et al., 1996, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 4(1): 5-23). Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «ácidos nucleicos peptídicos» o «ANP» se refiere a imitaciones de ácidos nucleicos, por ejemplo, imitaciones de ADN, en las que el esqueleto de fosfatos y desoxirribosas se reemplaza por un esqueleto pseudopeptídico y sólo se conservan las cuatro nucleobases naturales. Se ha demostrado que el esqueleto neutro de los ANP permite la hibridación específica al ADN y al ARN
- 35 en condiciones de fuerza iónica baja. Se puede realizar la síntesis de oligómeros ANP mediante los protocolos estándares de síntesis de péptidos en fase sólida tal y como se describe en Hyrup et al., 1996, *supra*; y Perry-O'Keefe et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675.

- Se pueden utilizar los ANP en aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Por ejemplo, se pueden utilizar los ANP como agentes antisentido o antigénicos para modular la expresión génica de una forma específica de secuencia, p. ej., induciendo la parada de la transcripción o de la traducción, o inhibiendo la replicación. También se pueden utilizar los ANP, por ejemplo para el análisis de mutaciones puntuales entre las pares de bases en un gen mediante, p. ej., pinzamiento por PCR dirigido por ANP; como enzimas de restricción artificiales cuando se utilizan en combinación con otras enzimas, por ejemplo nucleasas S1 [Hyrup, 1996, *supra*]; o como sondas o cebadores para la
- 40 secuencia del ADN y la hibridación (Hyrup, 1996, *supra*; y Perry-O'Keefe et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14670-675).

- En otra realización, se pueden modificar los ANP, p. ej., para mejorar su estabilidad o su captación por las células, pegándoles grupos lipófilos u otros grupos cooperadores a los ANP, mediante la formación de quimeras ANP-ADN, o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de administración de fármacos conocidas en la técnica. Por
- 50 ejemplo, se pueden generar quimeras ANP-ADN que podrían combinar las propiedades ventajosas del ANP y del ADN. Tales quimeras permiten que las enzimas de reconocimiento del ADN, p. ej., ARNasa H y ADN polimerasas, interaccionen con la porción de ADN, mientras que la porción de ANP proporcionaría una elevada afinidad de fijación y especificidad. Las quimeras de ANP-ADN se pueden unir mediante conectores de longitud adecuada seleccionados en términos de apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases, y orientación (Hyrup,
- 55 1996, *supra*). La síntesis de las quimeras ANP-ADN se puede realizar como se describió en Hyrup, 1996, *supra* y Finn et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24(17): 3357-63. Por ejemplo, se puede sintetizar una cadena de ADN sobre un soporte sólido mediante la química de acoplamiento de fosforamiditas y análogos de nucleósidos modificados. Se pueden utilizar compuestos tales como 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxitimidina fosforamidita a modo de conexión entre el ANP y el extremo 5' del ADN (Mag et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 5973-88). A continuación, los
- 60 monómeros de ANP se conjugan de una manera escalonada para producir una molécula quimérica con un segmento de ANP en 5' y un segmento de ADN en 3' (Finn et al., 1996, *Nucleic Acids Res.* 24(17): 3357-63).

Alternativamente, se pueden sintetizar moléculas quiméricas con un segmento de ADN en 5' y un segmento de ANP en 3' (Peterser et al., 1975, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1119-11124).

- En otras realizaciones, el oligonucleótido puede incluir otros grupos anexionados tales como péptidos (por ejemplo, para actuar selectivamente sobre los receptores de las células hospedadoras *in vivo*) o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6553-6556; Lemaitre et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 648-652; la publicación de PCT de patente internacional n.º WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la publicación PCT de patente internacional n.º WO 89/10134). Además, se pueden modificar los oligonucleótidos con agentes de escisión desencadenados por la hibridación (véase, p. ej., Krol et al., 1988, *BioTechniques* 6: 958-976) o agentes intercalantes (véase, p. ej., Zon, 1988, *Pharm. Res.* 5: 539-549). Para este fin, se puede conjugar el oligonucleótido con otra molécula, por ejemplo, un péptido, agente de entrecruzamiento activado por la hibridación, transportador, o agente de escisión activado por la hibridación, etc.

II. Proteínas y anticuerpos aislados

- Un aspecto de la invención hace referencia a proteínas aisladas y porciones biológicamente activas de las mismas, así como a fragmentos polipeptídicos adecuados para uso como inmunógenos para generar anticuerpos dirigidos contra un polipéptido de la invención. En una realización, se puede aislar el polipéptido nativo de fuentes celulares o tisulares mediante un esquema de purificación adecuado utilizando técnicas estándares de purificación de proteínas. En otra realización, se producen polipéptidos de la invención mediante técnicas de ADN recombinante. De forma alternativa a la expresión recombinante, se puede sintetizar químicamente un polipéptido de la invención mediante técnicas estándares de síntesis de péptidos.

- Una proteína o porción biológicamente activa de la misma «aislada» o «purificada» está esencialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que se obtiene la proteína, o esencialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La terminología «esencialmente libre de material celular» incluye preparaciones de proteína en las que la proteína se separa de los componentes celulares de las células de la que se aísla o se produce por recombinación. Por esta razón, la proteína que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de proteína que tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, o 5% (en peso en seco) de proteína heteróloga (también citada en la presente memoria como «proteína contaminante»). Cuando la proteína o la porción biológicamente activa de la misma se produce por técnicas recombinantes, también se prefiere esencialmente libre del medio de cultivo, a saber, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, 10%, o 5% del volumen de la preparación de la proteína. Cuando la proteína se produce mediante síntesis química, se prefiere esencialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, a saber, se separa de los precursores químicos o de otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. En consecuencia, tales preparaciones de la proteína tienen menos de aproximadamente el 30%, 20%, 10%, 5% (en peso en seco) de los precursores químicos o compuestos diferentes al polipéptido de interés.

- Las porciones biológicamente activas de un polipéptido de la invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas a, o que derivan de, las secuencia de aminoácidos de la proteína (p. ej., la secuencia de aminoácidos mostrada en cualquiera de las SEQ ID n.º 4, 6, 7, 9, 10, 17, 19, 20, 21, 22 o 23), que incluye menos aminoácidos que la proteína completa, y presenta al menos una actividad de la correspondiente proteína completa. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína correspondiente. Una porción biológicamente activa de una proteína de la invención puede ser un polipéptido que tiene una longitud de, por ejemplo, 10, 25, 50, 100 o más aminoácidos. Además, otras porciones biológicamente activas, en las que se eliminan otras regiones de la proteína, se pueden preparar mediante técnicas recombinantes y se les puede evaluar una o más de las actividades funcionales de la forma nativa de un polipéptido de la invención.

- Los polipéptidos preferentes tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48. Otras proteínas útiles son sustancialmente idénticas (p. ej., al menos aproximadamente el 45%, preferentemente el 55%, 65%, 75%, 85%, 95%, o el 99%) a cualquiera de SEQ ID n.º 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23, y conservan la actividad funcional de la correspondiente proteína que se produce de forma natural que aún difiere en la secuencia de aminoácidos debido a la variación alélica natural o la mutagénesis.

- Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, se alinean las secuencias con el propósito de compararlas óptimamente (por ejemplo, se pueden introducir huecos en la primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para el alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). A continuación se comparan los restos aminoacídicos o nucleotídicos de las correspondientes posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto aminoacídico o nucleotídico que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (% de identidad = n.º de posiciones idénticas/n.º total de posiciones [p. ej., posiciones solapantes] x 100). En una realización, las dos

secuencias tienen la misma longitud.

- La determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se puede realizar mediante un algoritmo matemático. Un ejemplo no limitante preferente de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de las dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 87: 2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Se pueden realizar búsquedas BLAST de nucleótidos con el programa NBLAST (puntuación = 100, longitud de palabra = 12) para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la invención. Se pueden realizar búsquedas BLAST de proteínas con el programa XBLAST (puntuación = 50, longitud de palabra = 3) para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la invención. Para obtener alineamiento con huecos para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Alternativamente, se puede utilizar PSI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta las relaciones distantes entre las moléculas (*Ibid.*). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden utilizar los parámetros por omisión de cada uno de los programas (por ejemplo, XBLAST and NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

- Otro ejemplo no limitante preferente de un algoritmo matemático para la comparación de las secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, CABIOS (1989). Tal algoritmo se incorpora en el programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete informático de alineamiento de secuencias del GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, se puede utilizar una tabla de ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. En la técnica se conocen otros algoritmos para el análisis de secuencias e incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis y Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10: 3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2444-8. En FASTA, ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y velocidad de la búsqueda. Si ktup = 2, se encuentran regiones similares en las dos secuencias que se comparan mediante la búsqueda de parejas de restos alineados; Si ktup = 1, se examinan los aminoácidos alineados de uno en uno. Se puede poner ktup a 2 ó 1 para las secuencias de proteínas, o de 1 a 6 para las secuencias de ADN. El valor por defecto si no se especifica el ktup es 2 para las proteínas y 6 para el ADN. Para más descripción de los parámetros de FASTA, véase <http://bioweb.pasteur.fr/docs/man/man/fasta.1.html#sect2>, cuyo contenido se incorpora aquí por referencia.

- El porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede determinar utilizando técnicas similares a las descritas más arriba, permitiendo huecos o sin permitirlos. Al calcular el porcentaje de identidad, se cuentan típicamente los emparejamientos exactos.

- La invención también da a conocer proteínas quiméricas o de fusión. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «proteína quimérica» o una «proteína de fusión» comprende todo o parte (preferentemente biológicamente activo) de un polipéptido de la invención unido operativamente a un polipéptido heterólogo (a saber, un polipéptido diferente al mismo polipéptido de la invención). Dentro de la proteína de fusión, la terminología «operativamente unido» pretende indicar que el polipéptido de la invención y el polipéptido heterólogo están fusionados en fase el uno al otro. Se puede fusionar el polipéptido heterólogo al extremo amino o al extremo carboxilo del polipéptido de la invención.

- Una proteína de fusión útil es una proteína de fusión a GST en la que el polipéptido de la invención está fusionado al extremo carboxilo de secuencias de GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de un polipéptido recombinante de la invención.

- En otra realización, la proteína de fusión contiene una secuencia señal heteróloga en su extremo amino. Por ejemplo, la secuencia señal nativa de un polipéptido de la invención se puede eliminar y reemplazar por una secuencia señal de otra proteína. Por ejemplo, la secuencia secretora de gp67, la proteína de envoltura del baculovirus, se puede utilizar como una secuencia señal heteróloga (*Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucariotas incluyen las secuencias de secreción de la melitina y de la fosfatasa alcalina de placenta humana (Stratagene; La Jolla, California). Aún en otro ejemplo, las secuencias señal heterólogas procariotas útiles incluyen la señal de secreción de phoA (Sambrook et al., *supra*) y la señal de secreción de la proteína A (Pharmacia Biotech; Piscataway, New Jersey).

- En otra realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión a inmunoglobulina en la que todo o parte de un polipéptido de la invención está fusionado a secuencias procedentes de un miembro de la familia de proteínas de las inmunoglobulinas. Las proteínas de fusión a inmunoglobulina de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas y administrarlas a un sujeto para inhibir una interacción entre un ligando (soluble o fijado a la membrana) y una proteína sobre la superficie de una célula (receptor), gracias a lo cual se suprime la transducción de señales *in vivo*. Se puede utilizar la proteína de fusión a inmunoglobulina para alterar la biodisponibilidad de un ligando cognado de un polipéptido de la invención. La inhibición de la interacción entre ligando y receptor puede ser útil desde el punto de vista terapéutico tanto para tratar trastornos proliferativos y diferenciativos como para modular (p. ej., promover o inhibir) la supervivencia celular. Además, las proteínas de la invención de fusión a inmunoglobulinas se pueden utilizar como inmunógenos para generar anticuerpos dirigidos

contra un polipéptido de la invención en un sujeto, para purificar ligandos y para ensayos de detección en los que se identifiquen moléculas que inhiben la interacción de los receptores con los ligandos.

Se pueden producir proteínas quiméricas y de fusión de la invención mediante técnicas estándares de ADN recombinante. En otra realización, se puede sintetizar el gen de fusión mediante técnicas convencionales, que incluyen los sintetizadores automáticos de ADN. Alternativamente, se puede llevar a cabo la amplificación por PCR de los fragmentos génicos utilizando cebadores de anclaje que dan lugar a protuberancias complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que se pueden hibridar y reamplificar posteriormente para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., *supra*). Además, muchos vectores de expresión que están disponibles comercialmente ya codifican una mitad de la fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención se puede clonar en tal vector de expresión de tal forma que la mitad de fusión queda unida en fase al polipéptido de la invención.

Se puede utilizar una secuencia señal de un polipéptido de la invención (SEQ ID n.º 4 o 17) para facilitar la secreción y el aislamiento de la proteína secretada u otras proteínas de interés. Las secuencias señal se caracterizan típicamente mediante un núcleo de aminoácidos hidrófobos que se escinden generalmente de la proteína madura durante la secreción mediante una o varias escisiones. Tales péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten escindir la secuencia señal de las proteínas maduras cuando pasan a través de la vía secretora. Por lo tanto, la invención hace referencia a los polipéptidos descritos que tienen una secuencia señal así como a la secuencia señal misma y al polipéptido en ausencia de la secuencia señal (a saber, los productos de escisión). En una realización, una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de la invención puede estar unida operativamente en un vector de expresión a una proteína de interés, tal como una proteína que ordinariamente no se secreta o que de otra manera sería difícil de aislar. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como desde un hospedador eucariota en el que el vector de expresión se introduce por transformación, y la secuencia señal se escinde posteriormente o a la vez. A continuación se puede purificar la proteína fácilmente del medio extracelular mediante los métodos reconocidos en la técnica. Alternativamente, la secuencia señal se puede unir a la proteína de interés utilizando una secuencia que facilita la purificación, tal como con un dominio GST.

En otra realización, las secuencias señal de la presente invención se pueden utilizar para identificar secuencias reguladoras, por ejemplo, promotores, potenciadores, represores. Como las secuencias señal son las secuencias más aminoterminales de un péptido, se espera que los ácidos nucleicos que flanquean la secuencia señal en su extremo aminoterminal sean secuencias reguladoras que alteran la transcripción. Por lo tanto, una secuencia nucleotídica que codifica toda o parte de una secuencia señal se puede utilizar como sonda para identificar y aislar secuencias señal y sus regiones flanqueantes, y estas regiones flanqueantes se pueden estudiar para identificar elementos reguladores de ésta.

La presente descripción también hace referencia a variantes de los polipéptidos de la invención. Tales variantes tienen una secuencia de aminoácidos alterada que puede funcionar como agonista (miméticos) o como antagonista. Se pueden generar variantes mediante mutagénesis, p, ej., mutación puntual individual o truncamiento. Un agonista puede conservar esencialmente las mismas actividades biológicas de la forma de la proteína que se produce de forma natural, o un subconjunto de ellas. Un antagonista de una proteína puede inhibir una o más de las actividades de la forma de la proteína que se produce de forma natural mediante, por ejemplo, la fijación competitiva a un miembro vía arriba o vía abajo de una cascada de señalización celular en la que participa la proteína de interés. Por lo tanto, se pueden desencadenar efectos biológicos específicos mediante el tratamiento con una variante de función limitada. El tratamiento de un sujeto con una variante que tiene un subconjunto de actividades biológicas de la forma de la proteína que se produce de forma natural puede tener menos efectos secundarios sobre el sujeto que el tratamiento con la forma de la proteína que se produce de forma natural.

Las variantes de una proteína de la invención que funcionan como agonista (miméticos) o como antagonista se pueden identificar detectando selectivamente la actividad agonista o antagonista en genotecas combinatorias de mutantes, p. ej., mutantes de truncamiento, de la proteína de la invención. En una realización, se genera una genoteca heterogénea de variantes mediante mutagénesis combinatoria a nivel de ácido nucleico y está codificada por una genoteca heterogénea. Se puede generar una genoteca heterogénea de variantes, por ejemplo, al ligar enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos con secuencias génicas de tal forma que un conjunto degenerado de posibles secuencias proteicas se pueda expresar como polipéptidos individuales o, alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, para exposición en bacteriófagos). Existen una serie de métodos que se pueden utilizar para generar genotecas de variantes potenciales de los polipéptidos de la invención a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. En la técnica se conocen métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados (véase, por ejemplo, Narang, S. A. (1983), *Tetrahedron* 39: 3; Itakura et al., 1984, *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura et al., 1984, *Science* 198: 1056; y Ike et al., 1983, *Nucleic Acid Res.* 11: 477).

Además, las genotecas de fragmentos de la secuencia codificante de un polipéptido de la invención se pueden utilizar para generar una población heterogénea de polipéptidos para la detección y posterior selección de las variantes. Por ejemplo, se puede generar una genoteca de fragmentos de secuencias codificantes al tratar un fragmento de PCR bicatenario de una secuencia codificante de interés con una nucleasa en condiciones en las que se produce una mella sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturar el ADN bicatenario, renaturalizar el ADN para formar ADN bicatenario que puede incluir parejas sentido/antisentido de diferentes productos mellados,

retirar mediante el tratamiento con nucleasa S1 las porciones monocatenarias de los duplex que se han vuelto a formar, y ligar la genoteca de fragmentos resultante con un vector de expresión. Con este método se puede obtener una genoteca de expresión que codifica fragmentos del extremo amino e internos de diferentes tamaños de la proteína de interés.

- 5 Se conocen varios métodos en la técnica para detectar productos génicos en genotecas combinatorias fabricadas por mutación puntual o truncamiento, y para rastrear las genotecas de ADNc en busca de los productos génicos que tienen una propiedad determinada. Las técnicas utilizadas más ampliamente, que son adecuadas para los análisis de alto rendimiento, para rastrear grandes genotecas, incluyen típicamente clonar la genoteca en vectores de expresión replicables, transformar las células adecuadas con la genoteca de vectores resultante y expresar los
- 10 genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis recursiva en conjunto (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de mutantes funcionales en las genotecas, se puede utilizar en combinación con los ensayos de detección para identificar variantes de una proteína de la invención (Arkin y Yourvan (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 7811-7815; y Delgrave et al., 1993, *Protein Engineering* 6(3): 327-331).
- 15 Los polipéptidos de la invención pueden mostrar modificaciones postraduccionales que incluyen, pero sin limitarse a ellas, glucosilaciones, (p. ej., N-glucosilaciones O-glucosilaciones), miristoilaciones, palmitoilaciones, acetilaciones y fosforilaciones (p. ej., serina/treonina o tirosina). En una realización, el polipéptido de TANGO 268 de la invención muestra una reducción de la cantidad de O-glucosilación y/o de N-glucosilación respecto a los polipéptidos de TANGO 268 expresados endógenamente. En una realización, los polipéptidos de TANGO 268 de la invención no
- 20 muestran ni O-glucosilación ni N-glucosilación. Además, las modificaciones postraduccionales de los polipéptidos de TANGO 268, tales como la glucosilación, se pueden evitar al tratar las células, por ejemplo, con tunicamicina, o al expresar moléculas de ácido nucleico de TANGO 268 en las células hospedadoras que carecen de la capacidad para modificar postraduccionalmente los polipéptidos de TANGO 268.
- Se puede utilizar un polipéptido aislado de la invención o un fragmento del mismo como un inmunógeno para
- 25 generar anticuerpos mediante las técnicas estándares para la preparación de anticuerpos policlonales y monoclonales. Se puede utilizar el polipéptido o proteína completo, o alternativamente, la invención da a conocer fragmentos peptídicos antigénicos para utilizarlos como inmunógenos. En una realización, un polipéptido aislado o fragmento del mismo que carece de N-glucosilación y/o de O-glucosilación se utiliza como un inmunógeno para generar anticuerpos mediante las técnicas estándares conocidas por los expertos en la técnica. El péptido antigénico
- 30 de una proteína de la invención comprende al menos 8 (preferentemente al menos 10, al menos 15, al menos 20, o al menos 30) restos aminoácídicos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, y engloba un epítipo de la proteína de tal forma que un anticuerpo generado contra el péptido forma un complejo inmunitario específico con la proteína.
- En una realización, un polipéptido utilizado como un inmunógeno comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ
- 35 ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto del ADNc del plásmido depositado en la ATCC® como número de acceso 207180, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc del plásmido depositado en la ATCC® como número de depósito de patente PTA-225. En otra realización, un polipéptido utilizado como un inmunógeno comprende un fragmento de al menos 8, preferentemente al menos 10, al menos 15, al menos 25, al menos 30, al menos 50, al menos 75, al menos 100 o más restos
- 40 aminoácídicos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48. En otra realización, un polipéptido utilizado como un inmunógeno comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de al menos el 50%, preferentemente al menos el 65%, al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 95% o al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, en donde el porcentaje de identidad se determina con el programa ALIGN del paquete informático del GCG con una
- 45 tabla de ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud del hueco de 12 y una penalización por hueco de 4. En otra realización más, un polipéptido usado como inmunógeno comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a una molécula de ácido nucleico que consiste en SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47 en condiciones de hibridación de SSC a 6X a 45 °C y lavado en SSC a 0,2X y SDS al 0,1% a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C, o SSC a 6X a 45 °C y
- 50 lavado en SSC a 0,1X y SDS al 0,2% a 68 °C.

- La terminología «epítipos» tal y como se emplea en esta memoria se refiere a las porciones del polipéptido de TANGO 268 que tienen una actividad antigénica o inmunógena en un animal, preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente un humano. Un epítipo que tiene actividad inmunógena es un fragmento del polipéptido de TANGO 268 que desencadena una respuesta de anticuerpos en un animal. Un epítipo que tiene actividad
- 55 antigénica es un fragmento de un polipéptido de TANGO 268 o un fragmento del mismo al que un anticuerpo se fija inmuno-específicamente *in vivo* o *in vitro* tal y como se determina mediante cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante los inmunoensayos descritos en la presente memoria. Los epítipos englobados por el péptido antigénico son regiones que se localizan en la superficie de la proteína, por ejemplo, regiones hidrófilas. Alternativamente, los epítipos englobados por los péptidos antigénicos son regiones que se
 - 60 localizan dentro de las proteínas, y/o epítipos expuestos en formas desnaturalizadas o parcialmente desnaturalizadas de los polipéptidos de la invención. Las figuras 2 y 7 son gráficos de hidropatía de las proteínas de la invención. Estos gráficos, o análisis similares, se pueden usar para identificar las regiones hidrófilas. Además, un

epítipo puede englobar, además de un polipéptido o polipéptidos de la invención, una modificación postraducciona (por ejemplo, glucosilación, tal como, por ejemplo, N- u O-glucosilación del polipéptido o polipéptidos).

Típicamente se utiliza un inmunógeno para preparar anticuerpos mediante la inmunización de un sujeto adecuado (por ejemplo, conejo, cabra, ratón u otro mamífero). Una preparación inmunógena adecuada puede contener, por ejemplo, un polipéptido expresado por recombinación o sintetizado químicamente. La preparación puede incluir además un adyuvante, tal como el adyuvante de Freund completo o incompleto, o un inmunoestimulante similar.

Por consiguiente, también se describe en la presente memoria los anticuerpos dirigidos contra un polipéptido de la invención. La terminología «anticuerpo», tal y como se emplea en esta memoria se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, esto es, moléculas que contienen un sitio de fijación a antígenos que se fija específicamente a un antígeno, tal como un polipéptido de la invención, por ejemplo, un epítipo de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos incluyen, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, Fv de una sola cadena (scFv), anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), fragmentos F(ab), fragmentos F(ab')₂, y fragmentos de fijación a epítopos de uno cualquiera de los anteriores. Una molécula que se fija específica o inmuno específicamente a un polipéptido de la invención o a un fragmento del mismo es una molécula que se fija al polipéptido, pero que no se fija sustancialmente a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que contiene de forma natural el polipéptido.

Los anticuerpos pueden tener un origen animal, que incluye pájaros y mamíferos (por ejemplo, humano, ratón, burro, conejo, oveja, conejillo de indias, camello, caballo o pollo). En una realización, los anticuerpos de la invención se originan en mamíferos no humanos, tales como ratones, ratas, ovejas y cabras. En otra realización, los anticuerpos de la invención son anticuerpos humanos o humanizados. Tal y como se emplea en esta memoria, los anticuerpos «humanos» incluyen los anticuerpos que tienen la secuencia de aminoácidos de una inmunoglobulina humana e incluyen los anticuerpos aislados de genotecas de inmunoglobulinas humanas. En una realización preferente, los anticuerpos de la invención son anticuerpos monoclonales humanos o humanizados. La terminología «anticuerpos monoclonales», «anticuerpo monoclonal» o «composición de anticuerpo monoclonal», tal y como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una población de moléculas de anticuerpos que contiene sólo una especie de un sitio de fijación al antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo determinado.

Los anticuerpos pueden ser mono específicos, biespecíficos, triespecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido TANGO 268 o pueden ser específicos tanto para un polipéptido TANGO 268 como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o un material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT de patente internacional WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., *J. Immunol.* 147: 60-69 (1991); patentes de los EE.UU. n.º 4 474 893; 4 714 681; 4 925 648; 5 573 920; 5 601 819; y Kostelny et al., *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992);

El anticuerpo tiene una constante de disociación o K_d de menos de 10^{-2} M, de menos de 5×10^{-2} M, de menos de 10^{-3} M, de menos de 5×10^{-3} M, de menos de 10^{-4} M, de menos de 5×10^{-4} M, de menos de 10^{-5} M, de menos de 5×10^{-5} M, de menos de 10^{-6} M, de menos de 5×10^{-6} M, de menos de 10^{-7} M, de menos de 5×10^{-7} M, de menos de 10^{-8} M, de menos de 5×10^{-8} M, de menos de 10^{-9} M, de menos de 5×10^{-9} M, de menos de 10^{-10} M, de menos de 5×10^{-10} M, de menos de 10^{-11} M, de menos de 5×10^{-11} M, de menos de 10^{-12} M, de menos de 5×10^{-12} M, de menos de 10^{-13} M, de menos de 5×10^{-13} M, de menos de 10^{-14} M, de menos de 5×10^{-14} M, de menos de 10^{-15} M, o de menos de 5×10^{-15} M.

Se pueden preparar anticuerpos policlonales tal y como se describió anteriormente al inmunizar un sujeto adecuado con un polipéptido de la invención a modo de inmunógeno. Las composiciones de anticuerpos policlonales preferentes son las que se han seleccionado para los anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención. Las preparaciones de anticuerpos policlonales particularmente preferentes son las que contienen sólo anticuerpos dirigidos contra un polipéptido o polipéptidos de la invención. Las composiciones de inmunógenos particularmente preferentes son las que no contienen otras proteínas humanas tales como, por ejemplo, composiciones de inmunógenos hechas con una célula hospedadora no humana para la expresión recombinante de un polipéptido de la invención. De tal manera, como parte de un polipéptido o polipéptidos descritos en la presente memoria, solo estarán presentes el epítipo o epítopos humanos reconocidos por las composiciones de anticuerpos resultantes generados contra este inmunógeno.

Se puede seguir de cerca la titulación del anticuerpo en el sujeto inmunizado a lo largo del tiempo mediante técnicas estándares, tales como el ensayo de inmunoadsorción por enzimas (ELISA) con un polipéptido inmovilizado. Si se desea, se pueden aislar del mamífero (por ejemplo, de la sangre) las moléculas del anticuerpo y purificarlas adicionalmente mediante técnicas bien conocidas, tales como cromatografía con proteína A, para obtener la fracción de IgG. Alternativamente, los anticuerpos específicos contra una proteína o polipéptido de la invención se pueden seleccionar (p. ej., parcialmente purificado) o purificar, p. ej., mediante cromatografía de afinidad. Por ejemplo, una proteína expresada por técnicas recombinantes y purificada (o parcialmente purificada) de la invención se genera como se describe en la presente memoria, y se conjuga covalente o no covalentemente a un soporte sólido tal como, por ejemplo, una columna de cromatografía. A continuación se puede utilizar la columna para purificar por

- afinidad los anticuerpos específicos contra las proteínas de la invención a partir de una muestra que contiene anticuerpos dirigidos contra un gran número de epítomos diferentes, por lo que se genera una composición de anticuerpos sustancialmente purificados, a saber, una que está sustancialmente libre de anticuerpos contaminantes. Con una composición de anticuerpos sustancialmente purificados se entiende, en este contexto, que la muestra de anticuerpos contiene como mucho sólo el 30% (en peso en seco) de anticuerpos contaminantes dirigidos contra epítomos diferentes a los de la proteína o polipéptido de la invención deseados y, preferentemente como mucho el 20%, aún más preferentemente como mucho el 10% y lo más preferentemente como mucho el 5% (en peso en seco), de la muestra son anticuerpos contaminantes. Una composición de anticuerpo purificado significa que al menos el 99% de los anticuerpos en la composición están dirigidos contra la proteína o polipéptido deseados.
- 10 Transcurrido un tiempo adecuado después de la inmunización, por ejemplo, cuando la titulación del anticuerpo específico es la más alta, las células productoras de anticuerpo se pueden obtener del sujeto y se pueden utilizar para preparar anticuerpos monoclonales mediante técnicas estándares, tales como la técnica de hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein, 1975, *Nature* 256: 495-497, la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (Kozbor et al., 1983, *Immunol. Today* 4: 72), la técnica de EBV-hibridoma (Cole et al. (1985), *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96) o las técnicas de trioma. La tecnología para producir hibridomas se conoce bien (véase de forma general *Current Protocols in Immunology* (1994) Coligan et al. (eds.) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY). Las células de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se detectan al rastrear los sobrenadantes de cultivo del hibridoma en busca de los anticuerpos que se fijan al polipéptido de interés, p. ej., mediante un ensayo ELISA estándar.
- 20 Una alternativa a la preparación de hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales, se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal dirigido contra un polipéptido de la invención mediante detección selectiva de una genoteca combinatoria recombinante de inmunoglobulinas (p. ej., una genoteca de exposición de anticuerpos en bacteriófagos) con el polipéptido de interés. Los kits para generar y rastrear genotecas de exposición en bacteriófagos están disponibles comercialmente (por ejemplo, el Recombinant Phage Antibody System de Pharmacia, n.º de catálogo 27-9400-01; y el kit de exposición en bacteriófagos SurfZAP™ de Stratagene, n.º de catálogo 240612). Además, se pueden encontrar ejemplos de métodos y reactivos particularmente adecuados para utilizarlos en la generación y detección de una genoteca de exposición de anticuerpos en, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 5 223 409; la publicación PCT de patente internacional n.º WO 92/18619; la publicación PCT de patente internacional n.º WO 91/17271; la publicación PCT de patente internacional n.º WO 92/20791; la publicación PCT de patente internacional n.º WO 92/15679; la publicación PCT de patente internacional n.º WO 93/01288; la publicación PCT de patente internacional n.º WO 92/01047; la publicación PCT de patente internacional n.º WO 92/09690; la publicación PCT de patente internacional n.º WO 90/02809; Fuchs et al., 1991, *BioTechnology* 9: 1370-1372; Hay et al., 1992, *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse et al., 1989, *Science* 246: 1275-1281; y Griffiths et al., 1993, *EMBO J.* 12: 725-734.
- 35 Además, en la presente memoria se describen los anticuerpos recombinantes, tales como anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones humanas y no humanas, que se pueden fabricar mediante técnicas estándares de ADN recombinante. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones proceden de diferentes especies de animales, como los que tienen una región variable que procede de un Acm y una región constante de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Cabilly et al., patente de los EE.UU. n.º 4 816 567; y Boss et al., patente de los EE.UU. n.º 4 816 397, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región estructural de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., Queen, patente de los EE.UU. n.º 5 585 089, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad). Tales anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados se pueden producir mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante los métodos descritos en la publicación PCT de patente internacional n.º WO 87/02671; la solicitud de patente europea 184 187; la solicitud de patente europea 171 496; la solicitud de patente europea 173 494; la patente internacional PCT n.º WO 86/01533; la patente de los EE.UU. n.º 4 816 567; la solicitud de patente europea 125 023; Better et al., 1988, *Science* 240: 1041-1043; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol* 139: 3521-3526; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.* 47: 999-1005; Wood et al., 1985, *Nature* 314: 446-449; y Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.*, 80: 1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229: 1202-1207; Oi et al., 1986, *BioTechniques* 4: 214; la patente de los EE.UU. n.º 5 225 539; Jones et al., 1986, *Nature* 321: 552-525; Verhoeyan et al., 1988, *Science* 239: 1534; y Beidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141: 4053-4060.
- 55 Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de los pacientes humanos. Tales anticuerpos se pueden generar, por ejemplo, utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes de las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas endógenas, pero que pueden expresar genes de las cadenas ligera y pesada humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan del modo normal con un antígeno determinado, p. ej., todo o una parte de un polipéptido de la invención. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno mediante la tecnología de hibridomas convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humanos hospedados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de los linfocitos B y, posteriormente, sufren el cambio de clase y la mutación somática. Por lo tanto, utilizando tal técnica, es posible producir anticuerpos de IgG, IgA e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión

general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13: 65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para generar tales anticuerpos, véase, p. ej., la patente de los EE.UU. n.º 5 625 126; la patente de los EE.UU. n.º 5 633 425; la patente de los EE.UU. n.º 5 569 825; la patente de los EE.UU. n.º 5 661 016; y la patente de los EE.UU. n.º 5 545 806. Además, compañías tales como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) se pueden encargar de la generación de anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno determinado utilizando tecnología similar a la descrita más arriba.

Se pueden generar anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo determinado mediante una técnica denominada «selección guiada». En este método se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano determinado, p. ej., un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo (Jespers et al. (1994) *BioTechnology* 12: 899-903).

Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopos específicos de TANGO 268 se podrían generar mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos Fab y F(ab')₂ de la invención mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, con enzimas tales como la papaína (para producir los fragmentos Fab) o la pepsina (para producir los fragmentos F(ab')₂). Los fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Además, también se pueden generar los anticuerpos mediante los diferentes métodos de exposición en bacteriófagos conocidos en la técnica. En los métodos de exposición en bacteriófagos, los dominios de anticuerpos funcionales se visualizan sobre la superficie de las partículas de fagos que llevan las secuencias polinucleotídicas que los codifican. En particular, las secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL se amplifican de genotecas de ADNc animal (p. ej., genotecas de ADNc de tejidos linfocíticos murinos o humanos). Los ADN que codifican los dominios VH y VL se recombinan juntos con un conector scFv mediante PCR y se clonan en un vector fagémido (p. ej., pCANTAB6 o pComb3HSS). El vector se introduce por electroporación en *E. coli* y se infecta *E. coli* con el fago ayudante. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos, que incluyen fd y M13, y los dominios VH y VL normalmente se fusionan por recombinación al gen III o al gen VIII del fago. El fago que expresa un dominio de fijación al antígeno que se fija a un antígeno de TANGO 268 se puede seleccionar o identificar con un antígeno, p. ej., mediante antígeno marcado o antígeno fijado o capturado a una superficie sólida o a una perla. Ejemplos de métodos de exposición en bacteriófagos que se pueden utilizar para construir los anticuerpos de la presente invención incluyen los descritos en Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182: 41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184: 177-186 (1995); Kettlehorrough et al., *Eur. J. Immunol.* 24: 952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187: 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57: 191-280 (1994); la solicitud de patente internacional PCT n.º PCT/GB91/01 134; las publicaciones PCT de patente internacional WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/1 1236; WO 95/15982; WO 95/20401; WO 97/13844; y las patentes de los EE.UU. n.º 5 698 426; 5 223 409; 5 403 484; 5 580 717; 5 427 908; 5 750 753; 5 821 047; 5 571 698; 5 427 908; 5 516 637; 5 780 225; 5 658 727; 5 733 743 y 5 969 108;

Tal y como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes de anticuerpos del fago se pueden aislar y utilizar para generar anticuerpos completos, que incluyen los anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de fijación al antígeno deseado, y expresarse en cualquier hospedador deseado, incluidas las células de mamíferos, las células de insectos, las células vegetales, levadura y bacterias, p. ej., como se describe más adelante. También se pueden emplear las técnicas para producir fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ por recombinación mediante los métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la publicación PCT de patente internacional WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6): 864-869 (1992); y Sawai et al., *AJRI* 34: 26-34 (1995); y Better et al., *Science* 240: 1041-1043 (1988).

Para generar anticuerpos completos (a saber, anticuerpos de IgG) o fragmentos Fab, los cebadores de PCR que incluyen las secuencias nucleotídicas de VH o VL, un sitio de restricción y una secuencia flanqueante para proteger el sitio de restricción se pueden utilizar para amplificar las secuencias de VH o VL en los clones de scFv. Utilizando técnicas de clonación como las conocidas por los expertos en la técnica, los dominios VH amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante de VH, p. ej., la región constante γ 4 humana, y los dominios VL amplificados por PCR se pueden clonar en vectores que expresan una región constante de VL, p. ej., las regiones constantes κ o λ humanas. Preferentemente, los vectores que expresan los dominios VH o VL en células eucariotas comprenden vectores pcDNA3 que contienen los promotores de CMV o de EF-1a, una señal de secreción, un sitio de clonación para el dominio variable, dominios constantes y un marcador de selección tal como neomicina o DHFR. Los vectores para expresar los dominios VH o VL en *E. coli* comprenden promotores, el dominio constante de la IgG humana (CH1 y CL), secuencias líder (pelB, ompA o gIII), un sitio de clonación para el dominio variable y un marcador de selección como la kanamicina. Los dominios VH y VL también se pueden clonar en un vector que expresa las regiones constantes necesarias. Luego, los vectores de conversión de cadena pesada y los vectores de conversión de cadena ligera se contranfectan en *E. coli* o líneas de células eucariotas para generar líneas celulares estables o transitorias que expresan los anticuerpos completos, p. ej. IgG, o fragmentos Fab, mediante las técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los fragmentos Fab activos producidos por líneas de células transfectadas estables o transitorias se recuperarán mediante cromatografía de proteína A. El anticuerpo IgG producido por líneas celulares transfectadas transitorias o estables se purificará por cromatografía con proteína A. La IgG producida mediante este método puede someterse a digestión enzimática (p. ej., papaína) para liberar los

fragmentos Fab o (Fab')₂. El fragmento Fc digerido se capturaría utilizando cromatografía de afinidad de la proteína G y el fragmento Fab o (Fab')₂ se recogerá en el flujo directo. La especificidad y la actividad de los anticuerpos producidos se puede analizar al utilizar los ensayos descritos en la presente memoria, tales como inmunoensayos.

- La presente invención descrita también incluye anticuerpos que tienen una semivida en un animal, preferentemente un mamífero y lo más preferentemente un humano, de más de 10 días, preferentemente de más de 15 días, de más de 25 días, de más de 30 días, de más de 35 días, de más de 40 días, de más de 45 días, de más de 2 meses, de más de 3 meses, de más de 4 meses o de más de 5 meses. Para prolongar la circulación *in vivo* en el suero de los anticuerpos (p. ej., anticuerpos monoclonales, anticuerpos de una sola cadena y fragmentos Fab), por ejemplo, se pueden pegar moléculas de polímeros inertes tales como polietilenglicol (PEG) de alto peso molecular a los anticuerpos con o sin un conector multifuncional, bien a través de una conjugación específica de sitio del PEG al extremo amino o carboxilo de los anticuerpos, o bien a través de los grupos ε-amino presentes en restos lisina. Se utilizará la modificación de polímero lineal o ramificado que da lugar a una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se seguirá de cerca mediante SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurarse de que la conjugación de las moléculas de PEG a los anticuerpos es la debida. Se separarán el PEG sin reaccionar y los conjugados anticuerpo-PEG mediante cromatografía de exclusión por tamaños o de intercambio iónico. A los anticuerpos modificados con PEG se les puede analizar la actividad de fijación así como la eficacia *in vivo* mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, mediante los inmunoensayos descritos en la presente memoria. Además, se pueden generar anticuerpos con una mayor semivida *in vivo* como se describe en la publicación PCT de patente internacional n.º WO 97/34631.
- En la presente descripción se incluyen los anticuerpos sustancialmente purificados o un fragmento de los mismos, que incluyen los anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y humanizados, cuyos anticuerpos o fragmentos se fijan específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o una secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas. En la presente descripción se incluyen los anticuerpos sustancialmente purificados o los anticuerpos monoclonales humanizados que se fijan específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o una secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas.
- En la presente descripción se incluyen anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos, que incluyen los anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y humanizados, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se fijan específicamente a un polipéptido que comprende un fragmento de al menos 8 restos aminoacídicos contiguos, preferentemente al menos 10 o al menos 15 restos aminoacídicos contiguos, de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o una secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como n.º de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas. En la presente descripción se incluyen los anticuerpos sustancialmente purificados o los anticuerpos monoclonales humanizados que se fijan específicamente a un polipéptido que comprende un fragmento de al menos 8 restos aminoacídicos contiguos, preferentemente al menos 15 restos aminoacídicos contiguos, de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o una secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas.
- En la presente descripción se incluyen anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos, que incluyen los anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y humanizados, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se fijan específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 65%, preferentemente al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 95% o al menos el 98% a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, en donde el porcentaje de identidad se determina con el programa ALIGN del paquete informático del GCG con una tabla ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.
- En la presente descripción se incluyen los anticuerpos sustancialmente purificados humanos o los anticuerpos monoclonales humanizados que se fijan específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos el 65%, preferentemente al menos el 75%, al menos el 85%, al menos el 95% o al menos el 98% a la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, en donde el porcentaje de identidad se determina mediante el programa ALIGN del paquete informático del GCG con una tabla ponderación de restos PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.
- En la presente descripción se incluyen anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos, que incluyen los anticuerpos humanos, no humanos, quiméricos y humanizados, cuyos anticuerpos o fragmentos de los mismos se fijan específicamente a un polipéptido que comprende, y a una secuencia de aminoácidos que está codificada por, una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico que consiste en una cualquiera de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o el inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de

- las mismas, en las condiciones de hibridación de SSC a 6X a 45 °C y de lavado en SSC a 0,2X y SDS al 0,1% a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C, o SSC a 6X a 45 °C y lavado en SSC a 0,1X y SDS al 0,2% a 68 °C. En la presente descripción se incluyen los anticuerpos sustancialmente purificados o los anticuerpos monoclonales humanizados que se fijan específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que está codificada por una molécula de ácido nucleico que se hibrida a la molécula de ácido nucleico que consiste en una cualquiera de SEQ ID n.º 1, 2, 14, 15, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45 o 47, o el inserto de ADNc de un clon depositado en la ATCC® como número de acceso 207180 o como número de depósito de patente PTA-225, o un complemento de las mismas, en las condiciones de hibridación de SSC a 6X a 45 °C y de lavado en SSC a 0,2X y SDS al 0,1% a 50 °C, 55 °C, 60 °C o 65 °C, o SSC a 6X a 45 °C y lavado en SSC a 0,1X y SDS al 0,2% a 68 °C.
- 10 Los anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos policlonales, monoclonales, fragmentos Fab de una sola cadena o fragmentos F(ab')₂. Los anticuerpos no humanos o fragmentos de los mismos pueden ser anticuerpos de cabra, ratón, oveja, caballo, pollo, conejo o rata, o fragmentos de anticuerpos. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales que se fijan específicamente a un polipéptido descrito en la presente memoria.
- 15 Los anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos se fijan específicamente a un péptido señal, a una secuencia secretada, a un dominio extracelular, a un dominio transmembranario o citoplasmático de un polipéptido de la invención. Los anticuerpos sustancialmente purificados o fragmentos de los mismos se pueden fijar específicamente a una secuencia secretada o un dominio extracelular de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 3, 16, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 o 48, o la secuencia de aminoácidos codificada por el inserto de ADNc de EpthEal I dl o de EpTm268 de número de acceso 207180 o de número de depósito de patente PTA-225 de la ATCC®, o un complemento de las mismas. El dominio extracelular al que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se fija puede comprender al menos 8 restos aminoacídicos contiguos, preferentemente al menos 10 o al menos 15 restos aminoacídicos contiguos, de los restos aminoacídicos 30 a 206 de la SEQ ID n.º 28 (SEQ ID n.º 76), los restos aminoacídicos 272 a 370 de la SEQ ID n.º 28 (SEQ ID n.º 34), los restos aminoacídicos 30 a 249 de la SEQ ID n.º 39 (SEQ ID n.º 83), los restos aminoacídicos 39 a 123 de la SEQ ID n.º 48 (SEQ ID n.º 50), o los restos aminoacídicos 27 a 112 de la SEQ ID n.º 58 (SEQ ID n.º 61).

- En la presente memoria se describen anticuerpos que se fijan inmuno-específicamente a un polipéptido nativo de TANGO 268 o un fragmento del mismo (p. ej., un polipéptido de TANGO 268 glucosilado o un fragmento del mismo). Se describen anticuerpos que se fijan inmuno-específicamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo que carece de las modificaciones postraduccionales, tal como la glucosilación.
- 30

- En la presente memoria también se describen los scFv que tienen la secuencia de aminoácidos del clon A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11. Los scFv pueden tener la secuencia de aminoácidos de los scFv A4, A9, A10 o C3 depositados en la ATCC® como número de depósito de patente_, número de depósito de patente_, número de depósito de patente, o número de depósito de patente_, respectivamente. También se describen anticuerpos que se fijan inmuno-específicamente a un polipéptido de TANGO 268 o un fragmento del mismo y que comprende un dominio VH del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11. También se describen anticuerpos que se fijan inmuno-específicamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo y que comprenden un dominio VL del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11. También se describen anticuerpos que se fijan inmuno-específicamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo y que comprenden un dominio VH del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11 y un dominio VL del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11. En una realización preferente, los anticuerpos o fragmentos de los mismos comprenden un dominio VH y uno VL del mismo scFv.
- 35
- 40

- También se describen anticuerpos que tienen una cualquiera de las CDR de VH del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11. En la presente memoria también se describen los anticuerpos que tienen una cualquiera de las CDR de VL del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11. También se describen anticuerpos que tienen una cualquiera de las CDR de VH del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11 y una cualquiera de las CDR de VL del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11. En la presente memoria también se describen anticuerpos o fragmentos de los mismos que comprenden unas CDR de una VH y de una VL del mismo scFv. En la presente memoria también se describen anticuerpos que tienen una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia de aminoácidos del clon de scFv A9, A10, C9, A4, C10, B4, C3 o D11.
- 45
- 50

- En la presente memoria también se describen anticuerpos que se fijan inmuno-específicamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo y que se generan de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del dominio variable de cadena ligera y de la pesada de los scFv recogidos en la tabla 7. En particular, la descripción da a conocer scFv que comprenden las CDR del dominio de cadena ligera y pesada recogidas en la tabla 7 que se han «convertido» en moléculas de inmunoglobulina al insertar las secuencias nucleotídicas que codifican las CDR del dominio variable de cadena ligera («VL») y de cadena pesada («VH») de los scFv en un vector de expresión que contiene las secuencias del dominio constante y modificarlas genéticamente para dirigir la expresión de la molécula de inmunoglobulina, como se describió más arriba.
- 55

- En la presente memoria también se describen anticuerpos que se fijan inmuno-específicamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo que tienen un dominio variable de cadena pesada («VH») que comprende
- 60

de la SEQ ID n.º 52, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 53 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 54. En la presente memoria también se describen anticuerpos que se fijan inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo que comprenden una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 58, una CDR2 de VL que

5 tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 59 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 60. En la presente memoria también se describen anticuerpos que se fijan inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo que comprenden una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 64, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 65 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 66. En la presente memoria también se

10 describen anticuerpos que se fijan inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo que comprenden una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 70, una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 71 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 72.

En la presente memoria también se describen anticuerpos que comprenden una o más CDR de VH y una o más CDR de VL como se recoge en la tabla 7. En la presente memoria también se describe un anticuerpo que comprende una CDR1 de VH y una CDR1 de VL, una CDR1 de VH y una CDR2 de VL, una CDR1 de VH y una CDR3 de VL, una CDR2 de VH y una CDR1 de VL, una CDR2 de VH y una CDR2 de VL, una CDR2 de VH y una CDR3 de VL, una CDR3 de VH y una CDR1 de VH, una CDR3 de VH y una CDR2 de VL, una CDR3 de VH y una CDR3 de VL, o cualquiera de sus combinaciones de CDR de VH y de CDR de VL recogidas en la tabla 7.

En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la invención que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 49, 55, 61 o 67 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 52, 58, 64 o 70. En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la presente invención que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 49, 55, 61 o 67 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 53, 59, 65 o 71. En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la presente invención que comprende una CDR1 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 49, 55, 61 o 67 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 54, 60, 66 o 72.

En la presente memoria también se describe un anticuerpo que comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 50, 56, 62, 68 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 52, 58, 64 o 70. En la presente memoria también se describe un anticuerpo que comprende una CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 50, 56, 62, 68 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 53, 59, 65 o 71. En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la presente invención que comprende un CDR2 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 50, 56, 62 o 68 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 54, 60, 66 o 72.

En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la presente invención que comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 51, 57, 63 o 69 y una CDR1 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 52, 58, 64, 70. En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la presente invención que comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 51, 57, 63 o 69 y una CDR2 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 53, 59, 65 o 71. En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la presente invención que comprende una CDR3 de VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 51, 57, 63 o 69 y una CDR3 de VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 54, 60, 66 o 72.

En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico, generalmente aislada, que codifica un anticuerpo de la invención. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR de VH recogidas en la tabla 7. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR1 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR1 de VH recogidas en la tabla 7, y una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR2 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR2 de VH recogidas en la tabla 7. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR3 de VH que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR3 de VH recogidas en la tabla 7.

En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR de VL recogidas en la tabla 7. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR1 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR1 de VL recogidas en la tabla 7. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR2 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR2 de VL recogidas en la tabla 7. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR3 de VL que tiene una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las CDR3 de VL recogidas en la tabla 7.

En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una CDR1 de VH, una CDR1 de VL, una CDR2 de VH, una CDR2 de VL, una CDR3 de VH, una CDR3 de VL, o cualquier combinación de las mismas que tenga una secuencia de aminoácidos recogida en la tabla 7.

En la presente memoria también se describen anticuerpos que comprenden derivados de las CDR de VH y de las CDR de VL descritas en la presente memoria cuyos anticuerpos se fijan inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo. Se pueden utilizar técnicas estándares conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones en la secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de la invención, que incluyen, por ejemplo, la mutagénesis específica de sitio y la mutagénesis mediante PCR, que dan lugar a sustituciones de aminoácidos. Preferentemente, los derivados incluyen sustituciones de menos de 25 aminoácidos, sustituciones de menos de 20 aminoácidos, sustituciones de menos de 15 aminoácidos, sustituciones de menos de 10 aminoácidos, sustituciones de menos de 5 aminoácidos, sustituciones de menos de 4 aminoácidos, sustituciones de menos de 3 aminoácidos o sustituciones de menos de 2 aminoácidos respecto a la molécula original. En una realización preferente, los derivados tienen sustituciones de aminoácidos conservativas en uno o más restos aminoacídicos que se predice que no son esenciales. Una «sustitución conservativa de aminoácido» es una en la que el resto aminoacídico se reemplaza por un resto aminoacídico que tiene una cadena lateral con una carga similar. Se han definido en la técnica familias de restos aminoacídicos que tienen cargas similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, glicina, asparragina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales β -ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Alternativamente, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante, tal como mediante la mutagénesis de saturación, y se pueden cribar los mutantes resultantes por la actividad biológica para identificar los mutantes que conservan la actividad. Después de la mutagénesis, se puede expresar la proteína codificada y se puede determinar la actividad de la proteína, a saber, la capacidad para fijarse inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo.

En la presente memoria también se describe un anticuerpo que se fija inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos de una CDR de VH o una secuencia de aminoácidos de una CDR de VL codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida a la secuencia de nucleótidos que codifica una cualquiera de las CDR de VH o de las CDR de VL recogidas en la tabla 7 en condiciones rigurosas, p. ej., hibridación a un ADN fijado al filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 6X a unos 45 °C seguida de uno o más lavados en SSC a 0,2X y SDS al 0,1% a unos 50-65 °C, en condiciones muy rigurosas, p. ej., hibridación al ácido nucleico fijado al filtro en SSC a 6X a unos 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC a 0,1X y SDS al 0,2% a unos 68 °C, o en otras condiciones de hibridación rigurosas que conocen los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel, F. M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, págs. 6.3.1-6.3.6 y 2.10.3). En otra realización, un anticuerpo que se fija inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de una CDR de VH y una secuencia de aminoácidos de una CDR de VL codificada por una secuencia de nucleótidos que se hibrida a las secuencias de nucleótidos que codifican una cualquiera de las CDR de VH y de las CDR de VL, respectivamente, recogidas en la tabla 7 en condiciones rigurosas, p. ej., hibridación a un ADN fijado al filtro en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a 6X a unos 45 °C seguida de uno o más lavados en SSC a 0,2X y SDS al 0,1% a unos 50-65 °C, en condiciones muy rigurosas, p. ej., hibridación al ácido nucleico fijado al filtro en SSC a 6X a unos 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC a 0,1X y SDS al 0,2% a unos 68 °C, o en otras condiciones de hibridación rigurosas que conocen los expertos en la técnica.

En la presente memoria también se describe un anticuerpo que se fija inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más CDR de VH que es idéntica al menos al 35%, al menos al 40%, al menos al 45%, al menos al 50%, al menos al 55%, al menos al 60%, al menos al 65%, al menos al 70%, al menos al 75%, al menos al 80%, al menos al 85%, al menos al 90%, al menos al 95% o al menos al 99%, a cualquiera de las CDR de VH recogidas en la tabla 7.

En la presente memoria también se describe un anticuerpo que se fija inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268 o a un fragmento del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos de una o más CDR de VL que es idéntica al menos al 35%, al menos al 40%, al menos al 45%, al menos al 50%, al menos al 55%, al menos al 60%, al menos al 65%, al menos al 70%, al menos al 75%, al menos al 80%, al menos al 85%, al menos al 90%, al menos al 95% o al menos al 99%, a cualquiera de las CDR de VL recogidas en la tabla 7.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria incluyen derivados que se modifican, a saber, mediante unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de tal forma que la unión covalente no afecta a la capacidad del anticuerpo para fijarse inmunoespecíficamente a un polipéptido de TANGO 268. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpo incluyen anticuerpos que se han modificado, p. ej., mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, modificación mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína. etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se podría llevar a cabo mediante las técnicas conocidas, que incluyen, pero sin limitarse a ellas, escisión

química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Tabla 7. Secuencias de CDR de los scFv que se fijan inmuno-específicamente a los polipéptidos de TANGO 268

Clon de scFv	VHCDR1	VHCDR2	VHCDR3	VLCDR1	VLCDR2	VLCDR3
A4	SYWIS (SEQ ID n.º 49)	RIDPSDS YTNYSPP FQG (SEQ ID n.º 50)	HGSDRGWGFD P (SEQ ID n.º 51)	NGVNSDV G (SEQ ID n.º 52)	EVNKRPS (SEQ ID n.º 53)	SYTSNNTPV (SEQ ID n.º 54)
A9	SYSMN (SEQ ID n.º 55)	SISSSGR YISYGDS VKG (SEQ ID n.º 56)	DISSAMDV (SEQ ID n.º 57)	TRGGNNI GSKSVH (SEQ ID n.º 58)	DDSDRPS (SEQ ID n.º 59)	VWDSSSDHH V (SEQ ID n.º 60)
A10	SYWMS (SEQ ID n.º 61)	NJKQDGS EKYYADS VRG (SEQ ID n.º 62)	DKWEAYITPGA FDV (SEQ ID n.º 63)	TRSSGSIA SNYVQ (SEQ ID n.º 64)	EDNQRPS (SEQ ID n.º 65)	SYDSSNVV (SEQ ID n.º 66)
C3	NYEMN (SEQ ID n.º 67)	YJSSSGS TIHNADSV KG (SEQ ID n.º 68)	DGYSHGLDAF DI (SEQ ID n.º 69)	SGSSSNI GSNTVH (SEQ ID n.º 70)	SYNQRPS (SEQ ID n.º 71)	SWDDRLNGY L n.º 72)

En la presente memoria también se describe un anticuerpo que tiene la secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal murino producido por la línea celular de hibridoma murino 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2. En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la invención que tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal murino producido por la línea celular de hibridoma murino 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2.

En la presente memoria también se describe un anticuerpo de la invención que tiene la secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo monoclonal murino producido por la línea celular de hibridoma murino 9012.2, 1P10.2, 8M14.3, 9E18.2 o 7H4.6 depositada con la ATCC® como número de depósito de patente PTA-1746, número de depósito de patente PTA-1747, número de depósito de patente PTA-1748, número de depósito de patente PTA-1749 o número de depósito de patente PTA-1750, respectivamente. En la presente memoria también se describe un anticuerpo que tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal murino producido por la línea celular de hibridoma murino 9012.2, 1P10.2, 8M14.3, 9E18.2 o 7H4.6 depositado con la ATCC® como número de depósito de patente PTA-1746, número de depósito de patente PTA-1747, número de depósito de patente PTA-1748, número de depósito de patente PTA-1749 o número de depósito de patente PTA-1750, respectivamente.

En la presente memoria también se describen anticuerpos que comprenden un dominio VL o VH que tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2. En la presente memoria también se describen anticuerpos de la presente invención que comprenden un dominio VL o VH que tiene la secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal de ratón producido por la línea celular de hibridoma de ratón 9012.2, 1P10.2, 8M14.3, 9E18.2 o 7H4.6 depositado con la ATCC® como número de depósito de patente PTA-1746, número de depósito de patente PTA-1747, número de depósito de patente PTA-1748, número de depósito de patente PTA-1749 o número de depósito de patente PTA-1750, respectivamente. En la presente memoria también se describen anticuerpos que comprenden un dominio VL y VH que tiene la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2. En la presente memoria también se describen anticuerpos que comprenden dominios VL y VH que tienen la secuencia de aminoácidos de anticuerpo monoclonal de ratón producida por la línea celular de hibridoma de ratón 9012.2, 1P10.2, 8M14.3, 9E18.2 o 7H4.6 depositada con la ATCC® como número de depósito de patente PTA-1746, número de depósito de patente PTA-1747, número de depósito de patente PTA-1748, número de depósito de patente PTA-1749 o número de depósito de patente PTA-1750, respectivamente.

En la presente memoria también se describen anticuerpos que comprenden una o varias CDR de VL o CDR de VH que tienen la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2. En la presente memoria también se describen anticuerpos de la presente invención que comprenden una o varias CDR de VL o CDR de VH que tienen la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por la línea celular de hibridoma de ratón 9012.2, 1P10.2, 8M14.3, 9E18.2 o 7H4.6 depositado con la ATCC® como número de depósito de patente PTA-1746, número de depósito de patente PTA-1747, número de depósito de patente PTA-1748, número de depósito de patente PTA-1749 o número de depósito de patente PTA-1750, respectivamente.

En la presente memoria también se describen anticuerpos que comprenden las CDR de VL y una o varias CDR de VH que tienen la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2. En la presente memoria también se describen anticuerpos que comprenden una o varias CDR de VL y una o varias CDR de VH que

5 tienen la secuencia de aminoácidos del anticuerpo monoclonal de ratón producido por la línea celular de hibridoma de ratón 9012.2, 1P10.2, 8M14.3, 9E18.2 o 7H4.6 depositado con la ATCC® como número de depósito de patente PTA-1746, número de depósito de patente PTA-1747, número de depósito de patente PTA-1748, número de depósito de patente PTA-1749 o número de depósito de patente PTA-1750, respectivamente.

En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico, generalmente aislada, que codifica un anticuerpo monoclonal de ratón producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende uno o más dominios de VH o VL del anticuerpo monoclonal murino producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende uno o más dominios de VH y uno o más dominios de VL del anticuerpo monoclonal murino producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2. En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una o varias CDR de VH o una o varias de CDR de VL del anticuerpo monoclonal murino producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2.

10 20

En la presente memoria también se describe una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo que comprende una o varias CDR de VH y una o varias CDR de VL del anticuerpo monoclonal murino producido por la línea celular de hibridoma de ratón 8M14.3, 3F8.1, 9E18.3, 3J24.2, 6E12.3, 1P10.2, 4L7.1, 4L7.3, 7H4.6 o 9012.2.

A los anticuerpos descritos en la presente memoria se les puede ensayar la fijación inmuno-específica a un polipéptido de TANGO 268 o fragmentos del mismo y la reactividad cruzada con otros antígenos mediante cualquier método conocido en la técnica. Los inmunoensayos que se pueden utilizar para analizar la fijación inmuno-específica y la reactividad cruzada incluyen, pero sin limitarse a ellos, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos que utilizan técnicas tales como análisis de inmunotransferencia, radioinmunoensayos, ELISA (inmunoensayo enzimático), inmunoensayos de tipo sándwich, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por nombrar unos cuantos. Tales ensayos son rutinarios y se conocen bien en la técnica (véase, p. ej., Ausubel et al, eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, que se incorpora por referencia en su totalidad en la presente memoria).

25 30

Se puede utilizar el análisis cinético BIAcore para determinar la tasa de fijación y de disociación de los anticuerpos a un polipéptido de TANGO 268. El análisis cinético BIAcore comprende el análisis de la fijación y la disociación de un polipéptido de TANGO 268 de los chips con anticuerpos inmovilizados en su superficie (véase el apartado de ejemplos más adelante).

35

Se puede utilizar un anticuerpo dirigido contra un polipéptido descrito en la presente memoria (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) para aislar el polipéptido mediante técnicas estándares, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación. Además, se puede utilizar tal anticuerpo para detectar la proteína (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante de células) para evaluar la abundancia del polipéptido y su patrón de expresión. Se pueden utilizar también los anticuerpos a modo de diagnóstico para seguir de cerca la cantidad de proteína en el tejido como parte de un procedimiento de pruebas clínicas para, por ejemplo, determinar la eficacia de una posología terapéutica determinada. La detección se puede facilitar conjugando el anticuerpo a una sustancia detectable. Ejemplos de sustancias detectables incluyen diferentes enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen la peroxidasa de rábano picante, la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa o la acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos con grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y eucorina, y ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

40 45 50

Además, se puede conjugar un anticuerpo (o un fragmento del mismo) a un resto terapéutico tal como una citotoxina, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina, y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a ellos, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo descarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa

55 60

clorambucilo, melfalán, carmustina [BSNU] y lomustina [CCNU], ciclofosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) [DDP cisplatino], antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina [anteriormente daunomicina] y doxorrubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina [antiguamente actinomicina], bleomicina, mitramicina y antramicina [AMC]) y agentes antimitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Se pueden utilizar los conjugados para modificar una respuesta biológica determinada, y no se interpretará que el resto farmacológico se limita a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína tal como el factor de la necrosis tumoral, el interferón α , el interferón β , factor de crecimiento del nervio, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, el activador tisular del plasminógeno; o modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina 1 («IL-1»), interleucina 2 («IL-2»), interleucina 6 («IL-6»), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos («GM-CSF»), factor estimulante de colonias de granulocitos («G-CSF») u otros factores del crecimiento.

Las técnicas para conjugar un resto terapéutico a anticuerpos se conocen bien, véase, p. ej., Arnon et al., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., «Antibodies For Drug Delivery», en *Controlled Drug Delivery* (2ª ed.), Robinson et al. (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), págs. 475-506 (1985); «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

Alternativamente, se puede conjugar un anticuerpo a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo tal y como describe Segal en la patente de los EE.UU. n.º 4 676 980.

La descripción también da a conocer un kit que contiene un anticuerpo descrito en la presente memoria conjugado a una sustancia detectable, e instrucciones de uso. También se describe una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo descrito en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente descripción puede contener un anticuerpo como el descrito en la presente memoria, un resto terapéutico, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En los casos en los que el anticuerpo se vaya a utilizar como un fármaco, se puede ensayar sistemáticamente la caracterización del anticuerpo mediante los métodos presentados en la presente memoria. Por ejemplo, el hecho de que las plaquetas estén fácilmente disponibles, junto con la disponibilidad de numerosos ensayos para el funcionamiento de las plaquetas, proporciona pruebas y análisis sistemáticos (p. ej., para análisis y pruebas *in vitro*) de tales anticuerpos.

Por ejemplo, la caracterización farmacodinámica *in vivo* de los anticuerpos anti-TANGO 268 se puede facilitar mediante la disponibilidad de diferentes ensayos de plaquetas (p. ej., prolongación del tiempo de hemorragia, medición cuantitativa del bloqueo del receptor TANGO 268, inhibición de la agregación plaquetaria *ex vivo*) tal como los descritos en la presente memoria que se pueden correlacionar entre sí para permitir una evaluación más eficaz de la consecuencias funcionales de un modulador. Por lo tanto, la correlación que pueda existir entre tales ensayos garantiza que la caracterización *in vitro* de un anticuerpo anti-TANGO 268 se aplica más directamente a la medición del efecto terapéutico del anticuerpo.

Además de utilizar la disponibilidad de las plaquetas y los ensayos de plaquetas para evaluar la eficacia terapéutica, incluida la eficacia clínica, de un anticuerpo anti-TANGO 268, también se puede utilizar esta disponibilidad para los aspectos de desarrollo preclínico de fármacos tales como la determinación de la respuesta a la dosis del anticuerpo, toxicología, magnitud del efecto (por ejemplo, magnitud del efecto inicial y magnitud de la duración del efecto), función, especificidad (p. ej., especificidad con respecto a determinadas funciones de las plaquetas), especificidad del receptor y especificidad de especie (que, a su vez, puede identificar modelos de animales apropiados para los estudios de farmacología).

III. Vectores de expresión recombinantes y células hospedadoras

Otro aspecto de la invención hace referencia a vectores, preferentemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención (o una porción del mismo). Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «vector» se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico a la que está unida. Un tipo de vector es un «plásmido», que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden ligar otros segmentos de ADN. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde se pueden ligar otros segmentos de ADN en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicarse autónomamente en una célula hospedadora en la que son introducidos (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episómicos de mamíferos). Otros vectores (por ejemplo,

vectores no episómicos de los mamíferos) se integran en el genoma de una célula hospedadora una vez que se han introducido en la célula hospedadora y, de este modo, se replican junto con el genoma hospedador. Además, algunos vectores, los vectores de expresión, son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que se unen operativamente. Por lo general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante a menudo están en forma de plásmidos (vectores). Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados incapaces de replicarse autónomamente), que proporcionan funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora. Esto significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas en función de las células hospedadoras a utilizar para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia de ácido nucleico a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, «operativamente unido» pretende significar que la secuencia nucleotídica de interés está unida a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de manera que permite la expresión de la secuencia nucleotídica (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora). La terminología «secuencia reguladora» pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos del control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, «Gene Expression Technology: Methods in Enzymology» 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las secuencias reguladoras incluyen las que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en algunas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedadora a transformar, el nivel de expresión deseado de la proteína, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células hospedadoras para de ese modo producir proteínas o péptidos, que incluyen proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos como los descritos en la presente memoria.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención se pueden diseñar para la expresión de un polipéptido de la invención en las células procariotas (p. ej., *E. coli*) o eucariotas (p. ej., células de insecto [mediante vectores de expresión baculovíricos], células de levadura o células de mamífero). Las células hospedadoras adecuadas se explican con más detalle en Goeddel (véase más arriba). Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo, mediante las secuencias reguladoras del promotor de T7 y la polimerasa de T7.

La expresión de las proteínas en los procariotas se realiza la mayoría de las veces en *E. coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de las proteínas de fusión o sin fusionar. Los vectores de fusión añaden una serie de aminoácidos a una proteína codificada en éstos, normalmente al extremo amino de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión típicamente sirven para tres propósitos; 1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar a purificar la proteína recombinante al actuar como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de la fusión se introduce un sitio de escisión proteolítico en la unión entre la parte de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la parte de fusión después de purificar la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento cognadas, incluyen el factor Xa, la trombina y la enterocinasa. Los vectores típicos de expresión de fusiones incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D. B. y Johnson, K. S. (1988) *Gene* 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan la glutatión-S-transferasa (GST), la proteína E de fijación a maltosa, o la proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Ejemplos de vectores de expresión en *E. coli* inducibles adecuados que no son de fusión incluyen pTrc (Amann et al., 1988, *Gene* 69: 301-315) y pET-11d (Studier et al., «Gene Expression Technology: Methods in Enzymology» 185, Academic Press, San Diego, California (1990), págs. 60-89). La expresión del gen diana en el vector pTrc se basa en la transcripción con la ARN polimerasa del hospedador desde un promotor de fusión híbrido *trp-lac*. La expresión del gen deseado desde el vector pET-11d se basa en la transcripción a partir de un promotor de fusión *gn10* de T7-*lac* mediante la coexpresión de una ARN polimerasa vírica (*gn1* de T7). Esta polimerasa vírica la suministran las cepas hospedadoras BL21 (DE3) o HMS 174(DE3) a partir de un profago λ residente que alberga un gen *gn1* de T7 bajo el control transcripcional del promotor *lacUV5*.

Una estrategia para aumentar al máximo la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora que no es capaz de escindir proteolíticamente la proteína recombinante (Gottesman, «Gene Expression Technology: Methods in Enzymology» 185, Academic Press, San Diego, California (1990), págs. 119-128). Otra estrategia es alterar la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico a insertar en un vector de expresión de tal forma que cada uno de los codones de cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli* (Wada et al. 1992, *Nucleic Acids Res.* 20: 2111-2118). Tal alteración de las secuencias de ácido nucleico de la invención se puede realizar mediante técnicas estándares de síntesis de ADN.

En otra realización, el vector de expresión es un vector de expresión de levaduras. Ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari et al., 1987, *EMBO J.* 6: 229-234), pMFa (Kurjan y

Herskowitz, 1982, *Cell* 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al., 1987, *Gene* 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA), y pPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA).

Alternativamente, el vector de expresión es un vector de expresión baculovírico. Los vectores baculovíricos disponibles para la expresión de proteínas en las células de insectos cultivadas (p. ej., células Sf 9) incluye la serie pAc (Smith et al., 1983, *Mol. Cell Biol.* 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers, 1989, *Virology* 170: 31-39).

En otra realización más, se expresa un ácido nucleico de la invención en células de mamíferos mediante un vector de expresión de mamíferos. Ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen pCDM8 (Seed, 1987, *Nature* 329: 840) y pMT2PC (Kaufman et al., 1987, *EMBO J.* 6: 187-195). Cuando se utiliza en células de mamíferos, las funciones de control del vector de expresión a menudo las proporcionan elementos reguladores víricos. Por ejemplo, los promotores que se utilizan corrientemente proceden de polio, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para las células procariotas como para las eucariotas, véanse los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J. et al. (véase más arriba).

En otra realización, el vector de expresión recombinante de mamíferos es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico preferentemente en un tipo determinado de células (por ejemplo, se utilizan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido se conocen en la técnica. Ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido adecuados incluyen el promotor de la albúmina (específico del hígado; Pinkert et al., 1987, *Genes Dev.* 1: 268-277), promotores específicos linfocíticos (Calame y Eaton, 1988, *Adv. Immunol.* 43: 235-275), en particular promotores de receptores en los linfocitos T (Winoto y Baltimore, 1989, *EMBO J.* 8: 729-733) e inmunoglobulinas (Banerji et al., 1983, *Cell* 33: 729-740; Queen y Baltimore, 1983, *Cell* 33: 741-748), promotores específicos de las neuronas (e.g., el promotor del neurofilamento; Byrne y Ruddle, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5473-5477), promotores específicos del páncreas (Edlund et al., 1985, *Science* 230: 912-916) y promotores específicos de las glándulas mamarias (p. ej., promotor de suero de la leche; patente de los EE.UU. n.º 4 873 316 y publicación de la solicitud europea n.º 264 166). También se incluyen promotores regulados por el desarrollo, por ejemplo, los promotores *hox* de ratón (Kessel y Gruss (1990) *Science* 249: 374-379) y el promotor de la β -fetoproteína (Campes y Tilghman (1989) *Genes Dev.* 3: 537-546).

La invención da a conocer además un vector de expresión recombinante que comprende una molécula de ADN de la invención clonada en el vector de expresión en orientación antisentido. Es decir, la molécula de ADN está operativamente unida a una secuencia reguladora de tal forma que permite la expresión (mediante la transcripción de la molécula de ADN) de una molécula de ARN que es antisentido al ARNm que codifica un polipéptido de la invención. Se pueden elegir secuencias reguladoras operativamente unidas a un ácido nucleico clonado en la orientación antisentido que dirigen la expresión continua de la molécula de ARN antisentido en numerosos tipos de células, por ejemplo, promotores y/o potenciadores víricos, o se pueden elegir secuencias reguladoras que dirigen la expresión del ARN antisentido de forma constitutiva, histoespecífica o específica del tipo celular. El vector de expresión antisentido puede estar en forma de plásmido recombinante, fagémido o virus atenuado en los que los ácidos nucleicos antisentido se producen bajo el control de una región reguladora muy eficaz, cuya actividad se puede determinar por el tipo de célula en el cual se introduce el vector. Para una explicación de la regulación de la expresión génica utilizando genes antisentido véase Weintraub et al. (*Reviews - Trends in Genetics*, Vol. 1(1) 1986).

Otro aspecto de la invención hace referencia a células hospedadoras en las que se ha introducido el vector de expresión recombinante de la invención. La terminología «célula hospedadora» y «célula hospedadora recombinante» se utilizan de forma intercambiable en la presente memoria. Se entiende que tal terminología se refiere no sólo a la célula particular en cuestión, sino a la descendencia o a la posible descendencia de tal célula. Dado que se pueden producir determinadas modificaciones en las sucesivas generaciones debido a la influencia de mutaciones o medioambiental, tal descendencia podría, de hecho, no ser idéntica a la célula original, pero se sigue incluyendo dentro del alcance de la terminología tal y como se utiliza en la presente memoria.

Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota (p. ej., *E. coli*) o eucariota (p. ej., células de insectos, células de levadura o de mamífero).

El ADN del vector se puede introducir en las células procarióticas o eucarióticas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal y como se emplea en la presente memoria, con la terminología «transformación» y «transfección» se pretende hacer referencia a una serie de técnicas reconocidas en la técnica anterior para introducir un ácido nucleico foráneo en una célula hospedadora, que incluyen la coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, la transfección mediante DEAE-dextrano, la lipofección o la electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook et al. (véase más arriba) y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de las células de mamífero, se sabe que, según el vector de expresión y la técnica de transfección utilizados, el ADN foráneo sólo se acaba integrando en el genoma en una pequeña fracción de células. Para identificar y seleccionar estas integraciones, en las células hospedadoras se introduce generalmente un gen que codifica un marcador de selección (por ejemplo, resistencia a antibióticos) junto con el gen de interés. Los marcadores de selección preferentes incluyen los que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido se pueden

identificar mediante selección con el fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen del marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras morirán).

En otra realización, las características de expresión de un gen endógeno (p. ej., genes de TANGO 268) dentro de una célula, línea celular o microorganismo se puede modificar mediante la inserción de un elemento regulador de ADN heterólogo al gen endógeno de interés en el genoma de una célula, línea celular estable o microorganismo clonado, de tal forma que el elemento regulador insertado esté unido operativamente con el gen endógeno (p. ej., genes de TANGO 268) y lo controla, lo modula o lo activa. Por ejemplo, los genes de TANGO 268 endógenos que normalmente están «transcripcionalmente silenciados», a saber, genes de TANGO 268 que normalmente no se expresan, o que se expresan solo a niveles muy bajos en una línea celular o en un microorganismo, se pueden activar al insertar un elemento regulador que es capaz de promover la expresión de un producto génico que normalmente se expresa en esa línea celular o microorganismo. Alternativamente, se pueden activar genes de TANGO 268 endógenos transcripcionalmente silenciados al insertar un elemento regulador promiscuo que funciona en distintos tipos de células.

Se puede insertar un elemento regulador heterólogo en una línea celular estable o microorganismo clonado, de tal forma que esté operativamente unido a genes endógenos de TANGO 268 y active su expresión, mediante técnicas, tales como la recombinación homóloga dirigida, que conocen bien los expertos en la técnica y se describen, p. ej., en Chappel, patente de los EE.UU. n.º 5 272 071; y publicación PCT de patente internacional n.º WO 91/06667, publicada el 16 de mayo de 1991.

Una célula hospedadora de la invención, tal como una célula hospedadora procariótica o eucariótica, se puede utilizar para producir un polipéptido de la invención. En consecuencia, la invención da a conocer adicionalmente los métodos para generar un polipéptido de la invención utilizando las células hospedadoras de la invención. En una realización, el método comprende cultivar la célula hospedadora de la invención (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica un polipéptido de la invención) en un medio adecuado de tal forma que se sintetice el polipéptido. En otra realización, el método además comprende aislar el polipéptido del medio o

Las células hospedadoras descritas en la presente invención también se pueden utilizar para producir animales transgénicos no humanos. Por ejemplo, una célula hospedadora de la invención puede ser un ovocito fertilizado o un embriocitoblasto en el que se ha introducido una secuencia que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria. Tales células hospedadoras se pueden utilizar para crear animales transgénicos no humanos en los que se han introducido secuencias exógenas que codifican un polipéptido de la invención en su genoma, o animales recombinantes homólogos en los que se ha alterado un gen endógeno que codifica un polipéptido de la invención. Tales animales son útiles para estudiar la función y/o actividad del polipéptido y para identificar y/o evaluar los moduladores de la actividad del polipéptido. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «animal transgénico» es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un roedor tal como una rata o ratón, en donde una o más de las células del animal incluyen un transgén. Otros ejemplos de animales transgénicos incluyen primates no humanos, ovejas, perros, vacas, cabras, pollos, anfibios, etc. Un transgén es un ADN exógeno que está integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico y que permanece en el genoma del animal maduro, por medio de lo cual se dirige la expresión de un producto génico codificado en uno o más tipos de células o tejidos del animal transgénico. Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «animal recombinante homólogo» es un animal no humano, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ratón, en el que se ha alterado un gen endógeno mediante recombinación homóloga entre el gen endógeno y una molécula de ADN exógeno introducida en una célula del animal, por ejemplo, una célula embrionaria del animal, antes del desarrollo del animal.

Se puede crear un animal transgénico al introducir un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención (o un homólogo del mismo) en el pronúcleo macho de un ovocito fertilizado, por ejemplo, por microinyección, infección retroviral, y permitir que el ovocito se desarrolle en un animal hembra de acogida pseudoembarazada. También se pueden incluir en el transgén las secuencias intrónicas y las señales de poliadenilación para aumentar la eficacia de la expresión del transgén. Una(s) secuencia(s) reguladora(s) específica(s) de tejido se puede(n) unir operativamente a un transgén para dirigir la expresión del polipéptido de la invención en determinadas células. Los métodos para generar animales transgénicos a través de la manipulación y microinyección del embrión, particularmente animales tales como los ratones, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de los EE.UU. n.º 4 736 866 y 4 870 009, la patente de los EE.UU. n.º 4 873 191, en Hogan, *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986) y en Wakayama et al., 1999, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 14984-14989. Se utilizan métodos similares para producir otros animales transgénicos. Se puede identificar un animal transgénico fundador basándose en la presencia del transgén en su genoma y/o la expresión del ARNm que codifica el transgén en los tejidos o células de los animales. Entonces, se puede utilizar un animal transgénico fundador para engendrar más animales que lleven el transgén. Además, los animales transgénicos que llevan el transgén pueden ser engendrados posteriormente por otros animales transgénicos que llevan otros genes.

Para crear un animal recombinante homólogo se prepara un vector que contiene al menos una porción de un gen que codifica un polipéptido de la invención en el que se ha introducido una delección, adición o sustitución para alterar, p. ej. destruir funcionalmente, el gen. En una realización preferente, se diseña el vector de tal forma que,

durante la recombinación homóloga, se destruye funcionalmente el gen endógeno (a saber, ya no codifica una proteína funcional; también se cita como vector «genosupresor»). Alternativamente, se puede diseñar el vector de tal forma que, durante la recombinación homóloga, el gen endógeno se muta, o si no se altera, pero todavía codifica la proteína funcional (p. ej., se puede alterar la región reguladora corriente arriba, mediante lo cual se altera la expresión de la proteína endógena). En el vector de recombinación homóloga, la porción alterada del gen está flanqueada en sus extremos 5' y 3' por otro ácido nucleico del gen para permitir que se produzca la recombinación homóloga entre el gen exógeno que contiene el vector y un gen endógeno en un embriocitoblasto. Las secuencias de ácido nucleico flanqueantes adicionales tienen una longitud suficiente para que se produzca una recombinación homóloga exitosa con el gen endógeno. Típicamente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante (en ambos extremos 5' y 3') en el vector (véase, p. ej., Thomas y Capecchi, 1987, *Cell* 51: 503 para una descripción de los vectores de recombinación homóloga). Se introduce el vector en una línea de embriocitoblastos (p. ej., mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el gen introducido se ha recombinado por homología con el gen endógeno (véase, p. ej., Li et al., 1992, *Cell*, 69: 915). A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocisto de un animal (p. ej., un ratón) para formar quimeras de agregación (véase, p. ej., Bradley et al., 1985, *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) págs. 113-152). Luego, se puede implantar un embrión quimérico en un animal de acogida hembra pseudogestante y llevar la gestación del embrión a término. La descendencia que alberga el ADN introducido por recombinación homóloga en sus células reproductoras se puede utilizar para engendrar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN introducido por recombinación homóloga mediante la transmisión del transgén a través de las células reproductoras. Los métodos para construir vectores de recombinación homólogos y animales recombinantes homólogos se describen además en Bradley, 1991, *Current Opinion in BioTechnology* 2: 823-829 y en las publicaciones PCT de patente internacional n.º WO 90/11354, WO 91/01140, WO 92/0968 y WO 93/04169.

En otra realización, se pueden producir animales transgénicos no humanos que contienen sistemas seleccionados que permiten la expresión regulada del transgén. Un ejemplo de tal sistema es el sistema de la recombinasa *cre/loxP* del bacteriófago P1. Para una descripción del sistema de recombinasa *cre/loxP*, véase, p. ej., Lakso et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6232-6236. Otro ejemplo de un sistema de recombinasa es el sistema de recombinasa FLP de *Saccharomyces cerevisiae* (O'Gorman et al., 1991, *Science* 251: 1351-1355). Si se utiliza un sistema de recombinasa *cre/loxP* para regular la expresión del transgén, se necesitan animales que contengan transgenes que codifican tanto la recombinasa *Cre* como una proteína determinada. Se pueden proporcionar tales animales mediante la construcción de animales transgénicos «dobles», por ejemplo, apareando dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén que codifica una proteína determinada y el otro que contiene un transgén que codifica una recombinasa.

También se pueden producir clones de animales transgénicos no humanos descritos en la presente memoria de acuerdo con los métodos descritos en Wilmut et al., 1997, *Nature* 385: 810-813 y las publicaciones PCT de patente internacional n.º WO 97/07668 y WO 97/07669.

IV. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos (también citados en la presente memoria como «compuestos activos») de la invención se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Tales composiciones comprenden por regla general la molécula de ácido nucleico, la proteína o el anticuerpo y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal y como se utiliza en la presente memoria, la terminología «excipiente farmacéuticamente aceptable» pretende incluir a todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, fármacos antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o fármaco es incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. También se pueden incorporar compuestos activos complementarios en las composiciones.

La invención incluye métodos para preparar composiciones farmacéuticas para modular la expresión o la actividad de un polipéptido o ácido nucleico de la invención. Tales métodos comprenden formular un vehículo farmacéuticamente aceptable con un agente que modula la expresión o actividad de un polipéptido o ácido nucleico de la invención. Tales composiciones pueden además incluir agentes activos adicionales. Por lo tanto, la invención además incluye métodos para preparar una composición farmacéutica formulando un vehículo farmacéuticamente aceptable con un fármaco que modula la expresión o actividad de un polipéptido o ácido nucleico de la invención y uno o más compuestos activos adicionales.

Una composición farmacéutica de la invención se formula de tal modo que sea compatible con su pretendida vía de administración. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, p. ej., la administración por vía intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los compuestos siguientes: un diluyente estéril, tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad

tales como cloruro de sodio o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral se puede encapsular en ampollas, jeringuillas desechables o viales de dosis múltiples fabricados en vidrio o plástico.

- Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones, y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF; Parsippany, NJ) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición tiene que estar estéril y debería ser líquida hasta el punto de que se pueda aspirar e inyectar con una jeringuilla. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y debe estar al resguardo de la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El excipiente debe ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de las partículas en el caso de la dispersión, y mediante el uso de tensioactivos. Se puede prevenir la acción de los microorganismos mediante diferentes antibacterianos y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. Se puede prolongar la absorción de las composiciones inyectables al incluir en la composición un fármaco que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.
- Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles al incorporar el compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo) en la cantidad necesaria en un solvente adecuado con un ingrediente o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, y después esterilizar por filtración. Generalmente, se preparan dispersiones al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son el secado al vacío y la liofilización, lo que produce un polvo del ingrediente activo más algún ingrediente deseado adicional a partir de una disolución de los mismos previamente esterilizada por filtración.

- Las composiciones orales incluyen por lo general un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimir en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, se puede incorporar el compuesto activo con excipientes y utilizarlo en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. También se pueden preparar composiciones orales utilizando un vehículo líquido para uso como un colutorio, en las que el compuesto en el vehículo líquido se aplica por vía oral y se gargariza y expectora o se traga.

- Como parte de la composición, se pueden incluir aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los ingredientes, o compuestos de naturaleza similar, que siguen: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un saborizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

- Para la administración por inhalación, se administran los compuestos en forma de un pulverizador en aerosol a partir de un dispensador o contenedor presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

- La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se utilizan penetrantes adecuados para atravesar la barrera. Por lo general, tales penetrantes se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados del ácido fúcsídico. La administración transmucosa se puede conseguir con pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, se formulan los compuestos activos en ungüentos, bálsamos, geles o cremas como generalmente se conoce en la técnica.

- También se pueden preparar los compuestos en forma de supositorio (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de coco u otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

- En una realización, se preparan los compuestos activos con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación prolongada, que incluyen implantes y sistemas de administración microencapsulada. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilvinilacetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para preparar tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales se pueden obtener también comercialmente de Alza Corporation y de Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden utilizar suspensiones liposómicas (que incluyen los liposomas dirigidos selectivamente a las células infectadas mediante anticuerpos monoclonales contra antígenos víricos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Se pueden preparar de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal y como se describe

en la patente de los EE.UU. n.º 4 522 811.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones orales o parenterales en forma de dosis unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosis unitaria tal y como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente individuales idóneas como dosis unitarias para el sujeto a tratar; cada

- 5 unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el excipiente farmacéutico necesario. La especificación para las formas de las unidades de dosis de la invención vienen dictadas, y dependen directamente de ellas, por las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a conseguir, y las limitaciones inherentes en la técnica de formulación tal como un compuesto activo para el tratamiento de los individuos.
- 10 Para los anticuerpos, la dosis preferente es de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg de masa corporal (generalmente de 10 mg/kg a 20 mg/kg). Si el anticuerpo debe actuar en el cerebro, normalmente resulta apropiada una dosis de 50 mg/kg a 100 mg/kg. Generalmente, los anticuerpos parcialmente humanos y los anticuerpos totalmente humanos tienen una semivida mayor en el cuerpo humano que otros anticuerpos. Por consiguiente, a menudo es posible utilizar dosis menores y se administran con menos frecuencia. Se pueden utilizar modificaciones, tales como la lipidación, para
- 15 estabilizar los anticuerpos y para reforzar la captación y la penetración en el tejido (p. ej., en el cerebro). Se describe un método para la lipidación de anticuerpos en Cruikshank et al. ((1997) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology* 14: 193).

- Tal y como se define en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz de proteína o polipéptido (a saber, una dosis eficaz) oscila de unos 0,001 a 30 mg/kg de masa corporal, preferentemente de unos 0,01 a 25
- 20 mg/kg de masa corporal, más preferentemente de unos 0,1 a 20 mg/kg de masa corporal e incluso más preferentemente aproximadamente de 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg o de 5 a 6 mg/kg de masa corporal.

- El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar un sujeto con eficacia, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, la gravedad de la enfermedad o del trastorno, los tratamientos
- 25 anteriores, la salud general y/o la edad del sujeto, y la presencia de otras enfermedades. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína, polipéptido o anticuerpo puede incluir un único tratamiento o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferente, se trata un sujeto con anticuerpo, proteína o polipéptido en el intervalo de entre unos 4,1 a 20 mg/kg de masa corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 a 10 semanas, preferentemente entre 2 a 8 semanas, más
- 30 preferentemente entre unas 3 a 7 semanas, e incluso más preferentemente durante unas 4, 5 ó 6 semanas. También se apreciará que la dosis eficaz del anticuerpo, proteína o polipéptido utilizado para el tratamiento puede aumentar o disminuir durante el transcurso de un tratamiento determinado. Se pueden producir cambios en la dosis y hacerse evidentes a partir de los resultados de los ensayos diagnósticos que se describen en la presente memoria.

- Preferentemente, la administración del modulador de TANGO 268 está en el sitio de las células o del tejido a tratar,
- 35 o cerca de él, p. ej., la administración se hace en el sitio de un trastorno inducido por la agregación plaquetaria, tal como uno de los descritos en la presente memoria, o cerca de él.

En algunas realizaciones, el modulador de TANGO 268 se administra o se coadministra con al menos otro agente deseable, p. ej., heparina o aspirina.

- En algunos casos se prefiere que la administración de un modulador de TANGO 268 comprenda un bolo inicial
- 40 seguido de la infusión continua. Por ejemplo, tales casos generalmente incluirán aquellos en los que el modulador muestra una reversibilidad apreciable en la fijación de las plaquetas como, por ejemplo, cuando se ensaya mediante las técnicas descritas en la presente memoria.

- En un ejemplo, presentado a modo de ilustración y no a modo de limitación, una dosis y su posología de administración para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca isquémica o trombosis comprende: en los pacientes
- 45 que se someten a una angioplastia coronaria percutánea (ACP), el modulador de TANGO 268 (p. ej., anticuerpo anti-TANGO 268) se administra como un bolo por vía i.v. a 0,25 mg/kg más infusión de 10 µg/min o 0,125 (µg/kg)/min (esto se puede realizar, alternativamente, junto con heparina y aspirina) durante 12 horas. En los pacientes con una angina inestable insensible al tratamiento en quienes se planifica la ACP en 24 horas, el bolo y la infusión se dan de 18 a 24 horas antes del procedimiento y se continúa con la infusión durante 1 hora o 12 horas
- 50 después del procedimiento.

- La presente descripción incluye los agentes que modulan la expresión o la actividad. Un agente puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña. Por ejemplo, tales moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitarse a ellos, péptidos, peptidomiméticos, aminoácidos, análogos de aminoácidos, polinucleótidos, análogos de polinucleótidos, nucleótidos, análogos de nucleótidos, compuestos orgánicos e inorgánicos (a saber, que incluyen compuestos
- 55 heteroorgánicos y organometálicos) que tienen una masa molecular de menos de 10 000 g/mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen una masa molecular de menos de unos 5000 g/mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen una masa molecular de menos de unos 1000 g/mol, compuestos orgánicos o inorgánicos que tienen una masa molecular de menos de unos 500 g/mol, y sales, ésteres y otras formas farmacéuticamente

aceptables de tales compuestos.

- Se entiende que la dosis adecuada de agentes de molécula pequeña depende de numerosos factores dentro del campo de conocimiento del médico, veterinario o investigador expertos en la técnica. La(s) dosis de la molécula pequeña variará(n), por ejemplo, según la identidad, tamaño y estado del sujeto o muestra a tratar, lo que depende además de la vía por la cual se administra la composición, si es aplicable, y del efecto que el profesional desee que la molécula pequeña tenga sobre el ácido nucleico o el polipéptido de la invención. Las dosis de ejemplo incluyen cantidades de miligramos o microgramos de la molécula pequeña por kilogramo de sujeto o peso de la muestra (por ejemplo, de aproximadamente 1 µg/kg a unos 500 mg/kg, de unos 100 µg/kg a unos 5 mg/kg, o de aproximadamente 1 µg/kg a unos 50 µg/kg). Además, se entiende que las dosis apropiadas de una molécula pequeña dependen de la potencia de la molécula pequeña con respecto a la expresión o actividad a modular. Tales dosis adecuadas se pueden determinar mediante los ensayos descritos en la presente memoria. Cuando una o más de estas moléculas pequeñas se debe administrar a un animal (por ejemplo, un humano) para modular la expresión o la actividad de un polipéptido o ácido nucleico de la invención, un médico, veterinario o investigador puede, por ejemplo, recetar una dosis relativamente baja primero y posteriormente aumentar la dosis hasta obtener una respuesta adecuada. Además, se comprende que el nivel de la dosis específica para cualquier sujeto animal determinado dependerá de una serie de factores, que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la edad, la masa corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto, el momento de la administración, la vía de administración, la velocidad de excreción, la posible combinación farmacológica y el grado de expresión o la actividad a modular.

- Se pueden introducir las moléculas de ácido nucleico de la invención en vectores y utilizarlos como vectores para genoterapia. Los vectores para genoterapia se pueden administrar a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (patente de los EE.UU. n.º 5 328 470) o mediante inyección estereotáctica (véase, p. ej., Chen et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector para genoterapia puede incluir el vector para genoterapia en un diluyente aceptable o puede comprender una matriz de liberación lenta en la que se incluye el vehículo de administración del gen. Alternativamente, cuando el vector de administración del gen completo pueda producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovíricos, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración del gen.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un contenedor, envase o dispensador junto con las instrucciones para la administración.

30 V. Usos y métodos de la invención

- Las moléculas de ácido nucleico, proteínas, homólogos de proteínas y anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar en uno o varios de los métodos siguientes: a) ensayos de detección selectiva; b) ensayos de detección (p. ej., cartografía cromosómica, tipificación del tejido, biología forense); c) medicina predictiva (e.g., ensayos diagnósticos, ensayos pronósticos, estudios clínicos de vigilancia, y farmacogenómica); y d) métodos de tratamiento (por ejemplo, terapéutico y preventivo). Las moléculas de ácido nucleico aisladas de la invención se pueden utilizar para expresar proteínas (p. ej., a través de un vector de expresión recombinante en una célula hospedadora en las aplicaciones de genoterapia), para detectar el ARNm (p. ej., en una muestra biológica) o una lesión genética, y para modular la actividad de un polipéptido de la invención. Además, se pueden utilizar los polipéptidos de la invención para detectar selectivamente fármacos o compuestos que modulan la actividad o la expresión de un polipéptido de la invención así como para tratar trastornos caracterizados por la producción insuficiente o excesiva de una proteína de la invención, o la producción de una forma de una proteína de la invención que tiene una actividad disminuida o anómala en comparación con la proteína de tipo salvaje. Además, se pueden utilizar los anticuerpos de la invención para detectar o aislar una proteína de la invención, o para modular la actividad de una proteína de la invención.
- También se describen en la presente memoria agentes nuevos identificados por los ensayos de detección selectiva descritos más arriba y los usos de los mismos para tratamientos como se describe en la presente memoria.

A. Ensayos de detección selectiva

- También se describe en la presente memoria un método (también denominado en la presente memoria un «ensayo de detección selectiva») para identificar moduladores, a saber, compuestos o agentes candidatos o problema (p. ej., péptidos, peptidomiméticos, pequeñas moléculas u otros fármacos) que se unen al polipéptido de la invención o que tienen un efecto inhibitor o estimulador sobre, por ejemplo, la expresión o la actividad de un polipéptido de la invención.

- También se describen en la presente memoria ensayos para detectar selectivamente compuestos candidatos o problema que se fijan a, o que modulan la actividad de, la forma fijada a la membrana de un polipéptido descrito en la presente memoria o de una porción biológicamente activa del mismo. Los compuestos problema de la presente invención se pueden obtener mediante una cualquiera de las numerosas estrategias de los métodos para colecciones combinatorias conocidos en la técnica, que incluyen: colecciones biológicas; colecciones en fase líquida o en fase sólida paralelas tratables espacialmente; métodos para colecciones sintéticas que requieren

desconvolución; el método para la colección «una perla-un compuesto»; y métodos para colecciones sintéticas que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. La estrategia de colecciones biológicas se limita a peptidotecas, mientras que las otras cuatro estrategias se aplican a peptidotecas, oligomerotecas no peptídicas o de moléculas pequeñas (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12: 145).

- 5 En la técnica se pueden encontrar ejemplos de métodos para la síntesis de colecciones de moléculas, por ejemplo en: DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11422; Zuckermann et al. (1994). *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho et al. (1993) *Science* 261: 1303; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37: 1233.
- 10 Las colecciones de compuestos se pueden presentar en solución (p. ej., Houghten 1992) *BioTechniques* 13: 412-421), o en perlas (Lam (1991) *Nature* 354: 82-84), chips (Fodor (1993) *Nature* 364: 555-556), bacterias (patente de los EE.UU. n.º 5 223 409), esporas (patentes n.º 5 571 698; 5 403 484; y 5 223 409), plásmidos (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) o fago (Scott y Smith (1990) *Science* 249: 386-390; Devlin (1990) *Science* 249: 404-406; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6378-6382; y Felici(1991) *J. Mol. Biol.* 222: 301-310).

- El ensayo puede ser un ensayo a base de células en el que una célula que expresa una forma fijada a la membrana de un polipéptido como se describe en la presente memoria, o una porción biológicamente activa del mismo, sobre la superficie celular se pone en contacto con un compuesto problema y se determina la capacidad que tiene el compuesto problema para fijarse al polipéptido. La célula, por ejemplo, puede ser una célula de levadura o una
- 20 célula procedente de mamífero. Se puede llevar a cabo la determinación de la capacidad que tiene el compuesto problema para fijarse al polipéptido, por ejemplo, conjugando el compuesto problema con un radioisótopo o marcador enzimático de tal forma que la fijación del compuesto problema al polipéptido o la porción biológicamente activa del mismo se pueda determinar mediante la detección del compuesto marcado en un complejo. Por ejemplo, los compuestos problema se pueden marcar con ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³H, tanto directa como indirectamente, y el
 - 25 radioisótopo se puede detectar mediante recuento directo de la radioemisión o mediante un contador de centelleo. Alternativamente, los compuestos problema se pueden marcar enzimáticamente, por ejemplo, con peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y se puede detectar la marca enzimática al determinar la conversión de un sustrato adecuado en un producto. En una realización preferente, el ensayo comprende poner en contacto una célula que expresa una forma fijada a la membrana de un polipéptido de la invención, o una porción biológicamente
 - 30 activa del mismo, sobre la superficie celular con un compuesto que se sabe que se fija al polipéptido para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto problema, y determinar la capacidad que tiene el compuesto problema para interaccionar con el polipéptido, en donde determinar la capacidad del compuesto problema para interaccionar con el polipéptido comprende la determinación de la capacidad que tiene el compuesto problema para fijarse preferentemente al polipéptido o a una porción biológicamente activa del mismo en
 - 35 comparación con el compuesto conocido.

- En otra realización, un ensayo es un ensayo a base de células que comprende poner en contacto una célula que expresa una forma fijada a la membrana de un polipéptido de la invención, o una porción biológicamente activa del mismo, sobre la superficie celular con un compuesto problema y determinar la capacidad que tiene el compuesto problema para modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad del polipéptido o la porción biológicamente activa del
- 40 mismo. Se puede llevar a cabo la determinación de la capacidad que tiene el compuesto problema para modular la actividad del polipéptido o una porción biológicamente activa del mismo, por ejemplo, determinando la capacidad que tiene la proteína polipeptídica para fijarse, o interaccionar, con una molécula diana.

- Se puede llevar la cabo la determinación de la capacidad que tiene un polipéptido descrito en la presente memoria para fijarse a una molécula diana, o interaccionar con ella, mediante uno de los métodos descritos más arriba con los que determinar la fijación directa. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «molécula diana» es una molécula con la cual un polipéptido determinado (p. ej., un polipéptido de la invención) se fija o interacciona en la naturaleza, por ejemplo, una molécula sobre la superficie de una célula que expresa la proteína determinada, una molécula sobre la superficie de una segunda célula, una molécula en el medio extracelular, una molécula asociada a la superficie interna de una membrana celular o una molécula citoplasmática. Una molécula diana puede ser un
- 50 polipéptido descrito en la presente memoria o algún otro polipéptido o proteína. Por ejemplo, una molécula diana puede ser un componente de una vía de transducción de señales que facilita la transducción de una señal extracelular (p. ej., una señal generada mediante la fijación de un compuesto a un polipéptido de la invención) a través de la membrana celular y hacia el interior de la célula o hacia una segunda proteína intercelular que tiene actividad catalítica o hacia una proteína que facilita la asociación de las moléculas de señalización vía abajo con un
 - 55 polipéptido de la invención. Se puede llevar a cabo la determinación de la capacidad que tiene un polipéptido de la invención para fijarse a una molécula diana, o interaccionar con ella, determinando la actividad de la molécula diana. Por ejemplo, la actividad de la molécula diana se puede determinar detectando la inducción de un segundo mensajero celular en la diana (p. ej., Ca²⁺ intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), detectando la actividad catalítica/enzimática de la diana en un sustrato adecuado, detectando la inducción de un gen indicador (p. ej., un
 - 60 elemento regulador que responde a un polipéptido de la invención unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, p. ej., luciferasa) o detectando una respuesta celular, por ejemplo, diferenciación celular o proliferación celular.

El ensayo puede ser un ensayo sin células que comprende poner en contacto un polipéptido descrito en la presente memoria o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto problema y determinar la capacidad que tiene el compuesto problema para fijarse al polipéptido o porción biológicamente activa del mismo. La fijación del compuesto problema al polipéptido se puede determinar directa o indirectamente como se describe más arriba. En una realización preferente, el ensayo incluye poner en contacto el polipéptido descrito en la presente memoria o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto conocido que se fija al polipéptido para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto problema y determinar la capacidad del compuesto problema para interactuar con el polipéptido, en donde determinar la capacidad que tiene el compuesto problema para interactuar con el polipéptido comprende determinar la capacidad del compuesto problema para fijarse preferentemente al polipéptido o porción biológicamente activa del mismo en comparación con el compuesto conocido.

El ensayo es un ensayo sin células que comprende poner en contacto un polipéptido descrito en la presente memoria o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto problema y determinar la capacidad que tiene el compuesto problema para modular (p. ej., estimular o inhibir) la actividad del polipéptido o de la porción biológicamente activa del mismo. Se puede llevar a cabo la determinación de la capacidad que tiene el compuesto problema para modular la actividad del polipéptido, por ejemplo, determinando la capacidad que tiene el polipéptido para fijarse a una molécula diana mediante uno de los métodos descritos más arriba con los que determinar la fijación directa. En una realización alternativa, se puede llevar a cabo la determinación de la capacidad que tiene el compuesto problema para modular la actividad del polipéptido determinando la capacidad del polipéptido de la invención para modular además la molécula diana. Por ejemplo, la actividad catalítica/enzimática de la molécula diana en un sustrato adecuado se puede determinar como se describió anteriormente.

El ensayo sin células puede comprender poner en contacto un polipéptido descrito en la presente memoria o una porción biológicamente activa del mismo con un compuesto conocido que se fija al polipéptido para formar una mezcla de ensayo, poner en contacto la mezcla de ensayo con un compuesto problema y determinar la capacidad que tiene el compuesto problema para interactuar con el polipéptido, en donde determinar la capacidad que tiene el compuesto problema para interactuar con el polipéptido comprende la determinación de la capacidad que tiene el polipéptido para fijarse preferentemente a una molécula diana o modular su actividad.

Los ensayos sin células se pueden llevar a cabo tanto con una forma soluble como con la forma fijada a la membrana de un polipéptido descrito en la presente memoria. En el caso de ensayos sin células que comprenden la forma fijada a la membrana del polipéptido, puede ser deseable utilizar un solubilizante de tal forma que la forma fijada a la membrana del polipéptido se mantenga en solución. Ejemplos de tales solubilizantes incluyen detergentes no iónicos tales como *n*-octilglucósido, *n*-dodecilglucósido, *n*-octilmaltósido, octanoil-*N*-metilglucarnida, decanoil-*N*-metilglucarnida, Triton X-100, Triton X-114, Thesit, isotridecilo(etilenglicol éter)*n*, sulfonato de 3-[(colamidopropil)dimetilaminio]-1-propano (CHAPS), sulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilaminio]-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO) o sulfonato de *N*-dodecil-*N,N*-dimetil-3-amonio-1-propano.

Puede ser deseable inmovilizar bien el polipéptido descrito en la presente memoria o su molécula diana para facilitar la separación de las formas conjugadas de las no conjugadas de una o ambas proteínas, así como para acomodar la automatización del ensayo. La fijación de un compuesto problema al polipéptido, o la interacción del polipéptido con una molécula diana en presencia y ausencia de un compuesto candidato, se puede llevar a cabo en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo y tubos de microcentrifugación. En una realización, se puede dar a conocer una proteína de fusión que añade un dominio que permite que una o ambas proteínas se fijen a una matriz. Por ejemplo, las proteínas de fusión con glutatión-*S*-transferasa se pueden adsorber en perlas de Sepharose con glutatión (Sigma Chemical; St. Louis, MO) o placas de microtitulación modificadas con glutatión que, luego, se combinan con el compuesto problema o el compuesto problema y bien la proteína diana no absorbida o bien un polipéptido de la invención, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación del complejo (p. ej., en condiciones fisiológicas de sal y pH). Después de la incubación, se lavan las perlas o pocillos de las placas de microtitulación para retirar cualquier compuesto sin unir y se mide la formación del complejo directa o indirectamente, por ejemplo, como se describe más arriba. Alternativamente, los complejos se pueden disociar de la matriz y se puede determinar el nivel de fijación o actividad del polipéptido de la invención mediante técnicas estándares.

También se pueden utilizar otras técnicas para inmovilizar proteínas sobre matrices en los ensayos de detección selectiva de la invención. Por ejemplo, se puede inmovilizar el polipéptido descrito en la presente memoria o su molécula diana mediante la conjugación de biotina y estreptavidina. Se puede preparar el polipéptido de la invención o moléculas diana biotiniladas a partir de biotina-NHS (*N*-hidroxisuccinimida) utilizando técnicas bien conocidas en la técnica (p. ej., kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL), e inmovilizarlos en los pocillos de placas de 96 pocillos recubiertas de estreptavidina (Pierce Chemical). Alternativamente, los anticuerpos que reaccionan con el polipéptido descrito en la presente memoria o moléculas de diana, pero que no interfieren con la fijación del polipéptido descrito en la presente invención a su molécula diana, se pueden modificar en los pocillos de la placa, y la diana o el polipéptido de la invención sin fijar se pueden atrapar en los pocillos mediante conjugación con anticuerpos. Los métodos para detectar tales complejos, además de los descritos anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen la inmunodetección de complejos mediante anticuerpos reactivos con el polipéptido de la invención o molécula diana así como ensayos con enzimas fijadas que se basan en la detección de una

actividad enzimática asociada con el polipéptido de la invención o molécula diana.

Los moduladores de la expresión de un polipéptido descrito en la presente memoria se pueden identificar en un método en el cual una célula se pone en contacto con un compuesto candidato, y se determina en la célula la expresión del ARNm o de la proteína seleccionados (a saber, el ARNm o la proteína que corresponde a un polipéptido o a ácido nucleico de la invención). El nivel de expresión del ARNm o de la proteína seleccionados en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión del ARNm o proteína seleccionados en ausencia del compuesto candidato. A continuación se puede identificar el compuesto candidato como un modulador de la expresión del polipéptido de la invención basándose en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión del ARNm o proteína seleccionados es mayor (significativamente mayor desde el punto de vista estadístico) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como estimulador de la expresión del ARNm o de la proteína seleccionados. Alternativamente, cuando la expresión del ARNm o la proteína seleccionados es menor (significativamente menor desde el punto de vista estadístico) en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como inhibidor de la expresión del ARNm o de la proteína seleccionados. Se puede determinar el nivel de la expresión del ARNm o la proteína seleccionados mediante los métodos descritos en la presente memoria.

Un polipéptido descrito en la presente memoria se puede utilizar como «proteínas de cebo» en un ensayo de doble híbrido o en un ensayo de triple híbrido (véase, p. ej., la patente de los EE.UU. n.º 5 283 317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72: 223-232; Madura et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268: 12046-12054; Bartel et al. (1993) *BioTechniques* 14: 920-924; Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8: 1693-1696; y la publicación PCT de patente internacional n.º WO 94/10300), para identificar otras proteínas, que se fijan al polipéptido descrito en la presente memoria, o que interaccionan con él, y modulan la actividad del polipéptido de la invención. Tales proteínas de fijación probablemente también están implicadas en la propagación de señales por el polipéptido de la invención como, por ejemplo, elementos vía arriba o vía abajo de una vía de señalización en la que participa el polipéptido de la invención.

La presente descripción también incluye agentes nuevos identificados por los ensayos de detección selectiva descritos más arriba y los usos de los mismos para tratamientos como se describe en la presente memoria.

C. Medicina predictiva

También se describe en la presente memoria el campo de la medicina predictiva en la que se utilizan ensayos diagnósticos, ensayos pronósticos y los estudios clínicos de vigilancia con propósitos pronósticos (predictivos) para, de ese modo, tratar preventivamente a un individuo. También se describen en la presente memoria ensayos diagnósticos para determinar la expresión de la proteína TANGO 268 y/o su ácido nucleico, así como la actividad de TANGO 268, en el contexto de una muestra biológica (p. ej., sangre, suero, células y tejido) para determinar de este modo si un individuo está afectado por una enfermedad o alteración, o que corre el riesgo de sufrir, una alteración, asociado con la expresión o actividad anómala o indeseada de TANGO 268. La descripción también da a conocer ensayos pronósticos (o predictivos) para determinar si un individuo corre el riesgo de sufrir una alteración asociada a la proteína TANGO 268, su actividad o la expresión de su ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden analizar mutaciones en un gen de la TANGO 268 en una muestra biológica. Se pueden utilizar tales ensayos con propósitos pronósticos o predictivos para de esta forma tratar preventivamente a un individuo antes del comienzo de un trastorno caracterizado por, o asociado a, la proteína TANGO 268 y/o la expresión de su ácido nucleico o su actividad.

Como alternativa para realizar determinaciones basándose en el nivel de expresión absoluto de los genes seleccionados, las determinaciones se pueden basar en los niveles de expresión normalizados de estos genes. Los niveles de expresión se normalizan corrigiendo el nivel de expresión absoluto de un gen de la TANGO 268 al comparar su expresión a la expresión de un gen que no es un gen de la TANGO 268, p. ej., un gen de mantenimiento que se expresa constitutivamente. Los genes adecuados para la normalización incluyen los genes de mantenimiento tal como el gen de la actina. Esta normalización permite la comparación del nivel de expresión en una muestra, p. ej., una muestra de paciente, a otra muestra, p. ej., una muestra de un individuo sin una enfermedad o alteración particular, o a una muestra de un individuo sano, entre muestras de diferentes procedencias. Alternativamente, el nivel de expresión se puede proporcionar como un nivel de expresión relativo. Para determinar el nivel de expresión relativo de un gen, se determina el nivel de expresión del gen en 10 o más muestras de diferentes aislados celulares (p. ej., aislados de plaquetas o aislados de megacariocitos), preferentemente 50 o más muestras, antes de la determinación del nivel de expresión para la muestra en cuestión. Se determina el nivel de expresión medio de cada uno de los genes ensayados en el mayor número de muestras posible y se utiliza como un nivel de expresión basal para el gen o genes en cuestión. A continuación, el nivel de expresión del gen determinado en la muestra problema (nivel de expresión absoluto) se divide por el valor de expresión medio obtenido para ese gen. Esto proporciona un nivel de expresión relativo y ayuda a identificar casos extremos de enfermedades y trastornos tales como las enfermedades coronarias (p. ej., aterosclerosis), trastornos neuronales (p. ej., accidente cerebrovascular) y trastornos hemorrágicos.

Preferentemente, las muestras utilizadas en la determinación basal serán de células enfermas y células sanas del tipo de célula o tejido apropiado. La elección de la fuente de células depende del uso del nivel de expresión relativo.

El uso de la expresión encontrada en los tejidos normales como una puntuación de expresión media ayuda a validar si el gen de TANGO 268 ensayado es específico (frente a las células normales). Tal uso es particularmente importante para identificar si el gen de la TANGO 268 puede servir como gen diana. Además, a medida que se acumulan más datos, se puede revisar la media del valor de expresión, lo que proporciona una mejora de los valores de expresión relativos basados en los datos acumulados. Los datos de expresión de las células proporciona un medio para graduar la gravedad de la enfermedad o del estado del trastorno.

Otro aspecto de la descripción hace referencia a la vigilancia de la influencia de agentes (por ejemplo, fármacos o formulaciones) sobre la expresión o la actividad de la TANGO 268 en los ensayos clínicos. Éstos y otros agentes se describen con más detalle en los apartados siguientes.

10 1. Ensayos diagnósticos

Un método ejemplar para detectar la presencia o ausencia de un polipéptido o ácido nucleico de la invención en una muestra biológica implica obtener una muestra biológica de un sujeto problema y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar un polipéptido o ácido nucleico (p. ej., ARNm, ADN genómico) de la invención de tal forma que se detecta la presencia de un polipéptido o ácido nucleico de la invención en la muestra biológica. Un agente preferente para detectar el ARNm o el ARN genómico que codifica un polipéptido de la invención es una sonda marcada de ácido nucleico capaz de hibridarse al ARNm o al ADN genómico que codifica un polipéptido de la invención. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ADN completo, tal como el ácido nucleico de SEQ ID n.º 1, 2, 14 o 15, o una porción del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 15, 30, 50, 100, 250 o 500 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridarse específicamente en condiciones rigurosas a un ARNm o ADN genómico que codifica un polipéptido de la invención. En la presente memoria se describen otras sondas adecuadas para uso en los ensayos diagnósticos de la invención.

Un agente preferente para detectar un polipéptido descrito en la presente memoria es un anticuerpo capaz de fijarse a un polipéptido de la invención, preferentemente un anticuerpo con una marcación detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, más preferentemente, monoclonales. Se puede utilizar un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). La terminología «marcado», en relación con la sonda o el anticuerpo, pretende englobar la marcación directa de la sonda o del anticuerpo conjugando (es decir, uniendo físicamente) una sustancia detectable a la sonda o al anticuerpo, así como la marcación indirecta de la sonda o del anticuerpo mediante la reactividad con otro reactivo que está directamente marcado. Ejemplos de marcación indirecta incluyen detectar un anticuerpo primario mediante un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia y la marcación terminal con biotina de una sonda de ADN de tal manera que se pueda detectar con estreptavidina marcada con fluorescencia. La terminología «muestra biológica» pretende incluir tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como los tejidos, células y líquidos presentes en un sujeto. Es decir, se puede utilizar el método de detección de la invención para detectar ARNm, proteína o ADN genómico en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, las técnicas *in vitro* para detectar ARNm incluyen hibridaciones de tipo Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para detectar un polipéptido de la invención incluyen ensayos de inmunoensayos (ELISA), inmunotransferencias, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para detectar ADN genómico incluyen hibridaciones de tipo Southern. Además, las técnicas *in vivo* para detectar un polipéptido de la invención incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo marcado dirigido contra el polipéptido. Por ejemplo, se puede marcar el anticuerpo con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto se puede detectar mediante técnicas estándares de diagnóstico por imagen.

La muestra biológica puede contener moléculas de proteína del sujeto problema. Alternativamente, la muestra biológica puede contener moléculas de ARNm del sujeto problema o moléculas de ADN genómico del sujeto problema. Una muestra biológica preferente es una muestra de leucocitos de la sangre periférica aislada de un sujeto por medios convencionales.

Los métodos además implican obtener una muestra biológica de control de un sujeto de control, poner en contacto la muestra de control con un compuesto o agente capaz de detectar un polipéptido descrito en la presente memoria o un ARNm o ADN genómico que codifica un polipéptido de la invención, de tal forma que en la muestra biológica se detecta la presencia del polipéptido o del ARNm o del ADN genómico que codifica el polipéptido, y se compara la presencia del polipéptido o del ARNm o del ADN genómico que codifica el polipéptido en la muestra de control con la presencia del polipéptido o del ARNm o del ADN genómico que codifica el polipéptido en la muestra problema.

En la presente memoria también se describen kits para detectar la presencia de un polipéptido o de un ácido nucleico descrito en la presente memoria en una muestra biológica (una muestra problema). Se pueden utilizar tales kits para determinar si un sujeto padece, o tiene un mayor riesgo de sufrir, una alteración asociada a la expresión anómala de un polipéptido de la invención como se explicó, por ejemplo, en los apartados anteriores referentes a los usos de las secuencias de la invención.

Por ejemplo, se pueden utilizar los kits para determinar si un sujeto padece, o corre un mayor riesgo de sufrir, alteraciones tales como trastornos inmunitarios (p. ej., trombocitopenia y trastornos plaquetarios), trastornos hepáticos, enfermedades cerebrovasculares (p. ej., accidente cerebrovascular e isquemia), enfermedades de tromboembolia venosa (p. ej., enfermedades que implican hinchazón, dolor y úlceras en las piernas, embolia

- pulmonar, trombosis venosa abdominal), enfermedades coronarias (p. ej., enfermedades cardiovasculares que incluyen angina inestable, infarto de miocardio agudo, arteriopatía coronaria, revascularización coronaria, tromboembolia ventricular, aterosclerosis, arteriopatía coronaria y formación de placas), cánceres metastásicos (p. ej., la metástasis de células cancerosas del colon y del hígado) y trastornos embrionarios, que se asocian a la expresión anómala de la TANGO 268. El kit, por ejemplo, puede comprender un compuesto marcado o agente capaz de detectar el polipéptido o el ARNm que codifica el polipéptido en una muestra biológica y los medios para determinar en la muestra la cantidad del polipéptido o del ARNm (p. ej., un anticuerpo que se une al polipéptido o una sonda oligonucleotídica que se une al ADN o al ARNm que codifica el polipéptido). Los kits también pueden incluir instrucciones para observar que el sujeto problema padece, o que corre el riesgo de sufrir, un trastorno asociado a la expresión anómala del polipéptido si la cantidad del polipéptido o del ARNm que codifica el polipéptido está por encima o debajo de un nivel normal.

Para los kits basados en anticuerpos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un primer anticuerpo (p. ej., pegado a un soporte sólido) que se fija a un polipéptido de la invención; y, opcionalmente, (2) un segundo anticuerpo diferente que se fija o bien al polipéptido o bien al primer anticuerpo, y está conjugado a un agente detectable.

- Para los kits a base de oligonucleótidos, el kit puede comprender, por ejemplo: (1) un oligonucleótido, p. ej., un oligonucleótido marcado detectable, que se hibrida a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención o (2) un par de cebadores útiles para amplificar una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención. El kit puede comprender también, p. ej., un tamponante, un conservante o un estabilizante de proteínas. El kit también puede comprender los componentes necesarios para detectar el agente detectable (p. ej., una enzima o un sustrato). El kit también puede contener una muestra de control o una serie de muestras de control que se pueden ensayar y comparar con la muestra problema contenida. Cada componente del kit suele estar incluido en un contenedor individual y todos los diferentes contenedores se encuentran dentro de un solo embalaje junto con instrucciones para observar si el sujeto problema padece, o que corre el riesgo de sufrir, un trastorno asociado a la expresión anómala del polipéptido.

25 2. Ensayos pronósticos

- Los métodos descritos en la presente memoria se pueden utilizar además como ensayos diagnósticos o pronósticos para identificar los sujetos que tienen, o que corren el riesgo de sufrir, una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad anómala de un polipéptido descrito en la presente memoria. Por ejemplo, los ensayos descritos en la presente memoria, tales como los ensayos diagnósticos anteriores o los ensayos que vienen a continuación, se pueden utilizar para identificar un sujeto que tiene, o que corre el riesgo de sufrir, un trastorno asociado a la expresión o actividad anómala de un polipéptido de la invención, p. ej., un trastorno inmunitario, o trastornos embrionarios. Alternativamente, los ensayos pronósticos se pueden utilizar para identificar un sujeto que tiene, o que corre el riesgo de sufrir, tal enfermedad o trastorno. Por lo tanto, la presente descripción incluye un método en el que se obtiene una muestra problema de un sujeto y se detecta un polipéptido o ácido nucleico (p. ej., ARNm, ADN genómico) de la invención, en donde la presencia del polipéptido o del ácido nucleico es diagnóstico para un sujeto que tiene, o que corre el riesgo de sufrir, una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad anómala del polipéptido. Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «muestra problema» se refiere a una muestra biológica obtenida de un sujeto de interés. Por ejemplo, una muestra problema puede ser un líquido biológico (por ejemplo, suero), una muestra de células o un tejido.

- Los ensayos pronósticos descritos en la presente memoria, por ejemplo, se pueden utilizar para identificar un sujeto que tiene, o que corre el riesgo de sufrir, trastornos tales como los trastornos explicados, por ejemplo, en los apartados anteriores referentes a los usos de las secuencias de la invención. Por ejemplo, tales alteraciones pueden incluir trastornos inmunitarios (p. ej., trombocitopenia y trastornos plaquetarios), trastornos hepáticos, enfermedades cerebrovasculares (p. ej., accidente cerebrovascular e isquemia), enfermedades de tromboembolia venosa (p. ej., enfermedades que implican hinchazón, dolor y úlceras en las piernas, embolia pulmonar, trombosis venosa abdominal), enfermedades coronarias (p. ej., enfermedades cardiovasculares que incluyen angina inestable, infarto de miocardio agudo, arteriopatía coronaria, revascularización coronaria, tromboembolia ventricular, aterosclerosis, arteriopatía coronaria y formación de placas), cánceres metastásicos (p. ej., la metástasis de células cancerosas del colon y del hígado) y progresión a tales tumores metastásicos, trastornos del desarrollo y trastornos embrionarios, que se asocian a la expresión anómala de la TANGO 268.

- Además, los ensayos pronósticos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para determinar si a un sujeto se le puede administrar un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato) para tratar una enfermedad o trastorno asociado a la expresión o actividad anómala de un polipéptido de la invención. Por ejemplo, se pueden utilizar tales métodos para determinar si un sujeto se puede tratar con eficacia con un agente específico o una clase de agentes (p. ej., agentes de un tipo que disminuyen la actividad del polipéptido). La presente descripción incluye métodos para determinar si un sujeto se puede tratar con eficacia con un fármaco contra un trastorno asociado con la expresión o actividad anómala de un polipéptido descrito en la presente memoria en donde se obtiene una muestra problema y se detecta el polipéptido o ácido nucleico que codifica el polipéptido (p. ej., en donde la presencia del polipéptido o ácido nucleico es diagnóstica para un sujeto al que se le puede administrar el agente para tratar un trastorno asociado a la expresión o actividad anómala del polipéptido).

Los métodos descritos en la presente memoria también se pueden utilizar para detectar lesiones genéticas o mutaciones en un gen de la invención, mediante lo cual se determina si un sujeto con el gen lesionado corre el riesgo de tener un trastorno caracterizado por la expresión o actividad anómala de un polipéptido descrito en la presente memoria. El método puede incluir detectar, en una muestra de células del sujeto, la presencia o ausencia de una lesión genética o mutación caracterizada por al menos una entre las alteraciones que afectan a la integridad de un gen que codifica el polipéptido de la invención, o la expresión errónea del gen que codifica el polipéptido de la invención. Por ejemplo, se pueden detectar tales alteraciones genéticas o mutaciones constatando la existencia de al menos una entre 1) una delección de uno o más nucleótidos del gen; 2) una adición de uno o más nucleótidos al gen; 3) una sustitución de uno o más nucleótidos del gen; 4) una reorganización cromosómica del gen; 5) una alteración del nivel de la transcripción de un ARN mensajero del gen; 6) una modificación anómala del gen, tal como el patrón de metilación del ADN genómico; 7) la presencia de un patrón de ajuste diferente al salvaje de un ARN mensajero transcrito del gen; 8) un nivel de la proteína codificada por el gen distinto al del tipo salvaje; 9) una pérdida de un alelo del gen; y 10) una modificación postraducciona inapropiada de la proteína codificada por el gen. Tal y como se describe en la presente memoria, hay un gran número de técnicas de ensayo conocidas en la técnica que se pueden utilizar para detectar lesiones en un gen.

La detección de la lesión puede implicar el empleo de una sonda o cebador en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. n.º 4 683 195 y 4 683 202), tal como PCR anclada o RACE-PCR, o alternativamente en una reacción en cadena de ligación (LCR) (véase, por ejemplo, Landegran et al. (1988) *Science* 241: 1077-1080; y Nakazawa et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 360-364), siendo la última particularmente útil para detectar mutaciones puntuales en un gen (véase, p. ej., Abravaya et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 675-682). Este método puede incluir las etapas de recoger una muestra de células de un paciente, aislar el ácido nucleico (por ejemplo, genómico, ARNm o ambos) de las células de la muestra, poner en contacto la muestra de ácido nucleico con uno o más cebadores que se hibridan específicamente a un gen seleccionado en condiciones tales que se produce la hibridación y la amplificación del gen (si está presente), y detectar la presencia o ausencia de un producto de amplificación, o determinar el tamaño del producto de amplificación y comparar la longitud con una muestra de control. Se anticipa que puede ser deseable utilizar la PCR y/o LCR como una etapa de amplificación preliminar junto con cualquiera de las técnicas utilizadas para detectar mutaciones descritas en la presente memoria.

Los métodos de amplificación alternativos incluyen: replicación autosostenida de la secuencia (Guatelli et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 18874-1878), sistema de amplificación transcripcional (Kwoh, et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1173-1177), replicasa Q-β (Lizardi et al. (1988) *BioTechnology* 6: 1197), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido de la detección de las moléculas amplificadas mediante las técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos esquemas de detección son especialmente útiles para la detección de las moléculas de ácido nucleico si tales moléculas están presentes en muy poca cantidad.

Las mutaciones en un gen seleccionado de una célula de muestra se pueden identificar mediante las alteraciones de los patrones de escisión de las enzimas de restricción. Por ejemplo, el ADN de la muestra y del control se aísla, se amplifica (opcionalmente), se digiere con una o más endonucleasas de restricción, se determinan los tamaños de la longitud de los fragmentos mediante electroforesis en gel y se comparan. Las diferencias en el tamaño de los fragmentos entre el ADN de la muestra y del control indican la existencia de mutaciones en el ADN de la muestra. Además, el empleo de ribozimas específicas de secuencia (véase, por ejemplo, la patente de los EE.UU. n.º 5 498 531) se puede utilizar para puntuar la presencia de mutaciones específicas mediante la existencia o la pérdida de un sitio de escisión de la ribozima.

Las mutaciones genéticas se pueden identificar al hibridar unos ácidos nucleicos de muestra y de control, p. ej., ADN o ARN, a matrices de alta densidad que contienen cientos o miles de sondas oligonucleotídicas (Cronin et al. (1996) *Human Mutation* 7: 244-255; Kozal et al. (1996) *Nature Medicine* 2: 753-759). Por ejemplo, se pueden identificar las mutaciones genéticas en matrices bidimensionales que contienen sondas de ADN generadas con luz tal y como se describe en Cronin et al, (véase más arriba). Brevemente, se puede utilizar una primera matriz de sondas de hibridación para la detección a lo largo de grandes porciones de ADN en una muestra y un control que identifiquen los cambios de base entre las secuencias al fabricar matrices lineales de sondas solapantes secuenciales. Esta etapa permite identificar mutaciones puntuales. Esta etapa va seguida de una segunda matriz de hibridaciones que permite caracterizar mutaciones específicas utilizando matrices de sondas especializadas más pequeñas complementarias a todas las variantes o mutaciones detectadas. Cada matriz de mutaciones se compone de conjuntos de sondas paralelas, una complementaria al gen de tipo salvaje y la otra complementaria al gen mutante.

Se puede utilizar una cualquiera de las muchas reacciones de secuenciación conocidas en la técnica para secuenciar directamente el gen seleccionado y detectar mutaciones al comparar la secuencia de los ácidos nucleicos de la muestra con la correspondiente secuencia de tipo salvaje (control). Ejemplos de reacciones de secuenciación incluyen las basadas en las técnicas desarrolladas por Maxam y Gilbert ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 560) o Sanger ((1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463). También se contempla que se pueda utilizar uno cualquiera entre una serie de procedimientos de secuenciación automáticos al realizar los ensayos de diagnóstico ((1995) *BioTechniques* 19: 448), que incluyen la secuenciación mediante espectrometría de masas (véase, p. ej., la publicación PCT de patente internacional n.º WO 94/16101; Cohen et al. (1996) *Adv. Chromatogr.* 36: 127-162; y Griffin et al. (1993) *Appl. Biochem. Biotechnol.* 38: 147-159).

Otros métodos para detectar mutaciones en el gen seleccionado incluyen métodos en los que se utiliza la protección frente a los agentes de escisión para detectar bases mal apareadas en los heterodúplex de ARN/ARN o ARN/ADN (Myers et al. (1985) *Science* 230: 1242). Por regla general, la técnica de «escisión de apareamientos erróneos» conlleva la provisión de heterodúplex formados al hibridar ARN o ADN (marcados) que contienen la secuencia de tipo salvaje con ARN o ADN potencialmente mutante obtenido de una muestra de tejido. Los dúplex bicatenarios se tratan con un agente que escinde regiones monocatenarias del dúplex tales como las que existirán debido a los apareamientos erróneos de las bases entre las hebras de control y de la muestra. Se pueden tratar los dúplex ARN/ADN con ARNasa para digerir las regiones con apareamientos erróneos, y los híbridos ADN/ADN se pueden tratar con nucleasa S1 para digerir las regiones con apareamientos erróneos.

- 10 Se pueden tratar tanto los dúplex ADN/ADN como ARN/ADN con hidroxilamina o tetróxido de osmio y con piperidina para digerir las regiones con apareamientos erróneos. Después de la digestión de las regiones con apareamientos erróneos, se separa el material resultante por tamaños en geles desnaturizantes de poliacrilamida para determinar el lugar de la mutación. Véase, p. ej., Cotton et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4397; Saleeba et al. (1992) *Methods Enzymol.* 217: 286-295. En una realización preferente, el ADN o el ARN de control se puede marcar para su detección.

- La reacción de escisión del apareamiento erróneo emplea una o más proteínas que reconocen las bases mal apareadas en el ADN bicatenario (también llamadas enzimas de «reparación de apareamientos erróneos en el ADN») en sistemas definidos para detectar y cartografiar las mutaciones puntuales en los ADNc obtenidos de las muestras de células. Por ejemplo, la enzima mutY de *E. coli* escinde la A en los apareamientos erróneos G/A y la timidina ADN glucosilasa de las células HeLa escinde la T en los apareamientos erróneos G/T (Hsu et al. (1994) *Carcinogenesis* 15: 1657-1662). De acuerdo con una realización de ejemplo, una sonda basada en una secuencia seleccionada, por ejemplo, una secuencia de tipo salvaje, se hibrida a un ADNc o a otro producto de ADN a partir de la célula o células problema. Se trata el dúplex con una enzima de reparación de apareamientos erróneos en el ADN, y los productos de la escisión, si los hay, se pueden detectar mediante protocolos de electroforesis o similares. Véase, p. ej., la patente de los EE.UU. n.º 5 459 039.

- Se pueden utilizar alteraciones de la movilidad electroforética para identificar mutaciones en los genes. Por ejemplo, se puede utilizar el polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP) para detectar las diferencias en la movilidad electroforética entre el mutante y los ácidos nucleicos de tipo salvaje (Orita et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2766; véase también Cotton (1993) *Mutat. Res.* 285: 125-144; Hayashi (1992) *Genet. Anal. Tech. Appl.* 9: 73-79). Los fragmentos de ADN monocatenarios de los ácidos nucleicos de la muestra y del control se desnaturalizarán y se dejará que se renaturalicen. La estructura secundaria de los ácidos nucleicos monocatenarios varía según la secuencia, y la alteración resultante de la movilidad electroforética permite incluso la detección de un único cambio de base. Los fragmentos de ADN se pueden marcar o detectar con sondas marcadas. Se puede aumentar la sensibilidad del análisis utilizando ARN (en vez de ADN), en el que la estructura secundaria es más sensible a un cambio en la secuencia. En una realización preferente, el método en cuestión utiliza análisis de heterodúplex para separar moléculas bicatenarias heterodúplex basándose en los cambios en la movilidad electroforética (Keen et al. (1991) *Trends Genet.* 7: 5).

- El movimiento de los fragmentos del mutante o del tipo salvaje en los geles de poliacrilamida que contienen un gradiente desnaturizante se puede ensayar mediante electroforesis en gel desnaturizante en gradiente (DGGE) (Myers et al. (1985) *Nature* 313: 495). Cuando se utiliza la DGGE como método de análisis, se modificará el ADN para asegurar que no se desnaturaliza completamente, por ejemplo, mediante la adición por PCR de una pinza GC de casi 40 pb de ADN rico en GC y de elevado punto de fusión. En otra realización se utiliza un gradiente de temperatura en lugar de un gradiente desnaturizante para identificar las diferencias de movilidad del ADN del control y de la muestra (Rosenbaum y Reissner (1987) *Biophys Chem* 265: 12753).

- 45 Ejemplos de otras técnicas para detectar mutaciones puntuales incluyen, pero sin limitarse a ellas, la hibridación selectiva de oligonucleótidos, la amplificación selectiva o la extensión selectiva de cebadores. Por ejemplo, se pueden preparar cebadores oligonucleotídicos en los que se coloca la mutación conocida en el centro y luego se hibridan al ADN diana en condiciones que permiten la hibridación sólo si se da un apareamiento perfecto (Saiki et al. (1986) *Nature* 324: 163); Saiki et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6230). Tales oligonucleótidos específicos de alelo se hibridan a ADN diana amplificado por PCR o a numerosas mutaciones diferentes cuando los oligonucleótidos se pegan a la membrana de hibridación y se hibridan con el ADN diana marcado.

- Alternativamente, se puede utilizar la tecnología de amplificación específica de alelo que depende de la amplificación selectiva por PCR junto con la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para la amplificación específica pueden llevar la mutación de interés en el centro de la molécula (por lo que la amplificación depende de la hibridación diferencial) (Gibbs et al. (1989) *Nucleic Acids Res.* 17: 2437-2448) o en el extremo 3' de un cebador donde, en las condiciones apropiadas, el apareamiento erróneo puede impedir o reducir la extensión de la polimerasa (Prossner (1993) *Tibtech* 11: 238). Además, puede ser deseable introducir un nuevo sitio de restricción en la región de la mutación para crear una detección basada en la escisión (Gasparini et al. (1992) *Mol. Cell Probes* 6: 1). Se anticipa que en algunas realizaciones, también se puede realizar la amplificación utilizando la Taq ligasa para la amplificación (Barany (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 189). En tales casos, la ligación sólo tendrá lugar si se produce un apareamiento perfecto en el extremo 3' de la secuencia en 5', lo que hace posible la detección de la

presencia de una mutación conocida en un sitio específico al buscar la presencia o ausencia de amplificación.

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden realizar, por ejemplo, mediante la utilización de kits de diagnóstico preempaquetados que comprenden, al menos, un ácido nucleico de sonda o un reactivo de anticuerpo descrito en la presente memoria, que se puede utilizar de manera conveniente, por ejemplo, en entornos clínicos para diagnosticar a los pacientes que muestran síntomas o antecedentes familiares de una enfermedad o dolencia que implica un gen que codifica un polipéptido de la invención. Además, en los ensayos pronósticos descritos en la presente memoria se puede utilizar cualquier tipo de célula o tejido, p. ej., condrocitos, en los que se expresa el polipéptido de la invención.

4. Seguimiento de los efectos del modulador de TANGO 268

- 10 El seguimiento de la influencia de los agentes (p. ej., fármacos, formulaciones) sobre la expresión o la actividad de un polipéptido descrito en la presente memoria (p. ej., la capacidad para modular la proliferación celular, quimiotaxis y/o diferenciación anómalas) se puede aplicar en la detección selectiva básica de fármacos, estudios preclínicos, ensayos clínicos y durante las posologías del tratamiento terapéutico.

- 15 Por ejemplo, en los ensayos clínicos de sujetos que muestran una disminución de la expresión génica, de la cantidad de la proteína o de la actividad de la proteína, se pueden seguir, mediante la determinación con un ensayo de detección selectiva tal y como se describe en la presente memoria, la eficacia para aumentar la expresión génica, la cantidad de la proteína o la actividad de la proteína, que tiene un agente. Alternativamente, en los ensayos clínicos de sujetos que muestran un aumento de la expresión génica, de la cantidad de la proteína o de la actividad de la proteína, se pueden seguir, mediante la determinación con un ensayo de detección selectiva, la eficacia para disminuir la expresión génica, la cantidad de la proteína o la actividad de la proteína, que tiene un agente. En tales ensayos clínicos, la expresión o la actividad de un polipéptido descrito en la presente memoria y preferentemente la de otro polipéptido que ha estado implicado en, por ejemplo, un trastorno de proliferación celular, se puede utilizar como marcador de la capacidad de respuesta inmunitaria de una célula determinada.

- 25 Por ejemplo, y no a modo de limitación, se pueden identificar los genes, incluidos los de la invención, que se modulan en las células mediante el tratamiento con un agente (p. ej., formulación, fármaco o molécula pequeña) que modula la actividad o la expresión de un polipéptido de la invención (p. ej., como se identificó en un ensayo de detección selectiva descrito en la presente memoria). Por este motivo, para estudiar el efecto de los agentes sobre los trastornos de proliferación celular, por ejemplo, en un estudio clínico se pueden aislar las células y preparar el ARN y analizarles el nivel de expresión de un gen de la invención y de otros genes implicados en el trastorno. Los niveles de expresión génica (a saber, un patrón de expresión génica) se pueden cuantificar mediante análisis por transferencia de tipo Northern o mediante RT-PCR, tal y como se describe en la presente memoria, o alternativamente al medir la cantidad de proteína producida, mediante uno de los métodos que se describen en la presente memoria, o al medir los niveles de la actividad de un gen de la invención o de otros genes. De este modo, el patrón de expresión génica puede servir como un marcador, indicativo de la respuesta fisiológica de las células frente al agente. En consecuencia, se puede determinar este estado de respuesta antes del tratamiento del individuo con el agente, y en diferentes momentos durante el mismo.

- También se describe un método para vigilar la eficacia del tratamiento de un sujeto con un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, proteína, péptido, ácido nucleico, molécula pequeña u otro fármaco candidato identificado mediante los ensayos de detección selectiva descritos en la presente memoria) que comprende las etapas de (i) obtener una muestra preadministrativa de un sujeto antes de la administración del agente; (ii) detectar la cantidad del polipéptido o del ácido nucleico descrito en la presente memoria en la muestra preadministrativa; (iii) obtener una o más muestras posadministrativas del sujeto; (iv) detectar el nivel del polipéptido o del ácido nucleico de la invención en las muestras posadministrativas; (v) comparar la cantidad del polipéptido o del ácido nucleico descrito en la presente memoria en la muestra preadministrativa con la cantidad del polipéptido o del ácido nucleico de la invención en la muestra o muestras posadministrativas; y (vi) alterar la administración del agente al sujeto en consonancia. Por ejemplo, puede ser deseable aumentar la administración del agente para aumentar la expresión o la actividad del polipéptido a niveles mayores que los detectados, a saber, para aumentar la eficacia del agente. Alternativamente, puede ser deseable disminuir la administración del agente para disminuir la expresión o la actividad del polipéptido a niveles menores que los detectados, a saber, para disminuir la eficacia del agente.

- TANGO 268 se expresa sobre la superficie de las plaquetas. Como tal, una diana celular y terapéutica de los moduladores de TANGO 268 (p. ej., anticuerpo anti-TANGO 268) está fácilmente disponible para las pruebas y análisis (p. ej., pruebas y análisis *in vitro*). Esto, junto con la disponibilidad de varios ensayos de plaquetas relevantes diferentes (véase más arriba) proporciona una oportunidad de desarrollo de fármacos inusual para los moduladores de TANGO 268. Por ejemplo, la caracterización farmacodinámica *in vivo* de los moduladores de TANGO 268 se puede facilitar mediante la disponibilidad de diferentes ensayos de plaquetas (p. ej., prolongación del tiempo de hemorragia, medición cuantitativa del bloqueo del receptor TANGO 268, inhibición de la agregación plaquetaria *ex vivo*) que se pueden correlacionar entre sí para permitir una valoración más eficaz de las consecuencias funcionales de un modulador. Por lo tanto, la correlación que pueda existir entre tales ensayos garantiza que la caracterización *in vitro* de un modulador de TANGO 268 se aplique más directamente a la medición

del efecto terapéutico del modulador.

Además de utilizar la disponibilidad de las plaquetas y los ensayos de plaquetas para evaluar la eficacia terapéutica, incluida la eficacia clínica, de un modulador de TANGO 268, también se puede utilizar esta disponibilidad para los aspectos preclínicos del desarrollo de fármacos tales como determinación de la respuesta a la dosis del modulador, toxicología, magnitud del efecto (por ejemplo, magnitud del efecto inicial y magnitud de la duración del efecto), función, especificidad (p. ej., especificidad con respecto a determinadas funciones de las plaquetas), especificidad del receptor y especificidad de la especie (que, a su vez, puede identificar modelos de animales apropiados para los estudios de farmacología).

- 5 También se incluye en la presente descripción un método para identificar un modulador de TANGO 268, (p. ej., un anticuerpo anti-TANGO 268), que comprende: incubar una muestra rica en plaquetas (preferentemente plaquetas humanas) con un compuesto y un agonista de plaquetas (p. ej., ADP, epinefrina, trombina, colágeno) y ensayar la agregación plaquetaria, de tal forma que si la agregación plaquetaria en la muestra difiere de la de una correspondiente muestra rica en plaquetas incubada con el agonista de plaquetas en ausencia del compuesto, entonces se identifica un modulador de TANGO 268 de la agregación plaquetaria. En una variación de esta
- 10 realización, se incuba la muestra con el compuesto antes de la adición y la incubación simultánea con el agonista de plaquetas.

- También se describe un método para vigilar la eficacia clínica de un modulador de TANGO 268 (o la eficacia del tratamiento con un modulador de TANGO 268), que comprende: incubar una muestra de paciente que comprende plaquetas (una muestra rica en plaquetas, p. ej., una que contiene aproximadamente 200 000/300 000 plaquetas por
- 20 ml) con un agonista de plaquetas, medir el nivel de la agregación plaquetaria en la muestra, y comparar el nivel obtenido con el de una correspondiente muestra de plaquetas de control, en donde la muestra del paciente se obtiene de un paciente al que se le ha administrado un modulador de TANGO 268, y la muestra de plaquetas de control es una que se ha incubado con el agonista de plaquetas, pero que no se ha tratado con el modulador de TANGO 268. En los casos en los que el nivel de agregación obtenido en la muestra de paciente es menor que el de
- 25 la muestra de control, se confirma la vigilancia de la eficacia clínica del modulador de TANGO 268 (o la eficacia del tratamiento con el modulador de TANGO 268).

- También se describe un método para determinar la dosis terapéutica de un modulador de TANGO 268 a administrar a un individuo que necesita un tratamiento para una alteración relacionada con la TANGO 268, que comprende: administrar una dosis de un modulador de TANGO 268 a un modelo animal no humano de una alteración
- 30 relacionada con la TANGO 268, y ensayar la función de TANGO 268 y/o ensayar un síntoma de la afección relacionada con la TANGO 268 en el animal, de tal modo que si la función y/o el síntoma de TANGO 268 en el animal se modula de un modo que se parece lo más posible al correspondiente animal que no muestra la afección de la TANGO 268, se determina una dosis terapéutica del modulador de TANGO 268, p. ej., extrapolando a la correspondiente dosis en un humano.

- 35 La función y/o la agregación de las plaquetas se puede ensayar mediante, p. ej., técnicas tales como las presentadas en la presente memoria. Además, el modelo animal puede ser, p. ej., uno de los modelos animales descritos en la presente memoria.

C. Métodos de tratamiento

- También se describen en la presente memoria métodos preventivos y terapéuticos para tratar un sujeto que corre el
- 40 riesgo (o es susceptible) de tener un trastorno o de sufrir un trastorno asociado a la expresión o actividad anómala de un polipéptido de la invención, tal y como se explica, por ejemplo, en los apartados anteriores referentes a los usos de las secuencias de la invención. Por ejemplo, los trastornos caracterizados por la expresión o actividad anómala de los polipéptidos de la invención incluyen trastornos inmunitarios, trastornos del desarrollo, trastornos embrionarios, trastornos hepáticos, enfermedades cerebrovasculares (p. ej., accidente cerebrovascular e isquemia),
- 45 enfermedades de tromboembolia venosa (p. ej., enfermedades que implican hinchazón, dolor y úlceras en las piernas, embolia pulmonar, trombosis venosa abdominal), enfermedades coronarias (p. ej., enfermedades cardiovasculares que incluyen angina inestable, infarto de miocardio agudo, arteriopatía coronaria, revascularización coronaria, tromboembolia ventricular, aterosclerosis, arteriopatía coronaria y formación de placas), y cánceres metastásicos (p. ej., la metástasis de células cancerosas del colon y del hígado). Los ácidos nucleicos, polipéptidos
- 50 y moduladores de los mismos de la invención se pueden utilizar para tratar enfermedades y trastornos inmunitarios (p. ej., trastornos plaquetarios), trastornos embrionarios, trastornos hepáticos, enfermedades cerebrovasculares (p. ej., accidente cerebrovascular e isquemia), enfermedades de tromboembolia venosa (p. ej., enfermedades que implican hinchazón, dolor y úlceras en las piernas, embolia pulmonar, trombosis venosa abdominal), trastornos trombóticos (p. ej., oclusión trombótica de las arterias coronarias), enfermedades coronarias (p. ej., enfermedades
- 55 cardiovasculares, que incluyen angina de pecho, infarto de miocardio, infarto de miocardio agudo, arteriopatía coronaria, revascularización coronaria, reestenosis coronaria, tromboembolia ventricular, aterosclerosis, arteriopatía coronaria (p. ej., trastornos oclusivos arteriales) y formación de placas, isquemia cardíaca, incluidas las complicaciones relacionadas con procedimientos coronarios, tales como procedimientos de angioplastia de la arteria coronaria (angioplastia con balón). Con respecto a los procedimientos coronarios, se puede conseguir tal
- 60 modulación mediante la administración de moduladores de la GPVI antes, durante o después del procedimiento. En

una realización preferente, se puede utilizar tal administración para prevenir la isquemia cardíaca aguda después de la angioplastia y los cánceres metastásicos (p. ej., la metástasis de las células cancerosas del colon y del hígado) así como otros trastornos descritos en la presente memoria.

- Por lo tanto, se pueden utilizar los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores para modular trastornos ocasionados por alguna lesión de vasos sanguíneos que acabe dando lugar a la agregación plaquetaria. Tales lesiones de vasos sanguíneos incluyen, pero sin limitarse a ellas, lesión a la pared del vaso, tales como lesiones del vaso que dan lugar a la exposición de una superficie muy trombogénica en el interior de un vaso sanguíneo que si no hubiera permanecido intacto, p. ej., lesiones de la pared del vaso que dan lugar a la liberación de ADP, trombina y/o epinefrina, estrés de cizalla por líquidos que se produce en el sitio de estrechamiento del vaso, rupturas y/o desgarros en los sitios de las placas ateroscleróticas, y lesión ocasionada por la angioplastia con balón o la aterectomía.

- Preferentemente, los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores (p. ej., anticuerpos anti-TANGO 268) no afectan a la adhesión inicial de las plaquetas a la superficie del vaso, ni afectan a tal adhesión en un grado relativamente menor que el efecto sobre la agregación entre las propias plaquetas, p. ej., agregación desregulada entre plaquetas, que sigue a la adhesión de plaquetas inicial. Además, en algunas realizaciones, se prefiere que los ácidos nucleicos de TANGO 268, sus proteínas y sus moduladores (p. ej., anticuerpos anti-TANGO 268) no afecten a otros atributos o funciones de las plaquetas, tales como el cambio de forma de las plaquetas inducido por los agonistas (por ejemplo, la aglutinación de las plaquetas, mediada por la GPIb-vWF, que induce la ristocetina), la liberación de los componentes granulares internos de las plaquetas, la activación de las vías de transducción de señales o la inducción de la movilización del calcio durante la activación de las plaquetas.

1. Métodos preventivos

- En un aspecto, la invención da a conocer un método para prevenir en un sujeto una enfermedad o afección asociada a una expresión o actividad anómala de un polipéptido de la invención, al administrar al sujeto un agente que modula la expresión o al menos una actividad del polipéptido. Los sujetos que corren el riesgo de padecer una enfermedad causada por una expresión o actividad anómala de un polipéptido de la invención, o a la que esto contribuye, se pueden identificar mediante, por ejemplo, alguno o un conjunto de ensayos diagnósticos o pronósticos que se describen en la presente memoria. La administración de un agente preventivo se puede producir antes de la manifestación de los síntomas característicos de la anomalía, de tal forma que se previene una enfermedad o trastorno o, alternativamente, se retrasa su avance. Según el tipo de anomalía, por ejemplo, se puede utilizar un agonista o antagonista para tratar el sujeto. Por ejemplo, se puede utilizar un antagonista de una proteína TANGO 240 para tratar un trastorno artropático, por ejemplo, artritis reumatoide. Se puede determinar el agente adecuado basándose en los ensayos de detección selectiva descritos en la presente memoria.

2. Métodos terapéuticos

- Otro aspecto de la invención hace referencia a los métodos para modular la expresión o actividad de un polipéptido de la invención para propósitos terapéuticos. El método modulador de la invención implica poner en contacto una célula con un agente que modula una o más actividades del polipéptido. Un agente que modula la actividad puede ser un agente como los descritos en la presente memoria, tal como un ácido nucleico o una proteína, un ligando cognado del péptido que se sintetiza de forma natural, un péptido, un peptidomimético u otra molécula pequeña. En una realización, el agente estimula una o más de las actividades biológicas del polipéptido. Ejemplos de tales agentes estimuladores incluyen el polipéptido activo de la invención y una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención que se ha introducido en la célula. En otra realización, el agente inhibe una o más de las actividades biológicas del polipéptido de la invención. Ejemplos de tales agentes inhibidores incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido y anticuerpos. Estos métodos moduladores se pueden realizar *in vitro* (por ejemplo, al cultivar la célula con el agente) o, alternativamente, *in vivo* (por ejemplo, al administrar el agente a un sujeto). Como tal, la presente invención da a conocer métodos para tratar un individuo afectado por una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión o actividad anómala de un polipéptido de la invención. En una realización, el método implica administrar un agente (por ejemplo, un agente identificado por un ensayo de detección selectiva descrito en la presente memoria) o una combinación de agentes que modula (por ejemplo, induce o reprime) la expresión o la actividad. En otra realización, el método implica administrar un polipéptido de la invención o una molécula de ácido nucleico de la invención como tratamiento para compensar la reducción o anomalía de la expresión o actividad del polipéptido.

- La estimulación de la actividad es deseable en situaciones en las que la actividad o la expresión es anormalmente baja o reprimida y/o en las que un aumento de la actividad es probable que tenga un efecto beneficioso. Y al contrario, la inhibición de la actividad es deseable en situaciones en las que la actividad o la expresión está anormalmente elevada o inducida y/o en las que una disminución de la actividad es probable que tenga un efecto beneficioso.

Depósito de clones

Un clon que contiene una molécula de ADNc que codifica la TANGO 268 humana (clon EpthEa11d1) se depositó

con la American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) el 30 de marzo de 1999, con el número de acceso 207180.

Un clon que contiene una molécula de ADNc que codifica la TANGO 268 de ratón (clon EpTm268) se depositó con la American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) el 14 de junio de 1999 como PTA-225.

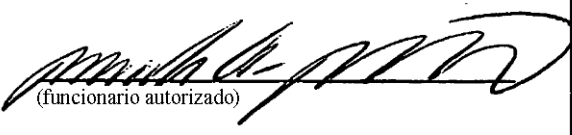
Las células de hibridoma murino siguientes se depositaron con la American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209) el 21 de abril de 2000 y se les asignaron los números de depósito de patente que se indican:

Depósito	Número de depósito de patente
Hibridoma murino M22 9012.2	PTA-1746
Hibridoma murino M22 1P10.2	PTA-1747
Hibridoma murino M22 8M14.3	PTA-1748
Hibridoma murino M22 9E18.2	PTA-1749
Hibridoma murino M22 7H4.6	PTA-1750

Los scFv siguientes se depositaron con la American Type Culture Collection (10801 University Boulevard, Manassas, VA, 20110-2209) el 30 de junio de 2000 y se les asignaron los números de depósito de patente que se indican:

Depósito	Número de depósito de patente
A4	PTA-____
A9	PTA-____
A10	PTA-____
C3	PTA-____

Solicitud internacional número: **PCT/** /

MICROORGANISMOS	
Hoja optativa en conexión con el microorganismo referido en las páginas __, líneas __ de la descripción	
A. IDENTIFICACIÓN DEL DEPÓSITO Se identificarán en una hoja adicional los demás depósitos	
Nombre de la institución depositaria American Type Culture Collection	
Dirección de la institución depositaria (incluido el código postal y el país) 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 US	
Fecha del depósito: <u>30 de marzo de 1999</u> Número de acceso: <u>107180</u>	
B. OTRAS INDICACIONES (dejar en blanco si no es aplicable). Esta información continúa en una hoja adjunta distinta	
C. RELACIÓN DE ESTADOS PARA LOS QUE SE HACEN LAS INDICACIONES (si no son todos los estados)	
D. INDICACIONES A PROVEER POR SEPARADO (dejar en blanco si no es aplicable)	
Las indicaciones recogidas a continuación se enviarán a la Oficina Internacional más adelante (especifique la naturaleza general de las indicaciones, por ejemplo «Número de acceso del depósito»)	
E. ☒ Esta hoja se recibió con la solicitud Internacional cuando se presentó (márquese en la oficina receptora)	
 (funcionario autorizado)	
☐ La fecha de recepción en la Oficina Internacional (de manos del solicitante)	
fue _____ _____ (funcionario autorizado)	

Formulario PCT/RO/134 (enero de 1981)

Solicitud internacional número: PCT/ /

Formulario PCT/RO/134 (continuación)

American Type Culture Collection

5

10801 University Blvd.

Manassas, Va 20110-2209

EE.UU.

Número de acceso	Fecha del depósito
PTA-225	14 de junio de 1999
PTA-1746	21 de abril de 2000
PTA-1747	21 de abril de 2000
PTA-1748	21 de abril de 2000
PTA-1749	21 de abril de 2000
PTA-2750	21 de abril de 2000
PTA-	29 de junio de 2000
PTA-	29 de junio de 2000
PTA-	29 de junio de 2000
PTA-	29 de junio de 2000

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Millennium Pharmaceuticals, Inc.

<120> GLUCOPROTEÍNA VI Y SUS USOS

<130> 7853-211-228

<150> 09/503,387 <151> 2/19/00

<150> 09/454,824 <151> 12/6/99

<150> 09/345,468 <151> 6/30/99

<160> 72

<170> FastSEQ para Windows Versión 3.0

<210> 1

<211> 2047

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggagtcgacc	cacgcgtccg	cagggctgag	gaaccatgtc	tccatccccg	accgccctct	60
tctgtcttgg	gctgtgtctg	gggcgtgtgc	cagcgcagag	tggaccgctc	cccaagccct	120
ccctccaggc	tctgcccagc	tccctggtgc	ccctggagaa	gccagtgacc	ctccggtgcc	180
agggacctcc	gggcgtggac	ctgtaccgcc	tggagaagct	gagttccagc	aggtaccagg	240
atcaggcagt	cctcttcatc	ccggccatga	agagaagtct	ggctggacgc	taccgctgct	300
cctaccagaa	cgaagcctc	tggteccctg	ccagcgacca	gctggagctc	gttgccacgg	360
gagtttttgc	caaaccctcg	ctctcagccc	agcccggccc	ggcgggtgctg	tcaggagggg	420
acgtaaccct	acagtgtcag	actcgggtatg	gctttgacca	atttgctctg	tacaaggaag	480
gggaccctgc	gcccacaag	aatcccagaga	gatggtaccg	ggctagtttc	cccatcatca	540
cggtgaccgc	cgcacacagc	ggaacctacc	gatgctacag	cttctccagc	agggacccat	600
acctgtggtc	ggccccagc	gacccctg	agcttgtggt	cacaggaacc	tctgtgaccc	660
ccagccggtt	accaacagaa	ccaccttctc	cggtagcaga	attctcagaa	gccaccgctg	720
aactgaccgt	ctcattcaca	aacaaagtct	tcacaactga	gacttctagg	agtatcacca	780
ccagtccaaa	ggagtcagac	tctccagctg	gtcctgccc	ccagtactac	accaagggca	840
acctggtccg	gatatgcctc	ggggctgtga	tcctaataat	cctggcgggg	tttctggcag	900
aggactggca	cagccggagg	aagcgcctgc	ggcacagggg	cagggctgtg	cagaggccgc	960
ttccgcccc	gccgcccc	ccgcagaccc	ggaaatcaca	cgggggtcag	gatggaggcc	1020
gacaggatgt	tcacagccgc	gggttatggt	catgaccgct	gaaccccagg	cacggtcgtg	1080
tccaagggag	ggatcatggc	atgggaggcg	actcaaagac	tggcgtgtgt	ggagcgtgga	1140
agcaggaggg	cagaggctac	agctgtggaa	acgaggccat	gctgcctcct	cctggtgttc	1200
catcaggagg	ccgttcggcc	agtgtctgtc	tgtctgtctg	cctctctgtc	tgagggcacc	1260
ctccatttgg	gatggaagga	atctgtggag	accccatcct	cctccctgca	cactgtggat	1320
gacatggtac	cctggctgga	ccacatactg	gctcttttct	tcaacctctc	taatattgggc	1380
tccagacgga	tctctaaggt	tcccagctct	cagggttgac	tctgttccat	cctctgtgca	1440
aaatcctcct	gtgcttccct	ttggccctct	gtgctcttgt	ctgggtttcc	ccagaaactc	1500
tcacctcac	tccatctccc	actgcggtct	aacaaatctc	ctttcgtctc	tcagaacggg	1560
tcttgaggc	agtttggtga	tgtcattcat	tttccttagt	gtaaaactag	cacgttgccc	1620
gcttcccttc	acattagaaa	acaagatcag	cctgtgcaac	atggtgaaac	ctcatctcta	1680
ccaacaaaac	aaaaaaacac	aaaaattagc	caggtgtggt	ggtgcatccc	tatactccca	1740
gcaactcggg	gggctgaggt	gggagaatgg	cttgagcctg	ggaggcagag	gttgcaagtga	1800
gctgagatca	caccactgca	ctctagctcg	ggtgacgaag	cctgaccttg	tctcaaaaaa	1860
tacagggatg	aatatgtcaa	ttacctgat	ttgatcatag	cacgttgtat	acatgtactg	1920
caatatgtct	gtccacccca	taaatatgta	caattatgta	tacattttta	aaatcataaa	1980
aataagataa	tgaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaggg	cgggcccgtg	gactagtcta	2040
gagaaca						2047

<210> 2

<211> 1017

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 368 826 T3

```

atgtctccat ccccgaccgc cctcttctgt cttgggctgt gtctggggcg tgtgccagcg      60
cagagtggac cgctcccaaa gccctccctc caggctctgc ccagctccct ggtgcccctg      120
gagaagccag tgacctccg gtgccaggga cctccgggcg tggacctgta ccgcctggag      180
aagctgagtt ccagcaggta ccaggatcag gcagtcctct tcatcccggc catgaagaga      240
agtctggctg gacgctaccg ctgctcctac cagaacggaa gcctctggtc cctgcccagc      300
gaccagctgg agctcgttgc cacgggagtt ttgccaac cctcgctctc agcccagccc      360
ggcccggcgg tgtcgtcagg aggggacgta accctacagt gtcagactcg gtatggcctt      420
gaccaatttg ctctgtacaa ggaaggggac cctgcgccct acaagaatcc cgagagatgg      480
taccgggcta gtttcccat catcacggtg accgccgcc acagcggaac ctaccgatgc      540
tacagcttct ccagcaggga cccataacct tggtcggccc ccagcgaccc cctggagctt      600
gtggtcacag gaacctctgt gacccccagc cggttaccaa cagaaccacc ttctcggta      660
gcagaattct cagaagccac cgctgaactg accgtctcat tcacaaacaa agtcttcaca      720
actgagactt ctaggagtat caccaccagt ccaaaggagt cagactctcc agctggctct      780
gcccggcagt actacaccaa gggcaacctg gtccggatat gcctcggggc tgtgatacta      840
ataatcctgg cggggtttct ggcagaggac tggcacagcc ggaggaagcg cctgcggcac      900
aggggcaggg ctgtgcagag gccgcttccg cccctgccgc ccctcccgca gaccggaaa      960
tcacacgggg gtcaggatgg aggccgacag gatgttcaca gccgcggggt atgttca      1017

```

<210> 3

<211> 339

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

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

```

Ala Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr
195 200 205
Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser
210 215 220
Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr
225 230 235 240
Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser
245 250 255
Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg
260 265 270
Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala
275 280 285
Glu Asp Trp His Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala
290 295 300
Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys
305 310 315 320
Ser His Gly Gly Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly
325 330 335
Leu Cys Ser

<210> 4
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly
1 5 10 15
Arg Val Pro Ala
20

<210> 5
<211> 319
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala Leu Pro Ser Ser
1 5 10 15
Leu Val Pro Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys Gln Gly Pro Pro
20 25 30
Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser Ser Arg Tyr Gln
35 40 45
Asp Gln Ala Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg Ser Leu Ala Gly
50 55 60
Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp Ser Leu Pro Ser
65 70 75 80
Asp Gln Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala Lys Pro Ser Leu
85 90 95
Ser Ala Gln Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly Asp Val Thr Leu
100 105 110
Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala Leu Tyr Lys Glu
115 120 125
Gly Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp Tyr Arg Ala Ser
130 135 140
Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly Thr Tyr Arg Cys
145 150 155 160
Tyr Ser Phe Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser Ala Pro Ser Asp
165 170 175
Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr Pro Ser Arg Leu
180 185 190

```

Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser Glu Ala Thr Ala
    195                200                205
Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr Thr Glu Thr Ser
    210                215                220
Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser Pro Ala Gly Pro
    225                230                235                240
Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg Ile Cys Leu Gly
    245                250                255
Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala Glu Asp Trp His
    260                265                270
Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala Val Gln Arg Pro
    275                280                285
Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys Ser His Gly Gly
    290                295                300
Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly Leu Cys Ser
    305                310                315

```

<210> 6
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 6
Cys Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser
  1          5          10          15
Ser Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Ala Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys
    20          25          30
Arg Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg Cys
    35          40

```

<210> 7
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 7
Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala Leu Tyr Lys Glu Gly
  1          5          10          15
Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp Tyr Arg Ala Ser Phe
    20          25          30
Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly Thr Tyr Arg Cys
    35          40          45

```

<210> 8
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 8
Leu Val Arg Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly
  1          5          10          15
Phe Leu Ala

```

<210> 9
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 9
Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala Leu Pro Ser Ser
  1          5          10          15

```

```

Leu Val Pro 20 Glu Lys Pro Val Thr 25 Leu Arg Cys Gln 30 Gly Pro Pro
Gly Val Asp 35 Leu Tyr Arg Leu Glu 40 Lys Leu Ser Ser 45 Arg Tyr Gln
Asp Gln Ala 50 Val Leu Phe Ile 55 Pro Ala Met Lys Arg 60 Ser Leu Ala Gly
Arg Tyr Arg Cys Ser 70 Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp Ser Leu Pro Ser
Asp Gln Leu Glu 85 Leu Val Ala Thr Gly 90 Val Phe Ala Lys Pro Ser Leu
Ser Ala Gln 100 Gly Pro Ala Val 105 Ser Gly Gly Asp Val Thr Leu
Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe 120 Asp Gln Phe Ala Leu Tyr Lys Glu
Gly Asp 130 Pro Ala Pro Tyr Lys 135 Asn Pro Glu Arg Trp Tyr Arg Ala Ser
Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His 155 Ser Gly Thr Tyr Arg Cys
Tyr Ser Phe Ser Ser 165 Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser Ala Pro Ser Asp
Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr Pro Ser Arg Leu
Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser 200 Val Ala Glu Phe Ser Glu Ala Thr Ala
Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr 215 Asn Lys Val Phe Thr Thr Glu Thr Ser
Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser Pro Ala Gly Pro
Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn
245

```

<210> 10
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 10
Glu Asp Trp His Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala
1      5      10      15
Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys
20      25      30
Ser His Gly Gly Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly
35      40      45
Leu Cys Ser
50

```

**

<210> 11
 <211> 2170
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

```

<400> 11
ctgagggtc atccctctgc agagcgcgagg gtcaccggga ggagacgcca tgacgcccgc 60
cctcacagcc ctgctctgcc ttgggctgag tctgggcccc aggacccgag tgcaggcagg 120
gcccttcccc aaaccacccc tctgggctga gccaggctct gtgatcagct gggggagccc 180
cgtgaccatc tgggtgtcagg ggagcctgga ggcccaggag taccgactgg ataaagaggg 240
aagcccagag cccttgga gaaataaccc actggaaccc aagaacaagg ccagattctc 300
catcccatcc atgacagagc accatgcggg gagataccgc tgccactatt acagctctgc 360
aggctggtca gagcccagcg accccctgga gctggtgatg acaggattct acaacaaacc 420
caccctctca gccctgcccc gccctgtggt ggccctcagg ggaatatga ccctccgatg 480
tggtcacag aagggatatc accattttgt tctgatgaag gaaggagaac accagctccc 540
ccggaccctg gactcacagc agctccacag tggggggttc caggccctgt tccctgtggg 600

```

```

ccccgtgaac cccagccaca ggtggagggt cacaatgctat tactattata tgaacacccc 660
ccaggtgtgg tcccacccca gtgaccccct ggagattctg cctcagggcg tgtctaggaa 720
gccctccctc ctgaccctgc agggccctgt cctggcccct gggcagagcc tgaccctcca 780
gtgtggctct gatgtcggct acgacagatt tgttctgtat aaggaggggg aacgtgactt 840
cctccagegc cctggccagc agccccaggc tgggctctcc caggccaact tcaccctggg 900
ccctgtgagc ccctcccacg ggggccagta caggtgctat ggtgcacaca acctctcctc 960
cgagtggctg gccccagcg accccctgaa catcctgatg gcaggacaga tctatgacac 1020
cgtctccctg tcagcacagc cgggcccac agtggcctca ggagagaacg tgaccctgct 1080
gtgtcagtcg tggggcagc ttgacacttt cttctgacc aaagaagggg cagcccatcc 1140
cccactgctg ctgagatcaa tgtacggagc tcataagtac caggctgaat tccccatgag 1200
tctgtgacc tcagcccacg cggggaccta caggtgctac ggctcatata gctccaaccc 1260
ccacctgctg tctttcccca gtgagcccct ggaactcatg gtctcaggac actctggagg 1320
ctccagcctc ccacccacag ggccgcccct cacacctggt ctgggaagat acctggaggt 1380
tttgattggg gtctcgggtg ccttcgtcct gctgctcttc ctctcctctt tctcctcct 1440
ccgacgtcag cgtcacagca aacacaggac atctgaccag agaaagactg atttccagcg 1500
tctgtcaggg gctgcggaga cagagcccaa ggacaggggc ctgctgagga ggtccagccc 1560
agctgtgac gtccaggaag aaaacctcta tgctgccgtg aaggacacac agtctgagga 1620
caggggtggg ctggacagtc agagcccaca cgatgaagac cccagggcag tgacgtatgc 1680
cccgggtgaaa cactccagtc ctaggagaga aatggcctct cctccctcct cactgtctgg 1740
ggaattcctg gacacaaagg acagacaggt ggaagaggac aggcagatgg acactgaggc 1800
tgctgcatct gaagcctccc aggatgtgac ctacgcccag ctgcacagct tgacccttag 1860
acggaaggca actgagcctc ctccatccca ggaaggggaa cctccagctg agcccagcat 1920
ctacgccact ctggccatcc actagcccgg ggggtacgca gacccacac tcagcagaag 1980
gagactcagg actgctgaag gcacgggagc tgccccaggt ggacaccagt gaacccagt 2040
cagcctggac ccctaacaca gaccatgagg agacgctggg aacttgtggg actcacctga 2100
ctcaaagatg actaatatcg tcccattttg gaaataaagc aacagacttc tcaacaatca 2160
atgagttaat
2170

```

<210> 12
 <211> 631
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 12
Met Thr Pro Ala Leu Thr Ala Leu Leu Cys Leu Gly Leu Ser Leu Gly
1      5      10     15
Pro Arg Thr Arg Val Gln Ala Gly Pro Phe Pro Lys Pro Thr Leu Trp
20     25     30
Ala Glu Pro Gly Ser Val Ile Ser Trp Gly Ser Pro Val Thr Ile Trp
35     40     45
Cys Gln Gly Ser Leu Glu Ala Gln Glu Tyr Arg Leu Asp Lys Glu Gly
50     55     60
Ser Pro Glu Pro Leu Asp Arg Asn Asn Pro Leu Glu Pro Lys Asn Lys
65     70     75     80
Ala Arg Phe Ser Ile Pro Ser Met Thr Glu His His Ala Gly Arg Tyr
85     90     95
Arg Cys His Tyr Tyr Ser Ser Ala Gly Trp Ser Glu Pro Ser Asp Pro
100    105    110
Leu Glu Leu Val Met Thr Gly Phe Tyr Asn Lys Pro Thr Leu Ser Ala
115    120    125
Leu Pro Ser Pro Val Val Ala Ser Gly Gly Asn Met Thr Leu Arg Cys
130    135    140
Gly Ser Gln Lys Gly Tyr His His Phe Val Leu Met Lys Glu Gly Glu
145    150    155    160
His Gln Leu Pro Arg Thr Leu Asp Ser Gln Gln Leu His Ser Gly Gly
165    170    175
Phe Gln Ala Leu Phe Pro Val Gly Pro Val Asn Pro Ser His Arg Trp
180    185    190
Arg Phe Thr Cys Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asn Thr Pro Gln Val Trp Ser
195    200    205
His Pro Ser Asp Pro Leu Glu Ile Leu Pro Ser Gly Val Ser Arg Lys
210    215    220

```

Pro	Ser	Leu	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Pro	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Gln	Ser
225					230					235				240	
Leu	Thr	Leu	Gln	Cys	Gly	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Asp	Arg	Phe	Val	Leu
				245					250					255	
Tyr	Lys	Glu	Gly	Glu	Arg	Asp	Phe	Leu	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gln	Pro
			260					265					270		
Gln	Ala	Gly	Leu	Ser	Gln	Ala	Asn	Phe	Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Ser	Pro
		275					280					285			
Ser	His	Gly	Gly	Gln	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ala	His	Asn	Leu	Ser	Ser
	290					295					300				
Glu	Trp	Ser	Ala	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Asn	Ile	Leu	Met	Ala	Gly	Gln
305					310					315					320
Ile	Tyr	Asp	Thr	Val	Ser	Leu	Ser	Ala	Gln	Pro	Gly	Pro	Thr	Val	Ala
				325					330					335	
Ser	Gly	Glu	Asn	Val	Thr	Leu	Leu	Cys	Gln	Ser	Trp	Trp	Gln	Phe	Asp
			340					345					350		
Thr	Phe	Leu	Leu	Thr	Lys	Glu	Gly	Ala	Ala	His	Pro	Pro	Leu	Arg	Leu
		355					360					365			
Arg	Ser	Met	Tyr	Gly	Ala	His	Lys	Tyr	Gln	Ala	Glu	Phe	Pro	Met	Ser
	370					375					380				
Pro	Val	Thr	Ser	Ala	His	Ala	Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Gly	Ser	Tyr
385					390					395					400
Ser	Ser	Asn	Pro	His	Leu	Leu	Ser	Phe	Pro	Ser	Glu	Pro	Leu	Glu	Leu
				405					410					415	
Met	Val	Ser	Gly	His	Ser	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Pro	Pro	Thr	Gly	Pro
			420					425					430		
Pro	Ser	Thr	Pro	Gly	Leu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Val	Leu	Ile	Gly	Val
		435					440					445			
Ser	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu
	450					455					460				
Arg	Arg	Gln	Arg	His	Ser	Lys	His	Arg	Thr	Ser	Asp	Gln	Arg	Lys	Thr
465					470					475					480
Asp	Phe	Gln	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Ala	Glu	Thr	Glu	Pro	Lys	Asp	Arg
				485					490					495	
Gly	Leu	Leu	Arg	Arg	Ser	Ser	Pro	Ala	Ala	Asp	Val	Gln	Glu	Glu	Asn
			500					505					510		
Leu	Tyr	Ala	Ala	Val	Lys	Asp	Thr	Gln	Ser	Glu	Asp	Arg	Val	Glu	Leu
		515					520					525			
Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Asp	Glu	Asp	Pro	Gln	Ala	Val	Thr	Tyr	Ala
	530					535					540				
Pro	Val	Lys	His	Ser	Ser	Pro	Arg	Arg	Glu	Met	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser
545					550					555					560
Ser	Leu	Ser	Gly	Glu	Phe	Leu	Asp	Thr	Lys	Asp	Arg	Gln	Val	Glu	Glu
			565						570					575	
Asp	Arg	Gln	Met	Asp	Thr	Glu	Ala	Ala	Ser	Glu	Ala	Ser	Gln	Asp	
			580					585					590		
Val	Thr	Tyr	Ala	Gln	Leu	His	Ser	Leu	Thr	Leu	Arg	Arg	Lys	Ala	Thr
		595					600					605			
Glu	Pro	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Gly	Glu	Pro	Pro	Ala	Glu	Pro	Ser	Ile
	610					615					620				
Tyr	Ala	Thr	Leu	Ala	Ile	His									
625					630										

<210> 13

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly	Gln	Ser	Val	Ile	Leu	Arg	Cys	Gln	Gly	Pro	Pro	Asp	Val	Asp	Leu
1				5					10					15	

ES 2 368 826 T3

Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Lys Pro Glu Lys Tyr Glu Asp Gln Asp Phe
 20 25 30
 Leu Phe Ile Pro Thr Met Glu Arg Ser Asn Ala Gly Arg Tyr Arg Cys
 35 40 45
 Ser Tyr
 50

<210> 14
 <211> 1163
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 14
 gagtcgaccc acgcgtccgc ttccctgctt ggccacatag ctcaggactg ggttgcagaa 60
 ccatgtctcc agcctcacc acccttcttct gtattgggct gtgtgtactg caagtgatcc 120
 aaacacagag tggcccactc cccaagcctt ccctccaggc tcagcccagt tccctggtag 180
 ccctgggtca gtcagttatt ctgaggtgcc agggacctcc agatgtggat ttatatcgcc 240
 tggagaaact gaaaccggag aagtatgaag atcaagactt tctcttcatt ccaaccatgg 300
 aaagaagtaa tgctggacgg tatcgatgct cttatcagaa tgggagtcac tggctctctc 360
 caagtgacca gcttgagcta attgctacag gtgtgtatgc taaaccctca ctctcagctc 420
 atcccagctc agcagtcctt caaggcaggg atgtgactct gaagtgccag agcccataca 480
 gttttgatga attcgttcta taaaaagaag gggatactgg gccttataag agacctgaga 540
 aatggtaccg ggccaatttc cccatcatca cagtactgac tgctcacagt gggacgtacc 600
 ggtgtttacag cttctccagc tcatctccat acctgtggtc agccccgagt gacctctag 660
 tgcttgtggg tactggactc tctgccactc ccagccaggg acccacggaa gaatcatttc 720
 ctgtgacaga atcctccagg agaccttcca tcttaccac aaacaaaata tctacaactg 780
 aaaagcctat gaatatcact gcctctccag aggggctgag ccctccaatt ggttttgctc 840
 atcagcacta tgccaagggg aatctgggtc ggatatgcct tgggtgccacg attataataa 900
 ttttgttggg gcttctagca gaggattggc acagtcggaa gaaatgcctg caacacagga 960
 tgagagcttt gcaaaaggcca ctaccacccc tcccactggc ctagaaataa cttggctttc 1020
 agcagagggg ttgaccagac atccatgcac aaccatggac atcaccacta gagccacaga 1080
 catggacata ctcaagagtg gggaggttat ataaaaaaat gagtgtggag aataaatgca 1140
 gagccaacaa ggtgaaaaaa aaa 1163

<210> 15
 <211> 939
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 15
 atgtctccag cctcaccac tttcttctgt attgggctgt gtgtactgca agtgatccaa 60
 acacagagtg gcccactccc caagccttcc ctccaggctc agcccagttc cctggtagcc 120
 ctgggtcagt cagttattct gaggtgccag ggacctccag atgtggattt atatcgctg 180
 gagaaactga aaccggagaa gtatgaagat caagactttc tcttcattcc aaccatggaa 240
 agaagtaatg ctggacggta tcgatgctct tatcagaatg ggagtcactg gtctctccca 300
 agtgaccagc ttgagcta at tgctacaggt gtgtatgcta aaccctcact ctccagctcat 360
 cccagctcag cagtcctcca aggcagggat gtgactctga agtgccagag ccatacagat 420
 tttgatgaat tcgttctata caaagaaggg gatactgggc cttataagag acctgagaaa 480
 tggtagccgg ccaatttccc catcatcaca gtgactgctg ctccagctgg gacgtaccgg 540
 tgttacagct tctccagctc atctccatac ctgtggtcag ccccgagtga cctctagt 600
 cttgtgggta ctggactctc tgccactccc agccaggtag ccacggaaga atcatttcct 660
 gtgacagaat cctccaggag accttccatc ttaccacaa acaaaatatc tacaactgaa 720
 aagcctatga atatcactgc ctctccagag gggctgagcc ctccaattgg ttttgctcat 780
 cagcactatg ccaaggggaa tctgggtccg atatgccttg gtgccacgat tataataatt 840
 ttgttggggc ttctagcaga ggattggcac agtcggaaga aatgcctgca acacaggatg 900
 agagctttgc aaaggccact accaccctc ccactggcc 939

<210> 16
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 16

```

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

```

<210> 17
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 17
Met Ser Pro Ala Ser Pro Thr Phe Phe Cys Ile Gly Leu Cys Val Leu
 1      5      10      15
Gln Val Ile Gln Thr
 20

```

<210> 18
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

```

<400> 18
Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala Gln Pro Ser Ser
 1      5      10      15

```

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

<210> 19
 <211> 267
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

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

Val	Leu	Tyr	Lys	Glu	Gly	Asp	Thr	Gly	Pro	Tyr	Lys	Arg	Pro	Glu	Lys
145					150					155					160
Trp	Tyr	Arg	Ala	Asn	Phe	Pro	Ile	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Ala	His	Ser
				165					170					175	
Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Tyr	Leu	Trp
			180					185					190		
Ser	Ala	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Leu	Ser	Ala
		195					200					205			
Thr	Pro	Ser	Gln	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Phe	Pro	Val	Thr	Glu	Ser
	210					215					220				
Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Thr	Asn	Lys	Ile	Ser	Thr	Thr	Glu
225					230					235					240
Lys	Pro	Met	Asn	Ile	Thr	Ala	Ser	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Pro	Ile
			245						250					255	
Gly	Phe	Ala	His	Gln	His	Tyr	Ala	Lys	Gly	Asn					
			260					265							

<210> 20
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 20
 Leu Val Arg Ile Cys Leu Gly Ala Thr Ile Ile Ile Ile Leu Leu Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Ala

<210> 21
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 21
 Glu Asp Trp His Ser Arg Lys Lys Cys Leu Gln His Arg Met Arg Ala
 1 5 10 15
 Leu Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Ala
 20 25

<210> 22
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22
 Cys Gln Gly Pro Pro Asp Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Lys
 1 5 10 15
 Pro Glu Lys Tyr Glu Asp Gln Asp Phe Leu Phe Ile Pro Thr Met Glu
 20 25 30
 Arg Ser Asn Ala Gly Arg Tyr Arg Cys
 35 40

<210> 23
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 23
 Cys Gln Ser Pro Tyr Ser Phe Asp Glu Phe Val Leu Tyr Lys Glu Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Gly Pro Tyr Lys Arg Pro Glu Lys Trp Tyr Arg Ala Asn Phe
 20 25 30

Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly Thr Tyr Arg Cys
35 40 45

<210> 24
<211> 1896
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 24
atgacgcccg ccctcacagc cctgctctgc cttgggctga gtctgggccc caggaccgcg 60
gtgcaggcag ggcccttccc caaaccacc ctctgggctg agccaggctc tgtgatcagc 120
tgggggagcc ccgtgaccat ctggtgtcag gggagcctgg aggccagga gtaccgactg 180
gataaagagg gaagcccaga gcccttggac agaaataacc cactggaacc caagaacaag 240
gccagattct ccattccatc catgacagag caccatgcgg ggagataccg ctgccactat 300
tacagctctg caggctggtc agagcccagc gacccctgg agctgggtgat gacaggattc 360
tacaacaaac ccaccctctc agccctgccc agccctgtgg tggcctcagg ggggaatatg 420
accctccgat gtggctcaca gaagggatat caccattttg ttctgatgaa ggaaggagaa 480
caccagctcc cccggaccct ggactcacag cagctccaca gtggggggtt ccaggccctg 540
ttccctgtgg gcccgtgaa ccccagccac aggtggaggt tcacatgcta ttactattat 600
atgaacaccc ccagggtgtg gtcccacccc agtgaccccc tggagattct gccctcaggc 660
gtgtctagga agccctccct cctgaccctg cagggccctg tcttggcccc tgggcagagc 720
ctgaccctcc agtgtggctc tcatgacagat ttgttctgta taaggagggg 780
gaacgtgact tcttcacgag ccctggccag cagccccagg ctgggctctc ccaggccaac 840
ttcaccctgg gccctgtgag cccctccac gggggccagt acagggtgcta tgggtgcacac 900
aacctctcct ccgagtggtc ggcccccagc gacccctga acatcctgat ggcaggacag 960
atctatgaca ccgtctccct gtcagcacag ccgggccccca cagtggcctc aggagagaac 1020
gtgaccctgc tgtgtcagtc atggtggcag tttgacactt tcttcttgac caaagaaggg 1080
gcagcccatc cccactgag tctgagatca atgtacggag ctcataagta ccaggctgaa 1140
ttcccatga gtctgtgac ctccagccac gcggggacct acagggtgcta cggctcatal 1200
agctccaacc ccacctgct gtctttccc agtgagcccc tggaaactcat ggtctcagga 1260
cactctggag gctccagcct cccaccaca gggccgccc ccacacctgg tctgggaaga 1320
tacctggagg ttttgattgg ggtctcgggt gccttcgtcc tgetgctctt cctcctcctc 1380
ttcctcctcc tccgacgtca gcgtcacagc aaacacagga catctgacca gagaaagact 1440
gatttccagc gtctgcagg ggctgcggag acagagccca aggacaggg cctgctgagg 1500
aggtccagcc cagctgctga cgtccaggaa gaaaacctct atgctgccgt gaaggacaca 1560
cagtctgagg acagggtgga gctggacagt cagagccac acgatgaaga ccccaggca 1620
gtgacgtatg ccccggtgaa aactccagt cctaggagag aaatggcctc tctccctcc 1680
tactgtctg gggaattcct ggacacaaag gacagacagg tggagagga caggcagatg 1740
gacactgagg ctgctgcatc tgaagcctcc caggatgtga cctacgcca gctgcacagc 1800
ttgaccctta gacggaaggc aactgagcct cctccatccc aggaagggga acctccagct 1860
gagcccagca tctacgccac tctggccatc cactag 1896

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador directo

<400> 25
cagcctcacc cactttctc 20

<210> 26
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador inverso

<400> 26
ccacaagcac tagagggtca 20

<210> 27
<211> 21
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> cebador sentido	
<400> 27	
ttctgtcttg ggctgtgtct g	21
<210> 28	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> cebador antisentido	
<400> 28	
cccgccagga ttattagat c	21
<210> 29	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> cebador sentido	
<400> 29	
cctgaagctg acagcattcg g	21
<210> 30	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> cebador antisentido	
<400> 30	
ctcctagagc tacctgtgga g	21
<210> 31	
<211> 23	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> cebador directo	
<400> 31	
ctgtagctgt tttcagacac acc	23
<210> 32	
<211> 21	
<212> ADN	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> cebador inverso	
<400> 32	
ccatcacctc ttctggta c	21
<210> 33	
<211> 1017	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 33	

ES 2 368 826 T3

```

atgtctccat ccccgaccgc cctcttctgt cttgggctgt gtctggggcg tgtgccagcg      60
cagagtggac cgctcccca gcccctccctc caggttctgc ccagctccct ggtgcccctg      120
gagaagccag tgaccctccg gtgccaggga cctccgggcg tggacctgta ccgcctggag      180
aagctgagtt ccagcaggta ccaggatcag gcagtcctct tcatcccggc catgaagaga      240
agtctggctg gacgctaccg ctgctcctac cagaacggaa gcctctggtc cctgcccagc      300
gaccagctgg agctcgttgc cacgggagtt tttgccaaac cctcgctctc agcccagccc      360
ggcccggcgg tgtcgtcagg aggggacgta accctacagt gtcagactcg gtatggcttt      420
gaccaatttg ctctgtacaa ggaaggggac cctgcgccct acaagaatcc cgagagatgg      480
taccgggcta gtttccccat catcacgggtg accgccgccc acagcggaac ctaccgatgc      540
tacagcttct ccagcaggga cccatacctg tggtcggccc ccagcgaccc cctggagctt      600
gtggtcacag gaacctctgt gacccccagc cggttaccac cagaaccacc ttcctcggtg      660
gcagaattct cagaagccac cgctgaactg accgtctcat tcacaaacaa agtcttcaca      720
actgagactt ctaggagtat caccaccagt ccaaaggagt cagactctcc agctggctct      780
gcccgccagt actacaccaa gggcaacctg gtccggatat gcctcggggc tgtgatccta      840
ataatcctgg cgggggttct ggcagaggac tggcacagcc ggaggaagcg cctgcccagc      900
aggggcaggg ctgtgcagag gccgcttccg cccctgccgc ccctcccgca gaccggaaa      960
tcacacgggg gtcaggatgg aggccgacag gatgttcaca gccgcggggt atgttca      1017

```

<210> 34

<211> 339

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

```

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

```

Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser
 210 215 220
 Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr
 225 230 235 240
 Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser
 245 250 255
 Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg
 260 265 270
 Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala
 275 280 285
 Glu Asp Trp His Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala
 290 295 300
 Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys
 305 310 315 320
 Ser His Gly Gly Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly
 325 330 335
 Leu Cys Ser

<210> 35
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 atgtctccat ccccgaccgc cctcttctgt cttgggctgt gtctggggcg tgtgccagcg 60
 cagagtggac cgtcccccac gccctccctc caggctctgc ccagctccct ggtgccctg 120
 gagaagccag tgaccctccg gtgccaggga cctccgggcg tggacctgta ccgcctggag 180
 aagctgagtt ccagcaggta ccaggatcag gtagtcctct tcatcccggc catgaagaga 240
 agtctggctg gacgctaccg ctgctcctac cagaacggaa gcctctggtc cctgcccagc 300
 gaccagctgg agctcggttc cacgggagtt tttgccaaac cctcgctctc agcccagccc 360
 ggcccggcgg tgtcgtcagg aggggacgta accctacagt gtcagactcg gtatggcttt 420
 gaccaatttg ctctgtacaa ggaaggggac cctgcgccct acaagaatcc cgagagatgg 480
 taccgggcta gtttcccat catcacggtg accgccgcc acagcggaac ctaccgatgc 540
 tacagcttct ccagcaggga cccatacctg tggtcggccc ccagcgaccc cctggagctt 600
 gtggtcacag gaacctctgt gacccccagc cggttaccaa cagaaccacc ttcctcggtg 660
 gcagaattct cagaagccac cgctgaactg accgtctcat tcacaaacaa agtcttcaca 720
 actgagactt ctaggagtat caccaccagt ccaaaggagt cagactctcc agctggtcct 780
 gcccgccagt actacaccaa gggcaacctg gtccggatat gcctcggggc tgtgaccta 840
 ataatcctgg cggggtttct ggagaggac tggcacagcc ggaggaagcg cctgcggcac 900
 aggggcaggg ctgtgcagag gccgcttccg cccctgccgc ccctcccga gaccggaaa 960
 tcacacgggg gtcaggatgg aggccgacag gatgttcaca gccgcgggtt atgttca 1017

<210> 36
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15
 Arg Val Pro Ala Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala
 20 25 30
 Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys
 35 40 45
 Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Val Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg
 65 70 75 80
 Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp
 85 90 95

Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala
100 105 110
Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly
115 120 125
Asp Val Thr Leu Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala
130 135 140
Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp
145 150 155 160
Tyr Arg Ala Ser Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly
165 170 175
Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser
180 185 190
Ala Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr
195 200 205
Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser
210 215 220
Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr
225 230 235 240
Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser
245 250 255
Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg
260 265 270
Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala
275 280 285
Glu Asp Trp His Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala
290 295 300
Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys
305 310 315 320
Ser His Gly Gly Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly
325 330 335
Leu Cys Ser

<210> 37
<211> 1017
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 37
atgtctccat ccccgaccgc cctcttctgt cttgggctgt gtctggggcg tgtgccagcg 60
cagagtggac cgctcccaa gccctccctc caggctctgc ccagctccct ggtgccctg 120
gagaagccag tgaccctccg gtgccaggga cctccgggcg tggacctgta ccgcctggag 180
aagctgagtt ccagcaggta ccaggatcag gcagtcctct tcatcccggc catgaagaga 240
agtctggctg gacgctaccg ctgctcctac cagaacggaa gcctctggtc cctgccagc 300
gaccagctgg agctcgttgc cacgggagtt tttgcaaacc cctcgctctc agcccagccc 360
ggcccgggcg tgtcgtcagg aggggacgta accctacagt gtcagactcg gtatggcttt 420
gaccaatttg ctctgtacaa ggaaggggac cctgcgcctt acaagaatcc cgagagatgg 480
taccgggcta gtttcccat catcacggcg accgcgccc acagcggaac ctaccgatgc 540
tacagcttct ccagcaggga cccatacctg tggtcggccc ccagcgaccc cctggagctt 600
gtggtcacag gaacctctgt gacccccagc cggttaccaa cagaaccacc ttctcggta 660
gcagaattct cagaagccac cgctgaactg accgtctcat tcacaaacaa agtcttcaca 720
actgagactt ctaggagtat caccaccagt ccaaaggagt cagactctcc agctggtcct 780
gcccggcagt actacaccaa gggcaacctg gtccggatat gcctcggggc tgtgatccta 840
ataatcctgg cggggtttct ggcagaggac tggcacagcc ggaggaagcg cctgcggcac 900
aggggcaggg ctgtgcagag gccgcttccg ccctgccgc ccctcccga gaccggaaa 960
tcacacgggg gtcaggatgg aggccgacag gatgttcaca gccgcgggtt atgttca 1017

<210> 38
<211> 339
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly
 1 5 10 15
 Arg Val Pro Ala Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala
 20 25 30
 Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys
 35 40 45
 Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser
 50 55 60
 Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Ala Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg
 65 70 75 80
 Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp
 85 90 95
 Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala
 100 105 110
 Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly
 115 120 125
 Asp Val Thr Leu Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala
 130 135 140
 Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp
 145 150 155 160
 Tyr Arg Ala Ser Phe Pro Ile Ile Thr Ala Thr Ala Ala His Ser Gly
 165 170 175
 Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser
 180 185 190
 Ala Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr
 195 200 205
 Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser
 210 215 220
 Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr
 225 230 235 240
 Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser
 245 250 255
 Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg
 260 265 270
 Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala
 275 280 285
 Glu Asp Trp His Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala
 290 295 300
 Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys
 305 310 315 320
 Ser His Gly Gly Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly
 325 330 335
 Leu Cys Ser

<210> 39
 <211> 1017
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 39
 atgtctccat ccccgaccgc cctcttctgt cttgggctgt gtctggggcg tgtgccagcg 60
 cagagtggac cgctcccaa gccctccctc caggctctgc ccagctccct ggtgccctg 120
 gagaagccag tgacctccg gtgccaggga cctccgggcg tggacctgta ccgcctggag 180
 aagctgagtt ccagcaggta ccaggatcag gcagtcctct tcatcccggc catgaagaga 240
 agtctggctg gacgtaccg ctgctcctac cagaacggaa gcctctggtc cctgcccagc 300
 gaccagctgg agctcgttgc cacgggagtt tttgcaaacc cctcgctctc agcccagccc 360
 ggcccggcgg tgtcgtcagg aggggacgta accctacagt gtcagactcg gtatggcttt 420
 gaccaatttg ctctgtacaa ggaaggggac cctgcgccct acaagaatcc cgagagatgg 480
 taccgggcta gtttcccat catcacggtg accgccgccc acagcggaac ctaccgatgc 540
 tacagcttct ccagcaggga cccatacctg tggtcggtcc ccagcgaccc cctggagctt 600

```

gtgggtcacag gaacctctgt. gacccccagc cggttaccaa cagaaccacc ttcctcggtta 660
gcagaattct cagaagccac cgctgaactg accgtctcat tcacaaacaa agtcttcaca 720
actgagactt ctaggagtat caccaccagt ccaaaggagt cagactctcc agctggctct 780
gcccgccagt actacaccaa gggcaacctg gtccggatat gcctcggggc tgtgataccta 840
ataatcctgg cgggggtttct ggcagaggac tggcacagcc ggaggaagcg cctgcggcac 900
aggggcaggg ctgtgcagag gccgcttccg cccctgccgc ccctcccgca gacccggaaa 960
tcacacgggg gtcaggatgg aggccgacag gatgttcaca gccgcgggtt atgttca 1017

```

<210> 40
 <211> 339
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 40
Met Ser Pro Ser Pro Thr Ala Leu Phe Cys Leu Gly Leu Cys Leu Gly
1      5      10      15
Arg Val Pro Ala Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln Ala
20     25     30
Leu Pro Ser Ser Leu Val Pro Leu Glu Lys Pro Val Thr Leu Arg Cys
35     40     45
Gln Gly Pro Pro Gly Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Ser Ser
50     55     60
Ser Arg Tyr Gln Asp Gln Ala Val Leu Phe Ile Pro Ala Met Lys Arg
65     70     75     80
Ser Leu Ala Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser Leu Trp
85     90     95
Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu Glu Leu Val Ala Thr Gly Val Phe Ala
100    105    110
Lys Pro Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Ala Val Ser Ser Gly Gly
115    120    125
Asp Val Thr Leu Gln Cys Gln Thr Arg Tyr Gly Phe Asp Gln Phe Ala
130    135    140
Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Pro Ala Pro Tyr Lys Asn Pro Glu Arg Trp
145    150    155    160
Tyr Arg Ala Ser Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser Gly
165    170    175
Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser Arg Asp Pro Tyr Leu Trp Ser
180    185    190
Val Pro Ser Asp Pro Leu Glu Leu Val Val Thr Gly Thr Ser Val Thr
195    200    205
Pro Ser Arg Leu Pro Thr Glu Pro Pro Ser Ser Val Ala Glu Phe Ser
210    215    220
Glu Ala Thr Ala Glu Leu Thr Val Ser Phe Thr Asn Lys Val Phe Thr
225    230    235    240
Thr Glu Thr Ser Arg Ser Ile Thr Thr Ser Pro Lys Glu Ser Asp Ser
245    250    255
Pro Ala Gly Pro Ala Arg Gln Tyr Tyr Thr Lys Gly Asn Leu Val Arg
260    265    270
Ile Cys Leu Gly Ala Val Ile Leu Ile Ile Leu Ala Gly Phe Leu Ala
275    280    285
Glu Asp Trp His Ser Arg Arg Lys Arg Leu Arg His Arg Gly Arg Ala
290    295    300
Val Gln Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Pro Leu Pro Gln Thr Arg Lys
305    310    315    320
Ser His Gly Gly Gln Asp Gly Gly Arg Gln Asp Val His Ser Arg Gly
325    330    335
Leu Cys Ser

```

<210> 41
 <211> 939
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

ES 2 368 826 T3

<400> 41

```

atgtctccag cctcaccac tttcttctgt attgggctgt gtgtactgca agtgatccaa      60
acacagagtg gcccaactccc caagccttcc ctccaggctc agcccagttc cctgggtaccc      120
ctgggtcagt cagttattct gaggtgccag ggacctccag atgtggattt atatcgctg      180
gagaaactga aaccggagaa gtatgaagat caagactttc tcttcattcc aaccatggaa      240
agaagtaatg ttggacggta tcgatgctct taccagaatg ggagtcactg gtctctcca      300
agtgaccagc ttgagctaata tgctacaggt gtgtatgcta aaccctcact ctcagctcat      360
cccagctcag cagtccctca aggcagggat gtgactctga agtgccagag cccatacagt      420
tttgatgaat tcgttctata caaagaaggg gatactgggc cttataagag acctgagaaa      480
tggtaccggg ccaattttccc catcatcaca gtgactgctg ctcacagtgg gacgtaccgg      540
tggtacagct tctccagctc atctccatac ctgtggtcag ccccgagtga ccctctagt      600
cttgggtgta ctggactctc tgccactccc agccagggtac ccacggaaga atcatttcct      660
gtgacagaat cctccaggag accttccatc ttaccacaaa acaaaatata tacaactgaa      720
aagcctatga atatcactgc ctctccagag gggctgagcc ctccaattgg ttttgctcat      780
cagcactatg ccaaggggaa tctgggtccg atatgccttg gtgccacgat tataataatt      840
ttgttggggc ttctagcaga ggattggcac agtcggaaga aatgctgca acacaggatg      900
agagctttgc aaaggccact accacccctc ccactggcc      939

```

<210> 42

<211> 313

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 42

```

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

Trp His Ser Arg Lys Lys Cys Leu Gln His Arg Met Arg Ala Leu Gln
290      295      300
Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Ala
305      310

```

<210> 43
 <211> 939
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 43
 atgtctccag cctcaccacac tttcttctgt attgggctgt gtgtactgca agtgatccaa 60
 acacagagtg gcccaactccc caagccttcc ctccaggctc agcccagttc cctggtagacc 120
 ctgggtcagt cagttattct gaggtgccag ggacctccag atgtggattt atatcgctg 180
 gagaaactga aaccggagaa gtatgaagat caagactttc tcttcattcc aaccatggaa 240
 agaagtaatg ctggacggta tccgatgctct tatcagaatg ggagtcactg gtctctccca 300
 agtgaccagc ttgagctaata tgctacaggt gtgtatgcta aaccctcact ctcagctcat 360
 cccagctcag cagtcctca aggcaggat gtgactctga agtgccagag cccatacagt 420
 tttgatgaat tcgttctata caaagaagg gatactggc cttataagag acctgagaaa 480
 tggtagcggg tcaatttccc catcatcaca gtgactgctg ctcacagtgg gacgtaccgg 540
 tgttacagct tctccagctc atctccatac ctgtggtcag ccccgagtga ccctctagt 600
 cttgtgggta ctggactctc tgccactccc agccaggtag ccacggaaga atcatttcct 660
 gtgacagaat cctccaggag accttccatc ttaccacaaa acaaaatata tacaactgaa 720
 aagcctatga atatcactgc ctctccagag gggctgagcc ctccaattgg ttttgctcat 780
 cagcactatg ccaaggggaa tctgggtccg atatgccttg gtgccacgat tataataatt 840
 ttgttggggc ttctagcaga ggattggcac agtcggaaga aatgcctgca acacaggatg 900
 agagctttgc aaaggccact accaccctc ccactggcc 939

<210> 44
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 44
 Met Ser Pro Ala Ser Pro Thr Phe Phe Cys Ile Gly Leu Cys Val Leu
 1 5 10 15
 Gln Val Ile Gln Thr Gln Ser Gly Pro Leu Pro Lys Pro Ser Leu Gln
 20 25 30
 Ala Gln Pro Ser Ser Leu Val Pro Leu Gly Gln Ser Val Ile Leu Arg
 35 40 45
 Cys Gln Gly Pro Pro Asp Val Asp Leu Tyr Arg Leu Glu Lys Leu Lys
 50 55 60
 Pro Glu Lys Tyr Glu Asp Gln Asp Phe Leu Phe Ile Pro Thr Met Glu
 65 70 75 80
 Arg Ser Asn Ala Gly Arg Tyr Arg Cys Ser Tyr Gln Asn Gly Ser His
 85 90 95
 Trp Ser Leu Pro Ser Asp Gln Leu Glu Leu Ile Ala Thr Gly Val Tyr
 100 105 110
 Ala Lys Pro Ser Leu Ser Ala His Pro Ser Ser Ala Val Pro Gln Gly
 115 120 125
 Arg Asp Val Thr Leu Lys Cys Gln Ser Pro Tyr Ser Phe Asp Glu Phe
 130 135 140
 Val Leu Tyr Lys Glu Gly Asp Thr Gly Pro Tyr Lys Arg Pro Glu Lys
 145 150 155 160
 Trp Tyr Arg Val Asn Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser
 165 170 175
 Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser Ser Ser Pro Tyr Leu Trp
 180 185 190
 Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Val Thr Gly Leu Ser Ala
 195 200 205
 Thr Pro Ser Gln Val Pro Thr Glu Glu Ser Phe Pro Val Thr Glu Ser
 210 215 220

ES 2 368 826 T3

Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Thr	Asn	Lys	Ile	Ser	Thr	Thr	Glu
225					230					235					240
Lys	Pro	Met	Asn	Ile	Thr	Ala	Ser	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Pro	Ile
				245					250						255
Gly	Phe	Ala	His	Gln	His	Tyr	Ala	Lys	Gly	Asn	Leu	Val	Arg	Ile	Cys
			260					265					270		
Leu	Gly	Ala	Thr	Ile	Ile	Ile	Ile	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Asp
		275					280					285			
Trp	His	Ser	Arg	Lys	Lys	Cys	Leu	Gln	His	Arg	Met	Arg	Ala	Leu	Gln
	290					295					300				
Arg	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala							
305					310										

<210> 45
 <211> 939
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 45

atgtctccag	cctcaccac	tttcttctgt	attgggctgt	gtgtactgca	agtgatccaa	60
acacagagtg	gcccactccc	caagccttcc	ctccaggctc	agcccagttc	cctgggtaccc	120
ctgggtcagt	cagttattct	gaggtgccag	ggacctccag	atgtggattt	atatcgcttg	180
gagaaactga	aaccggagaa	gtatgaagat	caagactttc	tcttcattcc	aaccatggaa	240
agaagtaatg	ctggacggta	tcgatgctct	tatcagaatg	ggagtcactg	gtctctccca	300
agtgaccagc	ttgagcta	tgctacaggt	gtgtatgcta	aaccctcact	ctcagctcat	360
cccagctcag	cagcccctca	aggcagggat	gtgactctga	agtgccagag	cccatacagt	420
tttgatgaat	tcgttctata	caaagaaggg	gatactgggc	cttataagag	acctgagaaa	480
tggtaccggg	ccaatttccc	catcatcaca	gtgactgctg	ctcacagtgg	gacgtaccgg	540
tgttacagct	tctccagctc	atctccatac	ctgtggtcag	ccccgagtga	ccctctagt	600
cttgtgggta	ctggactctc	tgccactccc	agccagggtac	ccacggaaga	atcatttcct	660
gtgacagaat	cctccaggag	accttccatc	ttaccacaaa	acaaaatatc	tacaactgaa	720
aagcctatga	atatcactgc	ctctccagag	gggctgagcc	ctccaattgg	ttttgctcat	780
cagcactatg	ccaaggggaa	tctggtcagg	atatgccttg	gtgccacgat	tataataatt	840
ttgttggggc	ttctagcaga	ggattggcac	agtcggaaga	aatgcctgca	acacaggatg	900
agagctttgc	aaaggccact	accaccctc	ccactgggcc			939

<210> 46
 <211> 313
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 46

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

Trp Tyr Arg Ala Asn Phe Pro Ile Ile Thr Val Thr Ala Ala His Ser
165 170 175
Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Ser Phe Ser Ser Ser Pro Tyr Leu Trp
180 185 190
Ser Ala Pro Ser Asp Pro Leu Val Leu Val Val Thr Gly Leu Ser Ala
195 200 205
Thr Pro Ser Gln Val Pro Thr Glu Glu Ser Phe Pro Val Thr Glu Ser
210 215 220
Ser Arg Arg Pro Ser Ile Leu Pro Thr Asn Lys Ile Ser Thr Thr Glu
225 230 235 240
Lys Pro Met Asn Ile Thr Ala Ser Pro Glu Gly Leu Ser Pro Pro Ile
245 250 255
Gly Phe Ala His Gln His Tyr Ala Lys Gly Asn Leu Val Arg Ile Cys
260 265 270
Leu Gly Ala Thr Ile Ile Ile Ile Leu Leu Gly Leu Leu Ala Glu Asp
275 280 285
Trp His Ser Arg Lys Lys Cys Leu Gln His Arg Met Arg Ala Leu Gln
290 295 300
Arg Pro Leu Pro Pro Leu Pro Leu Ala
305 310

<210> 47

<211> 939

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 47

atgtctccag cctcaccac tttcttctgt attgggctgt gtgtactgca agtgatccaa 60
acacagagt gcccactccc caagccttcc ctccaggctc agcccagttc cctggtagcc 120
ctgggtcagt cagttattct gaggtgccag ggacctccag atgtggattt atatcgctg 180
gagaaactga aaccggagaa gtatgaagat caagactttc tcttcattcc aaccatggaa 240
agaagtaatg ctggacggta tcgatgctct tatcagaatg ggagtcactg gtctctccca 300
agtgaccagc ttgagctaata tgctacaggt gtgtatgcta aaccctcact ctgagctcat 360
cccagctcag cagtcctcca aggcagggat gtgactctga agtgccagag cccatacagt 420
tttgatgaat tcgttctata caaagaagg gatactgggc cttataagag acctgagaaa 480
tggtagcggg ccaatttccc catcatcaca gtgactgctg ctacacagtgg gacgtaccgg 540
tgttacagct tctccagctc atctccatac ctgtggctcag ccccgagtga cctctagtg 600
cttggtggtta ctggactctc tgccactccc agccaggtag ccacggaaga atcatttctc 660
gtgacagaat cctccaggag accttccatc ttaccacaaa acaaaatata tacaactgaa 720
aagcctatga atatcactgc ctctccagag gggctgagcc ctccaattgg ttttgctcat 780
cagcactatg tcaaggggaa tctggtccgg atatgccttg gtgccacgat tataataatt 840
ttgttggggc ttctagcaga ggattggcac agtcggaaga aatgcctgca acacaggatg 900
agagctttgc aaaggccact accaccctc ccactggcc 939

<210> 48

<211> 313

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 48

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

Trp	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Gln	Leu	Glu	Leu	Ile	Ala	Thr	Gly	Val	Tyr
			100					105					110		
Ala	Lys	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	His	Pro	Ser	Ser	Ala	Val	Pro	Gln	Gly
		115					120					125			
Arg	Asp	Val	Thr	Leu	Lys	Cys	Gln	Ser	Pro	Tyr	Ser	Phe	Asp	Glu	Phe
	130					135					140				
Val	Leu	Tyr	Lys	Glu	Gly	Asp	Thr	Gly	Pro	Tyr	Lys	Arg	Pro	Glu	Lys
145				150						155					160
Trp	Tyr	Arg	Ala	Asn	Phe	Pro	Ile	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Ala	His	Ser
				165					170					175	
Gly	Thr	Tyr	Arg	Cys	Tyr	Ser	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Tyr	Leu	Trp
			180					185					190		
Ser	Ala	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Leu	Val	Val	Thr	Gly	Leu	Ser	Ala
		195				200						205			
Thr	Pro	Ser	Gln	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Phe	Pro	Val	Thr	Glu	Ser
	210					215					220				
Ser	Arg	Arg	Pro	Ser	Ile	Leu	Pro	Thr	Asn	Lys	Ile	Ser	Thr	Thr	Glu
225				230						235					240
Lys	Pro	Met	Asn	Ile	Thr	Ala	Ser	Pro	Glu	Gly	Leu	Ser	Pro	Pro	Ile
			245						250					255	
Gly	Phe	Ala	His	Gln	His	Tyr	Val	Lys	Gly	Asn	Leu	Val	Arg	Ile	Cys
			260					265					270		
Leu	Gly	Ala	Thr	Ile	Ile	Ile	Ile	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Asp
		275					280					285			
Trp	His	Ser	Arg	Lys	Lys	Cys	Leu	Gln	His	Arg	Met	Arg	Ala	Leu	Gln
	290					295					300				
Arg	Pro	Leu	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Ala							
305					310										

<210> 49
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 Ser Tyr Trp Ile Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 Arg Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15
 Gly

<210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51
 His Gly Ser Asp Arg Gly Trp Gly Phe Asp Pro
 1 5 10

<210> 52
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

Asn Gly Val Asn Ser Asp Val Gly
1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ser Tyr Thr Ser Asn Asn Thr Pro Val
1 5

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 56

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ser Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Ile Ser Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Asp Ile Ser Ser Ala Met Asp Val
1 5

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Thr Arg Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His
1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
1 5

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp His His Val
1 5 10

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61
Ser Tyr Trp Met Ser 1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15
Gly

<210> 63
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63
Asp Lys Trp Glu Ala Tyr Ile Thr Pro Gly Ala Phe Asp Val
1 5 10

<210> 64
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
Thr Arg Ser Ser Gly Ser Ile Ala Ser Asn Tyr Val Gln
1 5 10

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

<400> 65
Glu Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66
Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Val Val
1 5

<210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 Asn Tyr Glu Met Asn
 1 5

<210> 68
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile His Asn Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 Asp Gly Tyr Ser His Gly Leu Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 70
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val His
 1 5 10

<210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 Ser Tyr Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 72
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 Ser Trp Asp Asp Arg Leu Asn Gly Tyr Leu
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Molécula de ácido nucleico aislada que comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de glucoproteína VI (GPVI), siendo dicha actividad la fijación al colágeno, en donde la primera molécula de ácido nucleico comprende una molécula de ácido nucleico que codifica un dominio extracelular de GPVI, en donde la primera molécula de ácido nucleico se selecciona entre (1) una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID n.º 9 y (2) una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica al menos al 85% a la SEQ ID n.º 9 y que además comprende una segunda molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo que está operativamente unido a la primera molécula de ácido nucleico.
2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en donde la primera molécula de ácido nucleico comprende además una molécula de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 4 o una molécula de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica al menos al 85% a la SEQ ID n.º 4.
3. Célula hospedadora creada por ingeniería genética para contener una molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la célula hospedadora es una célula troncal embrionaria humana.
4. Célula hospedadora según la reivindicación 3, que es una célula hospedadora de mamífero.
5. Célula hospedadora según la reivindicación 3, que es una célula hospedadora de mamífero no humano.
6. Proteína de fusión que comprende un primer polipéptido que tiene una actividad de glucoproteína VI (GPVI), siendo dicha actividad la fijación al colágeno, en donde el primer polipéptido comprende un dominio extracelular de GPVI y que comprende además un segundo polipéptido con una secuencia de aminoácidos heteróloga, en donde el primer polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 9 o una secuencia de aminoácidos que es idéntica al menos al 85% a la SEQ ID n.º 9.
7. Proteína de fusión según la reivindicación 6, en la que dicho dominio extracelular incluye los restos aminoacídicos 21 a 269 de la SEQ ID n.º 3.
8. Proteína de fusión según la reivindicación 6, que comprende una secuencia señal.
9. Proteína de fusión según la reivindicación 8, en la que la secuencia señal comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 4 o un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos idéntica al menos al 85% a la SEQ ID n.º 4.
10. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en la que el polipéptido heterólogo comprende un dominio de inmunoglobulina.
11. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en la que el polipéptido heterólogo se une al polipéptido que tiene una actividad de GPVI en su extremo amino o en su extremo carboxilo.
12. Proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que el polipéptido heterólogo comprende la glutatión-S-transferasa.
13. Procedimiento para producir un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, que comprende cultivar la célula hospedadora según la reivindicación 3 en condiciones en las que se expresa la molécula de ácido nucleico.
14. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 para uso como medicamento.
15. Polipéptido codificado por el ácido nucleico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso como medicamento.
16. Polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 o polipéptido codificado por el ácido nucleico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en el tratamiento o en la prevención de un trastorno trombótico.
17. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12 o polipéptido codificado por el ácido nucleico según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para uso en el tratamiento de un trastorno hemorrágico.

GGAGTCGACCCACGCGTCCGCAGGGCTGAGGAACC	H S P S P T A L F C L	11
ATG TCT CCA TCC CCG ACC GCC CTC TTC TGT CTT		68
G L C L G R V P A Q S G P L P K P S L Q		31
GGG CTG TGT CTG GGG CGT GTG CCA GCG CAG AGT GGA CCG CTC CCC AAG CCC TCC CTC CAG		128
A L P S S L V P L E K P V T L R C Q G P		51
GCT CTG CCC AGC TCC CTG GTG CCC CTG GAG AAG CCA GTG ACC CTC CGG TGC CAG GGA CCT		188
P G V D L Y R L E K L S S S R Y Q D Q A		71
CCG GGC GTG GAC CTG TAC CGC CTG GAG AAG CTG AGT TCC AGC AGG TAC CAG GAT CAG GCA		248
V L F I P A M K R S L A G R Y R C S Y Q		91
GTC CTC TTC ATC CCG GCC ATG AAG AGA AGT CTG GCT GGA CGC TAC CGG TGC TCC TAC CAG		308
N G S L W S L P S D Q L E L V A T G V F		111
AAC GGA AGC CTC TGG TCC CTG CCC AGC GAC CAG CTG GAG CTC GTT GCC ACG GGA GTT TTT		368
A K P S L S A Q P G P A V S S G G D V T		131
CCC AAA CCC TCG CTC TCA GCC CAG CCC GGC CCG GCG GTG TCG TCA GGA GGG GAC GTA ACC		428
L O C Q T R Y G F D Q F A L Y K E G D P		151
CTA CAG TGT CAG ACT CGG TAT GGC TTT GAC CAA TTT GCT CTG TAC AAG GAA GGG GAC CCT		488
A P Y K N P E R W Y R A S F P I I T V T		171
CGG CCC TAC AAG AAT CCC GAG AGA TGG TAC CGG GCT AGT TTC CCC ATC ATC ACG GTG ACC		548
A A H S G T Y R C Y S F S S R D P Y L W		191
GCC GCC CAC AGC GGA ACC TAC CGA TGC TAC AGC TTC TCC AGC AGG GAC CCA TAG CTG TGG		608
S A P S D P L E L V V T G T S V T P S R		211
TCG GCC CCC AGC GAC CCC CTG GAG CTT GTG GTC ACA GGA ACC TCT GTG ACC CCC AGC CGG		668
L P T E P P S S V A E F S E A T A E L T		231
TTA CCA ACA GAA CCA CCT TCC TCG GTA GCA GAA TTC TCA GAA GCC ACC GCT GAA CTG ACC		728
V S F T N K V F T T E T S R S I T T S P		251
GTC TCA TTC ACA AAC AAA GTC TTC ACA ACT GAG ACT TCT AGG AGT ATC ACC ACC AGT CCA		788
K E S D S P A G P A R Q Y Y T K G N L V		271
AAG GAG TCA GAC TCT CCA GCT GGT CCT GCC CGC CAG TAC TAC ACC AAG GGC AAC CTG GTC		848
R I C L G A V I L I I L A G F L A E D W		291
CGG ATA TGC CTC GGG GCT GTG ATC CTA ATA ATC CTG GCG GGG TTT CTG GCA GAG GAC TGG		908
H S R R K R L R H R G R A V Q R P L P P		311
CAC AGC CGG AGG AAG CGC CTG CGG CAC AGG GGC AGG GCT GTG CAG AGG CCG CTT CCG CCC		968
L P P L P Q T R K S H G G Q D G G R Q D		331
CTG CCG CCC CTC CCG CAG ACC CGG AAA TCA CAC GGG GGT CAG GAT GGA GGC CGA CAG GAT		1028
V H S R G L C S *		340
GTT CAC AGC CGC GGG TTA TGT TCA TGA		1055

FIGURA 1a

CCGCTGAACCCACGGCACGGTCGTATCCAAAGGGAGGGATCATGGCATGGGAGGCGACTCAAAGACTGGCGTGTGTGGAG	1134
CGTGGAAAGCAGGAGGGCAGAGGCTACAGCTGTGGAAACGAGGCCATGCTGCCTCCTCCTGGTGTTCATCAGGGAGCCG	1213
TTCCGGCCAGTGTCTGTCTGTCTGTCTGCCTCTCTGTCTGAGGGCACCCCTCCATTGGGATGGAAGGAATCTGTGGAGAC	1292
CCCATCCTCTCTCCCTGCACACTGTGGATGACATGGTACCCCTGGCTGGACCACATACTGGCCCTCTTTCTTCAAACCTCTCT	1371
AATATGGGCTCCAGACGGATCTCTAAAGGTCCCAAGCTCTCAGGGTTGACTCTGTGTCCATCCTCTGTGTGCAAAATCCTCCT	1450
GTGCTTCCCTTTGGCCCTCTGTGTCTCTTGTCTGGTTTTCCCCAGAAACTCTCACCCCTCACTCCATCTCCCACTGGCGGTC	1529
TAACAAAATCTCCTTTGGTCTCTCAGAAACGGGTCTTGCAGGCAGTTTGGGTATGTCAATTCATTTTCCTTAGTGTA AAACT	1608
AGCACGTTGCCCGCTTCCCTTCACATTAGAAAAACAAGATCAGCCTGTGTCAACATGGTGAAACCTCATCTCTACCAACAA	1687
AACAAAAAAAAAACAAAAATTAGCCAGGTGTGGTGGTGCATCCCTATACTCCAGCAACTCGGGGGGCTGAGGTGGGAGA	1766
ATGGCTTGAGCCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCTGAGATCACACCACTGCACTCTAGCTCGGGTGACGAAGCCTGA	1845
CCTGTCTCAAAAAATACAGGGATGAATATGTCAATTACCCGTATTGTATCATAGCACGTTGTATACATGTACTGCAAT	1924
ATTGCTGTCCACCCCATAAATATGTACAATTATGTATACATTTTTAAAAATCATAAAAATAAGATAATGA AAAAAAAAAA	2003
AAAAAAAAAAAAAAAAAGGGCGGGCCGCTAGACTAGTCTAGAGAA CA	2047

FIGURA 1b

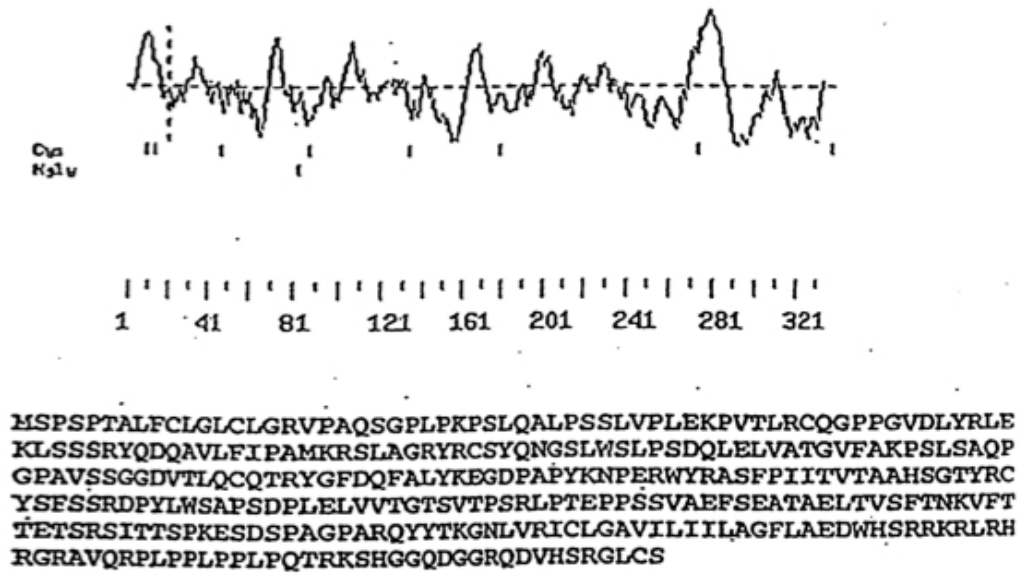


FIGURA 2

```

ALIGN calcula el alineamiento global de dos secuencias
versión 2.0 Cítela como Myers y Miller, CABIOS (1989)
> ORF de U91928                      1893 aa frente a
> ORF de hT268                      1017 aa
matriz de ponderación: pam120.mat, penalización por hueco: -12/-4
Identidad: 37,7%                      Puntuación del alineamiento global: -8

      10      20      30      40      50      60      70
entradas ATGACGCCCGCCCTCACAGCCCTGCTCTGCCCTGGGCTGAGTCTGGGCCCCAGGACCCGCGTGACGGCAG
      ::::: :: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      ATGTCTCCATCCCCGACCGCCCTCTTCTGTCTTGGGCTGTGTCTGGGGCG-TGTGCCAGC--GCAGAGTG
      10      20      30      40      50      60

      80      90      100     110     120     130
entradas GGCCCTTCCCCAAACCCACCCTCTGGGCTGAGCCAGGCTCTGTGAT-CAGCTGGGGGAGCCCGTGACCA
      ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      GACCGCTCCCCAAGCCCTCCCTCCAGGCTCTGCCAGCTCCCTGGTGGCCCTGGAGAAGCCA-GTGACCC
      70      80      90      100     110     120     130

      140     150     160     170     180     190     200
entradas TCTGGTGTACGGGGAGCCTGGAGGCCCAAGGAGTACCGACTGGATAAAGAGGGAAGCCAGAGCCCTTGA
      :: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      TCCGGTGCCAGGG--ACCT-----CCGGGCGTG--GACCTGTA-----CCGCCTGGAG-----AAG
      140     150     160     170     180

      210     220     230     240     250     260     270
entradas CAGAAATAACCCACTGGAACCCAAGAACAAGGCCAGATTCTCCATCCCATCCATGACAGAGCACCATGGC
      ::::: :: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      CTGAGTT--CCAGCAGGTACC-AGGATCA-GGCAGTCTCTTCATCCCGCCATGAAGAGAAGTCTGGCT
      190     200     210     220     230     240

      280     290     300     310     320     330     340
entradas GGGAGATACCGCTGCCACTATTACAGCTCTGCAG--GCTGGTCAGAGCCAGCCGACCCCTGGAGCTGGT
      :: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      GGACGCTACCGCTGCTCCTAC--CAGAACGGAAGCCTCTGGTCCCTGCCAGCCAGCCAGCTGGAGCTGGT
      250     260     270     280     290     300     310

      350     360     370     380     390     400     410
entradas GATGACAGGATTCTACAACAACCCACCCCTCTCAGCCCTGCCAGCCCTGTGGTGGGCTCAGGGGGGAAT
      . ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      TGCCAGGGAGTTTTTGCCAAACCCCTCGCTCTCAGCCAGCCCGGCCCGGGGGTGTGCTCAGGAGGGGAC
      320     330     340     350     360     370     380

      420     430     440     450     460     470     480
entradas ATGACCCCTCGATGTGGCTCACAGAAGGGATATCACCATTTTGTCTGATGAAGGAAGGAGAACCAGC
      .::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      GTAAACCTACAGTGTGAGACTGGGTATGGCTTACCAATTGCTCTGTACAAGGAAGG-----
      390     400     410     420     430     440

      490     500     510     520     530     540     550
entradas TCCCCGGGACCCCTGGACTCACAGCAGCTCACAGTGGGGGGTTCCAGGCGCTGTTCCCTGTGGGCCCCCGT
      ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: ::::: :::::

```

FIGURA 3a

```

-----GGACCTG-----C-----GCCCTA-----CAA
          450                      460

entradas 560      570      580      590      600      610      620
GAACCCAGCCACAGGTGGAGGTTACATGCTATTACTATTATATGAACACCCCCAGGTGTGGTCCAC
::: :::::      ::::: ::: ::::: :      ::      :::::      ::
GAATCCGA-----GAGATGGTAC-CGGGCTAGT---TT-----CCCCAT-----CAT
          470          480          490                      500

entradas 630      640      650      660      670      680      690
CCAGTGACCCCCCTGGAGATTCTGCCCTCAGGCGTGTCTAGGAAGCCCTCCCTCCTGACCCTGCAGGGCC
: ::::: ::      ::::: ::
CACGGTGACCGCC-----GCCACAG-----
          510          520

entradas 700      710      720      730      740      750      760
CTGTCCTGGCCCTGGGCAGAGCCTGACCCTCCAGTGTGGCTCTGATGTCGGCTACGACAGATTTGTCT
      ::::: ::      :::::      :::::      :::::      :::::
-----CGGAACCTA-----CCGATC-----CTACAGC-----TTCT
          530                      540          550

entradas 770      780      790      800      810      820      830
GTATAAGGACGGGGAACGTGACTTCTCCAGCGCCCTGGCCAGCAGCCCCAGGCTGGGCTCTCCAGGCC
      :::::
-----CCAGCAG-----

entradas 840      850      860      870      880      890      900
AACTTCACCCTGGGCCCTGTGAGCCCCCTCCACGGGGGCCAGTACAGGTGCTATGGTGACACAACCTCT
      :::::      :::::
-----GGACCCA-----TACCT--
          560

entradas 910      920      930      940      950      960      970
CCTCCGAGTGGTGGGCCCCAGCGACCCCTGAACATCCTGATGGCAGGACAGATCTATGACACCGTCTC
      ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
-----GTGCTCGGCCCCAGCGACCCCTGGA-----GCT-----TGIG-----
          570          580          590                      600

entradas 980      990      1000      1010      1020      1030      1040
CCTGTCAGCACAGCGCGGGCCCCACAGTGGCTCAGGAGAGAACGTGACCCCTGCTGTGTCAGTCATGGTGG
::: ::: ::::: ::::: ::::: :::::
--GTCA-----CAGGAACCTCTGTGACC-----CCCAGC-----CGGT-----
          610          620                      630

entradas 1050      1060      1070      1080      1090      1100      1110
CAGTTTGACACTTTCCTTCTGACCAAGAAGGGGCAGCCCATCCCCACTGGCTCTGAGATCAATGTACG
      ::::: ::::: ::: ::: ::: :::
-----TACCAACAGAAC-----CA--CCTTCC-----TCG
          640          650

1120      1130      1140      1150      1160      1170      1180

```

FIGURA 3b

entradas GAGCTCATAAGTACCAGGCTGAATTCCCATTCAGTCTGTGACCTCAGGCCAGCGGGACCTACAGGTG
... :
GTA-----GCAGAATTCTC-----AGAAGCCAC-----CGCTGA-----ACTG---A
660 670 680 690

1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250
entradas CTACGGCTCATACAGCTCCAACCCCCACCTGCTGCTTTCCCCAGTGAGCCCCTGGAACCTCATGGTCTCA
:
C--CGTCTCATTCA--CAAAC-----AAATCTT--CACAA-----CTGAGACT-----TCT--
700 710 720 730

1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320
entradas GGACACTCTGGAGGCTCCAGCCTCCACCCACAGGGCGCCCTCCACACCTGGTCTGGGAAGATACCTGG
. :
-----AGGAGTATC--ACCACCACTCAAAGGA--GTCAGACTCTCCAG--CTGG-----
740 750 760 770

1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390
entradas AGCTTTTGATTGGGGTCTCGGTGGCCTTCGTCTGCTGCTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCGAGC
:
-----TCCTGC-----CCGCCAGTA-----CTACACCAAGG
780 790 800

1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460
entradas TCAGCGTCACAGCAAACACAGGACATCTGACCAGAGAAAGACTGATTTCCAGCGTCTGCAGGGGCTGCG
:
GCAAC-----CTGGTC-----CGGATAT--GCCTC-----GGGGCTG--
810 820 830

1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530
entradas GAGACAGAGCCCAAGGACAGGGGCTGCTCAGGAGGTCCAGCCCAGCTGCTGACGTCCAGGAAGAAAACC
. :
----TGATCCTAATAA-----TCCTG--CGGGGGTTTCTG-----GCAGA-GGACTGG-----C
840 850 860 870

1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600
entradas TCTATGCTGCGGTGAAGGACACACACTCTGAGG-ACAGGGTGGAGCTGGACAGT-CAGAGCCCACACGAT
. :
AC-----AGCCG--GAGGAAGCGC--CTGCGGCACAGG--GCAGGGCTGTGCAGAGGCCGCT--
880 890 900 910 920

1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670
entradas GAAGACCCCCAGGCAGTGAOGTATGCCCOGCTGAACACTCCAGTCTTAGAGAGAAATGGCTCTCTCCTC
. :
----TCC-----GCCCCTG-----COGC-----C
930 940

1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740
entradas CCTCCTCACTGTCTGGGGAATTCTCTGGACACAAGGACAGACAGGTGGAAGAGGACAGGCAGATGGACAC
:
CCTCC--CGCAGAC-----CCGCAATCA--CA--CGGG-----GGTCAGG--ATGGA--
950 960 970 980

FIGURA 3c

```

      1750      1760      1770      1780      1790      1800      1810
entradas TGAGGCTGCTGCATCTGAAGCCTCCAGGATGTGACCTACGCCCAGCTGCAACAGCTTGACCCTTAGACGG
      :::      :::      :::::      :::::      :::::      :::::      ::
      ---GGC---CGAC-----ACGATGTT-----CACAGC-----CG-
                        990                        1000

      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880
entradas AAGGCAACTGAGCCTCCTCCATCCCAGGAAGGGGAACCTCCAGCTGAGCCCAGCATCTACGCCACTCTGG
                        :::::      :::::
      -----CGGGTTATG-----TTCA-----
                        1010

      1890
entradas CCATCCAC
      -----

```

FIGURA 3d

```

ALIGN calcula el alineamiento global de dos secuencias
versión 2.0 Cítela como Myers y Miller, CABIOS (1989)
> ht268 a.a.                                     339 aa frente a
> GenPept U91928 Clon humano HL9 inhib. de monocitos 631 aa
matriz de ponderación: paml20.mat, penalización por hueco: -12/-4
Identidad: 23,0%                               Puntuación del alineamiento global: -642

entradas      10      20      30      40      50      60
MSPSPITALFCLGLCLG-RVPAQSGPLPKPSLQALPSSLVPLEKPVTLRCQGPFGVDLYRLEKLSSS-----
.:. :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
HTPALTALLCLGLSLGPRTRVQAGPFPPKPTLWAEPGSVISWGSPTIWCQGSLEAQEYRLDKEGSPPEPLD
10      20      30      40      50      60      70

entradas      70      80      90      100     110     120     130
RYQ-----DQAVLFIPAGKRSLAGRYRCSYQNGSLWSLPSDQLELVATGVFAXPSLSAQPGFAVSSGGDV
.:. :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
RWINPLEPKPKARFSIPSHTEHHAGRYRCHYYSSAGHSEPSDPLELVHTGFYKPTLSALPSPVVASGGNM
80      90      100     110     120     130     140

entradas      TLQCQT-----RY-----
.:. :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
TLRCGSQKCYHHFVLMKEGESHQLPATLDSQQLHSGGFQALFPVGPVNPSHRWRFCTCYYYHNTPQVWSHP
150     160     170     180     190     200     210

entradas      -----140     150-----
GFDQFALYKEGDP-----
.:. :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
SDPLEILPSGVSRRKPSLLTLQGPVLAPGQSLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDFLQRPGQQPQAGLSQAN
220     230     240     250     260     270     280

entradas      -----160-----
APYK-----HP-----ERW-----
.:. :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
FTLGPVSPSHCCQYRCYGAHNLSSSEHSAPSDFLNILMACQIYDVTVLSAQPGPTVASGENVTLLCQSHWQ
290     300     310     320     330     340     350

entradas      -----170     180     190     200-----
YRASFPITVTAHSGTYRCYSFSSRDYPYLWSAPSDPLELVVTG
.:. :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
FDTFLLTKEGAHPPPLRLRSMYGAHYKQAEFFMSPVTSAHAGTYRCYGSYSSNPHLLSFPSEPLELWVG
360     370     380     390     400     410     420

entradas      210     220     230     240     250     260
TSVTPSRLPTEPPSS--VAEFSEATAELTVSFTNKVF-----TTETSRSITTSPEKESD--SPAGPA-
.:. :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
HSGGSSLPPTGPPSTPGLGRYLEVLIGVSVAEVLVLLFLLFLLLRRQRHSHKRTSDQRKTDQRPAGAAE
430     440     450     460     470     480     490

entradas      270     280     290
RQYYTKGNLVRICLGAVIL-----IILAGFLAEDW-----HSRRKR-----
.:. :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:

```

FIGURA 4a

entradas TEPKDRGLLRSSPAADVQEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPQAVTYAPVKHSSPREMASPPS
500 510 520 530 540 550 560

300 310 320 330
entradas -----LRHRGRAVQ--RPL-----PPLPPLPQTRK-----SHGCQDCCRQDVHSRGLC
: .: :. :.
SLSGEFLDTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVITYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPSIYATLAI
570 580 590 600 610 620 630

entradas S
H

FIGURA 4b

Alineamientos de los dominios de más puntuación:

ig: dominio 1 de 2, de 41 a 90: puntuación 4,1, E = 6,1

```

      *->GesvtLtCsvgfgppgvsvtWyfkngk.lgpsllgysysrlesgek
      . + vtL+C+          + v y + k ++      .F++ +
hT268  41  EKPVTLRQGP-----PGVDLY-RLEKISSS-----RYQDQ-- 70

      anlsegrfsissltLtissvekeDsGtYtCvv~-*
      ++L i      +++ +G Y+C
hT268  71  -----AVLFIPAMKRSLAGRYRCSY      90

```

FIGURA 5a

ig: dominio 2 de 2, de 127 a 182: puntuación 19,1, E = 0,1

```

      *->GesvtLtCsvgfpppgvsvtWfKngk.lgpsllgysysrlesgek
      G++vtL+C+++  +  ++ y k+g++ +  y+++
ht268 127  GGDVTLQCQTR---YGFDDQFALY-KEGDpAP-----YKNPERWYR-- 162

      anlsegrfsissltLtissvekeDsGtYtCvv<-*
      ++++i++v++ sGtY+C
ht268 163 -----ASFPIITVTAHSGTYRCYS 182

```

FIGURA 5b

GAGTCGACCCACGGCGTCCGCTTCCCTGCTTGGCCACATAGCTCAGGACTGGGTTGCAGAACCC	H S P A	4
ATG TCT CCA GCC		74
S P T F F C I G L C V L Q V I Q T Q S G		24
TCA CCC ACT TTC TTC TGT ATT GGG CTG TGT GTA CTG CAA GTG ATC CAA ACA CAG AGT GGC		134
P L P K P S L Q A Q P S S L V P L G Q S		44
CCA CTC CCC AAG CCT TCC CTC CAG GCT CAG CCC AGT TCC CTG GTA CCC CTG GGT CAG TCA		194
V I L R C Q G P P D V D L Y R L E K L K		64
GTT ATT CTG AGG TGC CAG GGA CCT CCA GAT GTG GAT TTA TAT CGC CTG GAG AAA CTG AAA		254
P E K Y E D Q D F L F I P T H E R S N A		84
CCG GAG AAG TAT GAA GAT CAA GAC TTT CTC TTC ATT CCA ACC ATG GAA AGA AGT AAT GCT		314
G R Y R C S Y Q N G S H W S L P S D Q L		104
GGA CGG TAT CGA TGC TCT TAT CAG AAT GGG AGT CAC TGG TCT CTC CCA AGT GAC CAG CTT		374
E L I A T G V Y A K P S L S A H P S S A		124
GAG CTA ATT GCT ACA GGT GTG TAT GCT AAA CCC TCA CTC TCA GCT CAT CCC AGC TCA GCA		434
V P Q G R D V T L K C Q S P Y S F D E F		144
GTC CCT CAA GGC AGG GAT GTG ACT CTG AAG TGC CAG AGC CCA TAC AGT TTT GAT GAA TTC		494
V L Y K E G D T G P Y K R P E K W Y R A		164
GTT CTA TAC AAA GAA GGG GAT ACT GGG CCT TAT AAG AGA CCT GAG AAA TGG TAC CGG GCC		554
N F P I I T V T A A H S G T Y R C Y S F		184
AAT TTC CCC ATC ATC ACA GTG ACT GCT GCT CAC AGT GGG ACG TAC CGG TGT TAC AGC TTC		614
S S S S P Y L W S A P S D P L V L V V T		204
TCC AGC TCA TCT CCA TAC CTG TGG TCA GCC CCG AGT GAC CCT CTA GTG CTT GTG GTT ACT		674
G L S A T P S Q V P T E E S F P V T E S		224
CGA CTC TCT GCC ACT CCC AGC CAG GTA CCC ACG GAA GAA TCA TTT CCT GTG ACA GAA TCC		734
S R R P S I L P T N K I S T T E K P M N		244
TCC AGG AGA CCT TCC ATC TTA CCC ACA AAC AAA ATA TCT ACA ACT GAA AAG CCT ATG AAT		794
I T A S P E G L S P P I G F A H Q H Y A		264
ATC ACT GCC TCT CCA GAG GGG CTG AGC CCT CCA ATT GGT TTT GCT CAT CAG CAC TAT GCC		854
K G N L V R I C L G A T I I I I L L G L		284
AAG GGG AAT CTG GTC CGG ATA TGC CTT GGT GCC ACG ATT ATA ATA ATT TTG TTG GGG CTT		914
L A E D W H S R K K C L Q H R H R A L Q		304
CTA GCA GAG GAT TGG CAC AGT CGG AAG AAA TGC CTG CAA CAC AGG ATG AGA GCT TTG CAA		974
R P L P P L P L A		314
AGG CCA CTA CCA CCC CTC CCA CTG GCC TAG		1004
AAATAACTTGGCTTTCAGCAGAGGGATTGACCAGACATCCATGCACAACCATGGACATCACCCTAGAGCCACAGACAT		1083
GGACATACTCAAGAGTGGGGAGGTTATATAAAAAATGAGTGTGGAGAATAAATGCAGAGCCCAACAGGTGAAAAAAA		1162
A		1163

FIGURA 6

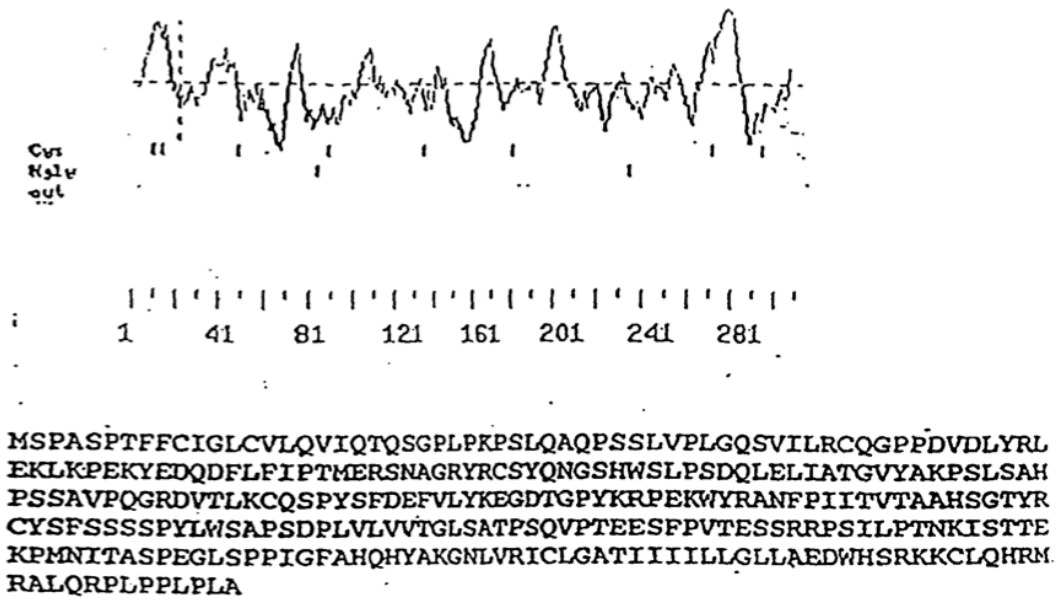


FIGURA 7

ALIGN calcula el alineamiento global de dos secuencias
 versión 2.0 Cítela como Myers y Miller, CABIOS (1989)
 > ORF de U91928 1893 aa frente a
 > ORF de mT268 939 aa
 matriz de ponderación: paml20.mat, penalización por hueco: -12/-4
 Identidad: 34,3% Puntuación del alineamiento global: -836

```

      10      20      30      40      50      60      70
entradas ATGACGCCCCCTCAGAGCCCTGCTCTGCCTTGGGCTGAGTCTGGGCCCCAGGACCCGCGTGCAGGCAG
      :::: :: :::: :::: :::: :::: ::::
      ATGTCTCCAGCC-TCAC--CC---ACTTTCCT--CTGTAT-----
      10      20      30

      80      90      100      110      120      130      140
entradas GGCCCTTCCCCAAACCCACCCTCTGGGCTGAGCCAGGCTCTGTGATCAGCTGGGCGAGCCCCCGTGACCAT
      ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      -----TGGGCTG-----TGTGTACTGC-----
      40

      150      160      170      180      190      200      210
entradas CTGGTGTCTAGGGGACCTTGGAGGCCAGGACTACCGACTGCATAAAGAGGGAAGCCAGAGCCCTTGGAC
      ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      -----AAGTCATCC-----AAACACAGAG--TGG--
      50      60      70

      220      230      240      250      260      270      280
entradas AGAAATAACCCACTGGAACCCAAGAACAGGCCAGATTCTCCATCCCATCCATGACAGAGCACCATGCGG
      ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      -----CCCACT--CCC--CAAG-----CCTTCCC-TCCAGG-----
      80      90

      290      300      310      320      330      340      350
entradas GGAGATACCGCTGCCACTATTACAGCTCTGCAGGCTGGTCAGAGCCCAGCGACCCCTGGAGCTGGTGAT
      : ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      -----CTCAGCC-----CAGTTCCTG-GTACCCTGGGTCAG-----
      100      110      120

      360      370      380      390      400      410      420
entradas GACAGGATTCTACAACAACCCACCCTCTCAGCCCTGCCAGCCCTGTGGTGGCCTCAGGGGGGAATATG
      .::: ::::: ::::: ::::: :::::
      -TCAG--TTATTC-----TGAGGTG-C--CAGGGA-----
      130      140      150

      430      440      450      460      470      480
entradas ACCCTCC-GATGTGGCTCACAGAAGGGATATCACCATTTTGTCTGATGAAGGAAGGAGAACACCAGCTC
      ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
      --CCTCCAGATGTG-----ATTATATGGCTGGAGAACTGAAA-----
      160      170      180      190

      490      500      510      520      530      540      550
entradas CCOGGGACCCCTGGACTCACAGCAGCTCCACAGTGGGGGTTCCAGGCCCTGTTCCCTGTGGGCCCCGTGA
      ::::: ::::: ::::: ::::: :::::
    
```

FIGURA 8a

```

--CCGGA-----GA-----AGTATGAAGATCAAGAC---TTTCTCTT-----CATT-
                                200    210          220

560    570    580    590    600    610    620
entradas ACCCCAGCCACAGGTGGAGGTCACATGCTATTATATGAACACCCCCAGGTGTGGTCCCACCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
--CCAACCATGGAAGAAGTA---ATGCT-----GGAC-----GGTAT-----
      230    240    250          260

630    640    650    660    670    680    690
entradas CAGTGACCCCTGGAGATTCTGCCCTCAGGCGTGTCTAGGAAGCCCTCCCTCCTGACCTGCAGGGCCCT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CGATG---CTCTTA-----TCAGA---ATGGGAGTC-----ACTGGTCTCT
      270          280          290

700    710    720    730    740    750    760
entradas GTCCTGGCCCTGGGCAGACCTGACCCCTCCAGTGTGGCTCTGATGTGGCTACGACAGATTGTCTCTGT
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----CCCAAG-----TGACCAGCTTGAG---CTAATT---GCTAC-----
      300          310          320

770    780    790    800    810    820    830
entradas ATAAGGAGGGGAACGTGACTTCCTCCAGCGCCCTGGCCAGCAGCCCCAGGCTGGGCTCTCCAGGCCAA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
---AGGTGTGTATGCTAAAC---CCTC-----ACTCTC-----
      330    340          350

840    850    860    870    880    890    900
entradas CTTCACCCCTGGGCCCTGTGAGCCCTCCACAGGGGGCCAGTACAGGTGCTATGGTGCACACAACCTCTCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----AGCTCATCCA-----GCT-----
      360

910    920    930    940    950    960    970
entradas TCCGAGTGGTCGGCCCCCAGCGACCCCTGAACATCCTGATGGCAGGACAGATCTATGACACCGTCTCCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----CAGCAGTCCC-----TC---AAGGCAGG---GAT---GTGACTCTGA-----
      370          380          390          400

980    990    1000    1010    1020    1030    1040
entradas TGTCAGCACAGCCGGGGCCACAGTGGCCTCAGGAGAGAAAGTGAACCTGCTGTGTGTCAGTCATGGTGGCA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
AGT-----GCCAGAGCCATA-----CAGTTTGTATGA---
      410          420

1050    1060    1070    1080    1090    1100    1110
entradas GTTTGACACTTTCCTTCTGACCAAGAAGGGGGCAGCCCATCCCCCACTGGCTCTGAGATCAATGTACGGA
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-----ATTGGTCTATACAAGAAGGGG---AT---ACTGGGCCTTATA---AGAGACCTGA
      430    440    450          460    470

1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180

```

FIGURA 8b

[illegible]

FIGURA 8c

```

      1750      1760      1770      1780      1790      1800      1810
entradas GCTGCTGCATCTGAAGCCTCCCAGGATGTGACCTACGCCCAGCTGCACAGCCTGACCCTTAGACGGAAGG
      ::  :::::..      :::::..      :::::..      :::::..      :::::
      GC--CTGCAACA-----CAGGATGAGA-----GCTTTGC-----AAAGG
              890              900              910

      1820      1830      1840      1850      1860      1870      1880
entradas CAACTGAGCCTCCTCCATCCCAGGAAGGGGAACCTCCAGCTGAGCCCAGCATCTACGCCACTCTGGCCAT
      : :::.      :::.      :::::      :::::      :::::
      CCACTA-----CCACC-----CCTCC-----CACTGGCC--
              920              930

      1890
entradas CCAC
      ----

```

FIGURA 8d

ALIGN calcula el alineamiento global de dos secuencias

versión 2.0 Cítela como Myers y Miller, CABIOS (1989)

> mT268 a.a.

313 aa frente a

> GenPept U91928 Clon humano HL9 inhib. de monocitos 631 aa

matriz de ponderación: pam120.mat, penalización por hueco: -12/-4

Identidad: 20,3%

Puntuación del alineamiento global: -802

```

10      20      30      40      50      60
entradas MSPASPTFFCIGLCVLQVIQTQSGPLPKPSLQAQPSLVPLGQSVILRCQGPDPVDLYRLEKL-KPERYE
      :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
      MTPALTALLCLGLSLGPRTRVQAGFPKPTLWAEPGSVISWGSPTIWCQGSLEAQEYRLDKEGSPEPLD
      10      20      30      40      50      60      70

70      80      90      100      110      120      130
entradas DQDFL-----F-IPTHERSNAGRYRCSYQNGSHWSLPSDQLELIATGVYAKPSLSAHPSSAVPQGRDV
      .. : :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
      RNNPLEPKNKARFSIPSMTEHHAGRYRCHYSSAGHSEPSDPLELVMTGFYNKPTLSALPSPVVASCGGM
      80      90      100      110      120      130      140

entradas TLKC--QSPY-----
      :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
      TLRCSQKGYHMFVLMKEGEHQLPRTLDSQQLHSGGFQALFPVCPVNPISHRWFTCYYYYHITPQVWSHP
      150      160      170      180      190      200      210

entradas -----140150-----
      :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
      SDPLEILPSGVSARKPSLLTLQGPVLAPGQSLTLQCGSDVGYDRFVLYKEGERDFLQRPQQPQAGLSQAN
      220      230      240      250      260      270      280

entradas -----160-----
      :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
      FTLGPVSPSHGGQYRCYGAHNLSSSEHSAPSDPLNILMAGQIYDTVLSLAQPGPTVASCENVTLTLCQSWAQ
      290      300      310      320      330      340      350

entradas -----170180190200-----
      :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
      FDTFLLTKEGAHPPLRLRSMYGARKYQAEFPMSPVTSAHAGTYRCYGSYSSNPRLSFPSEPLEIMVSG
      360      370      380      390      400      410      420

entradas 210220-----
      :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
      HSGGSSLPPTGPPSTPGLCRYLEVLCVSVAFVLLLFLLLFLLRRQRHSHKRTSDQRKTDQRPAGAAE
      430      440      450      460      470      480      490

entradas -----230240250260270-----
      :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:
      TESS-----RRPS-----ILPTNKISTTEKPMNI-TASPEGLSP-PIGFAH--QHYAKGNLVR--I
      :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.: :.:

```

FIGURA 9a

```

TEPKDRGLLRSSPAADVQEEENLYAAVKDTQSEDRVELDSQSPHDEDPQAVTYAPVTHSSPRPEMASPPS
      500      510      520      530      540      550      560

      280      290      300      310
entradas CLGATIIIIILLGLLAEDWH-----SRKKCLQHRRALQRPL-----PP-----LPL
      :. . . . . :. . . . . :. . . . . :. . . . . :. . . . . :. . . . . :. . . . .
      SLSGEFLOTKDRQVEEDRQMDTEAAASEASQDVTYAQLHSLTLRRKATEPPPSQEGEPPAEPSIYATLAI
      570      580      590      600      610      620      630

entradas A
      H

```

FIGURA 9b

Alineamientos de los dominios de más puntuación:

ig: dominio 1 de 2, de 42 a 91: puntuación 10,2, E = 1,4

```

      *->GesvtLtCsvgfgppgvsvtWfknk.lgpsllgysysrlesgek
      G+sv L+C+      ++v y + k ++      +++e +
mT268  42  GQSVILRCQGP-----PDVDLY-RLEKIKP-----EKYEDQ-- 71

      anlsegrrfsissltLtissvekeDsGtYtCvv<-+
      L i + e++++G Y+C
mT268  72  -----DFLFIPTHERSNAGRYRCSY      91

```

FIGURA 10a

ig: dominio 2 de 2, de 128 a 183: puntuación 9,6, E = 1,6

```

      *->GesvtLtCsvgfgppgvsvtHyFkngk.lgpsllgysysrlesgek
      G +vtL C++      ++. y k+g++ +      y+r+e +
mT268  128  GRDVTCLKCQSP---YSFDEFVLY-KEGDtGP-----YKRPEKW-Y 162
      .
      anlsegrfsissltLtissvekeDsGtYtCvv<-*
      +      ++i++v++ sGtY+C
mT268  163 RA-----HFPIITVTAHSGTYRCYS      183

```

FIGURA 10b

ALIGN calcula el alineamiento global de dos secuencias
 versión 2.0 Cítela como Myers y Miller, CABIOS (1989)
 > hT268 a.a. 339 aa frente a
 > mT268 a.a. 313 aa
 matriz de ponderación: pam120.mat, penalización por hueco: -12/-4
 Identidad: 64,4% Puntuación del alineamiento global: 1101

```

      10      20      30      40      50      60
entradas: HSPSPTALFCLGLCLGRV-PASGPLPKPSLQALPSSSLVPLEKPVTLRCQGPFGVDLYRLEKLSSSRYQO
          .....
          HSPASPTFFCIGLCVLQVIQTSGPLPKPSLQALPSSSLVPLQGSVILRCQGPFPDVLRYLEKLNPEKYED
              10      20      30      40      50      60      70

      70      80      90      100     110     120     130
entradas: QAVLFIPAYKRSLAGRYRCSYQNGSLWSLPSDQLELVATGVFAKPSLSAQPGPAVSSGGDVTLQCQTRYG
          ..
          QDFLFIPTERSNAGRYRCSYQNGSFWSLPSDQLELIATGVYAKPSLSAHPSSAVPQGRDVTLKCQSPYS
              80      90      100     110     120     130     140

      140     150     160     170     180     190     200
entradas: FDQFALYKEGDPAPYKNPERWYRASFPIIITVTAAHSGTYRCYSFSSRDPYLWSAPSDPLELVVVTGTSVTP
          .....
          FDEFVLYKEGDTGPYKRPEKWYRANFPIIITVTAAHSGTYRCYSFSSSSPYLWSAPSDPLVLVVTGLSATP
              150     160     170     180     190     200     210

      210     220     230     240     250     260     270 ↓
entradas: SRLPTEPSSVAEFSEATAELTVSFTNKVTTETSRSITTSPKESDSPAGPARQYYTKGNLVRICLGAVI
          .....
          SQVPTESFPVTESSRRPSILP---TNKISTTEKPNITASPEGLSPPIGFAHQHYAKGNLVRICLGATI
              220     230     240     250     260     270

      280     290     300     310     320     330
entradas: LIILAGFLAEDWHSRRKRLRHGRAVQRPLPPLPPLPQTRKSHGQDGGGRQDVHSRGLCS
          .....
          IIILGLLAEDWHSRRKCLQHRRALQRPLPPLP-LA-----
              280     290     300     310
    
```

FIGURA 11

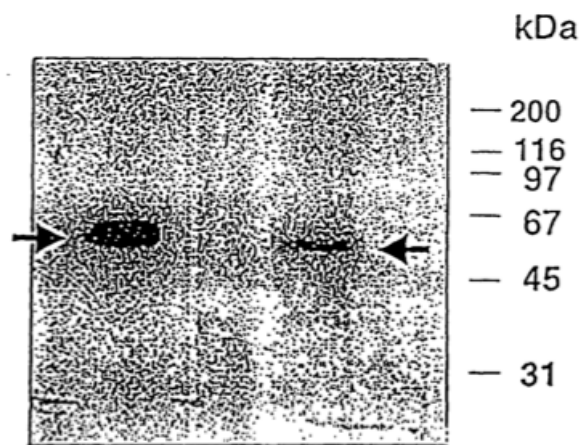


FIGURA 12

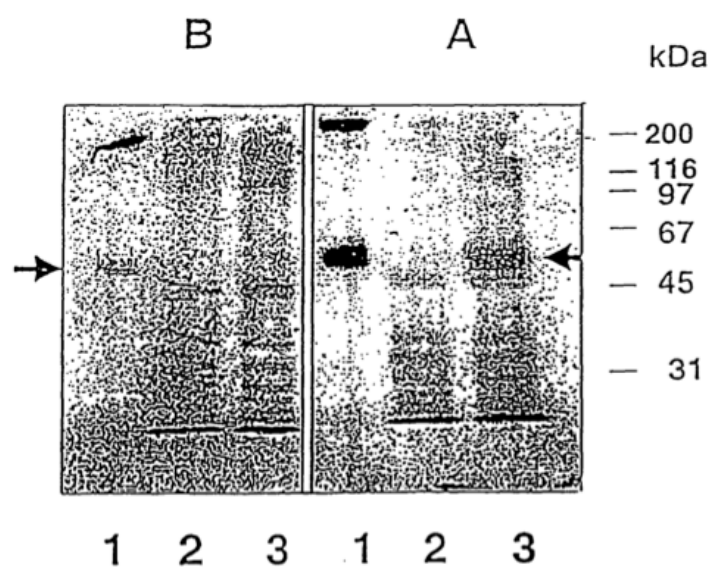


FIGURA 13

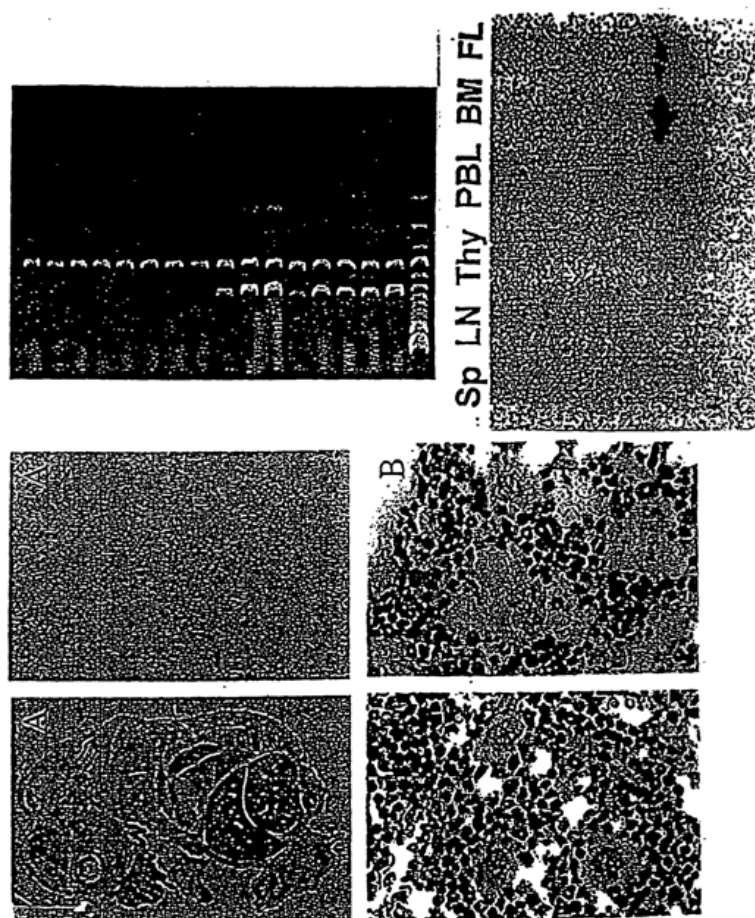


FIGURA 14

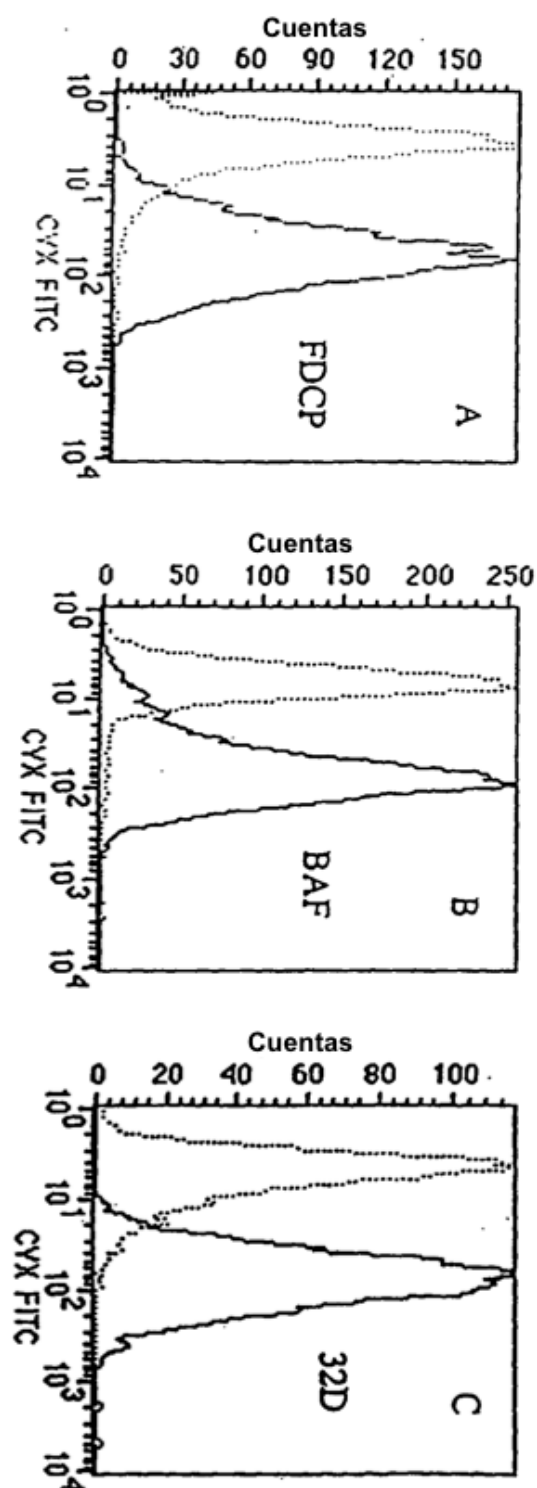


FIGURA 15

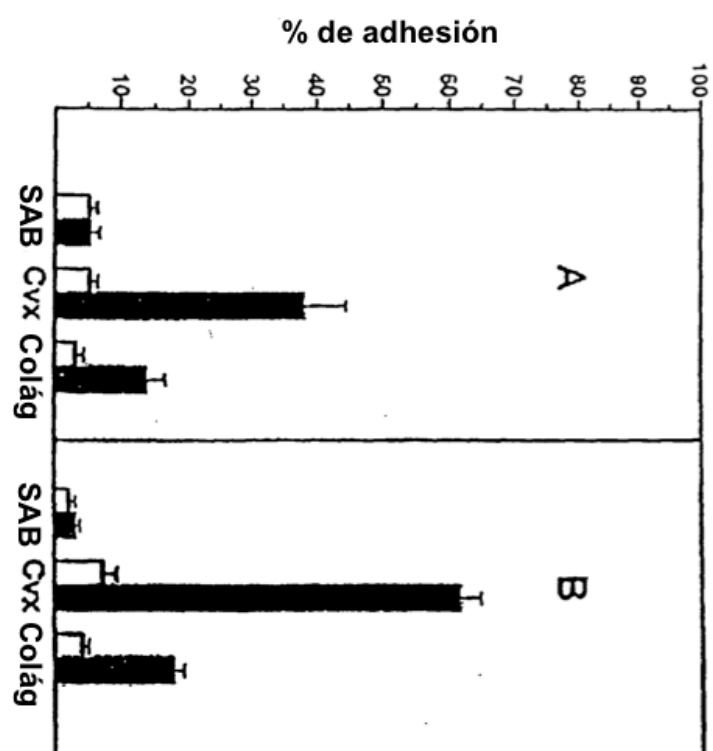


FIGURA 16

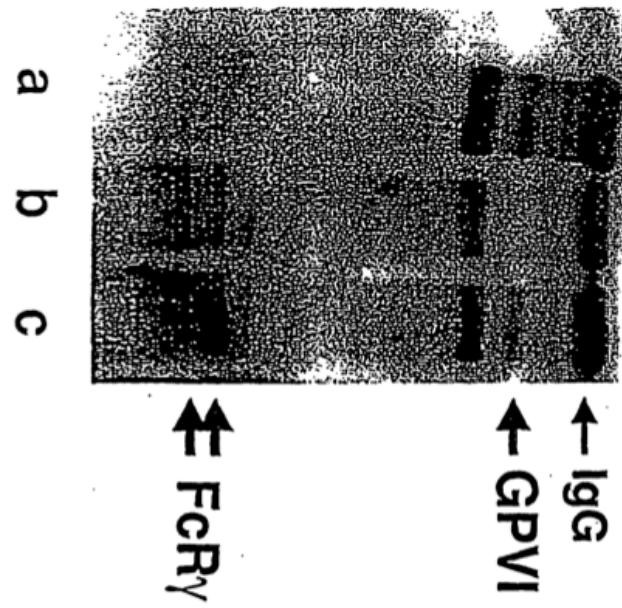


FIGURA 17

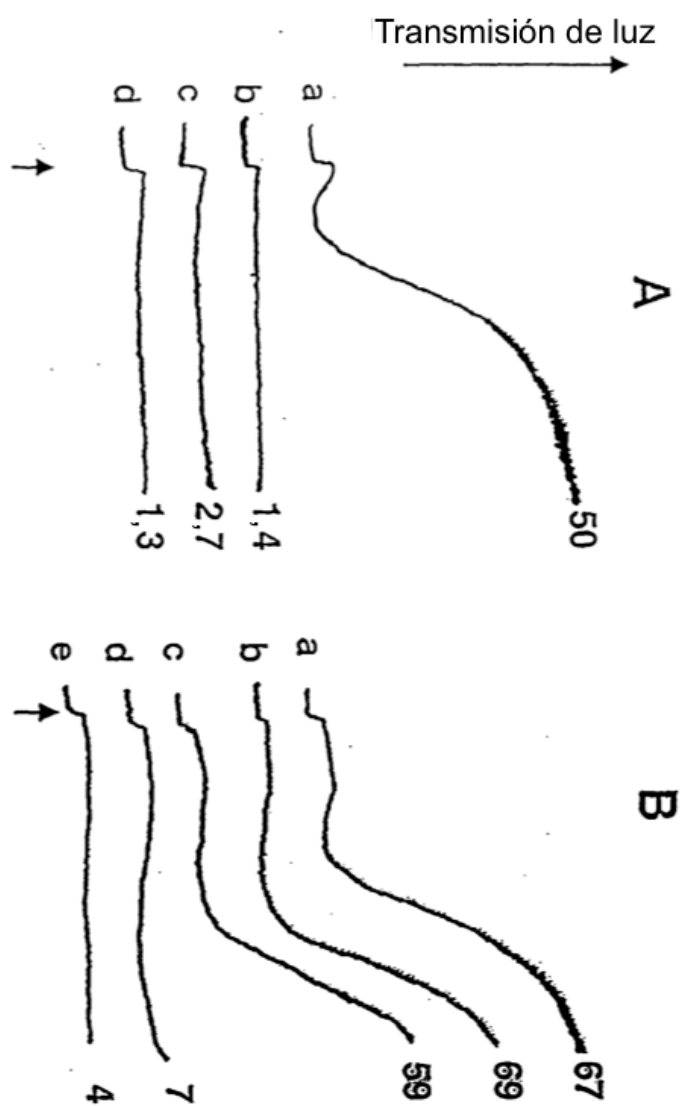


FIGURA 18

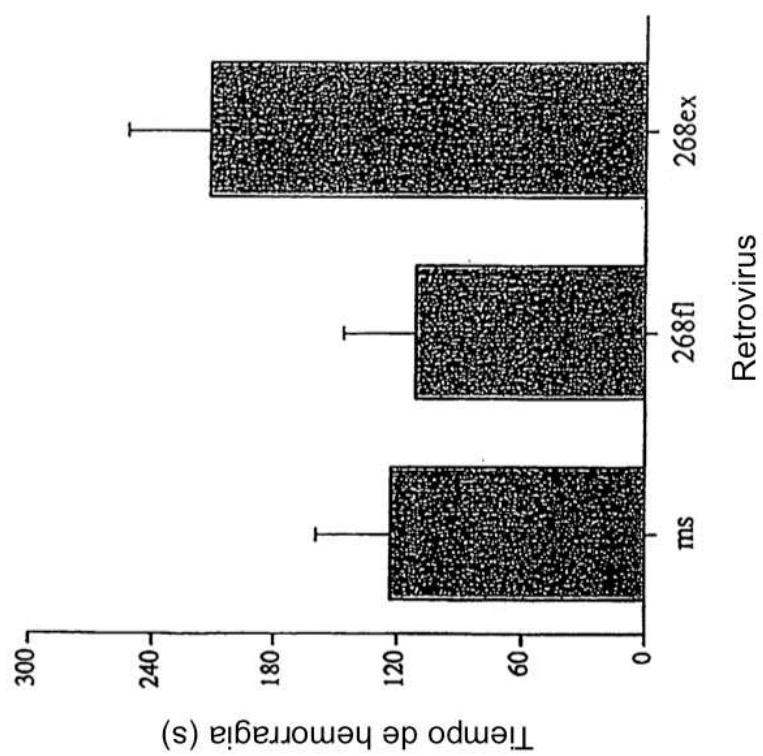


FIGURA 19

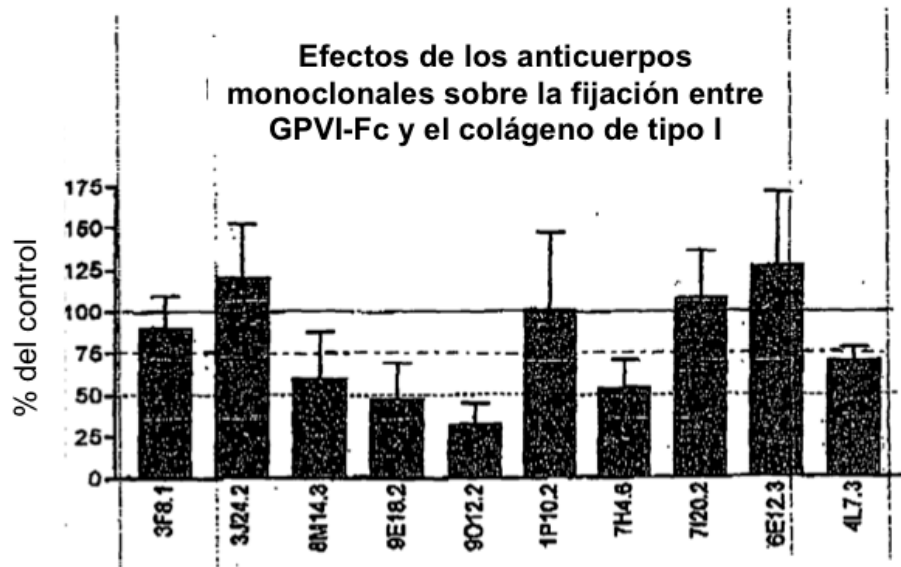


FIGURA 20

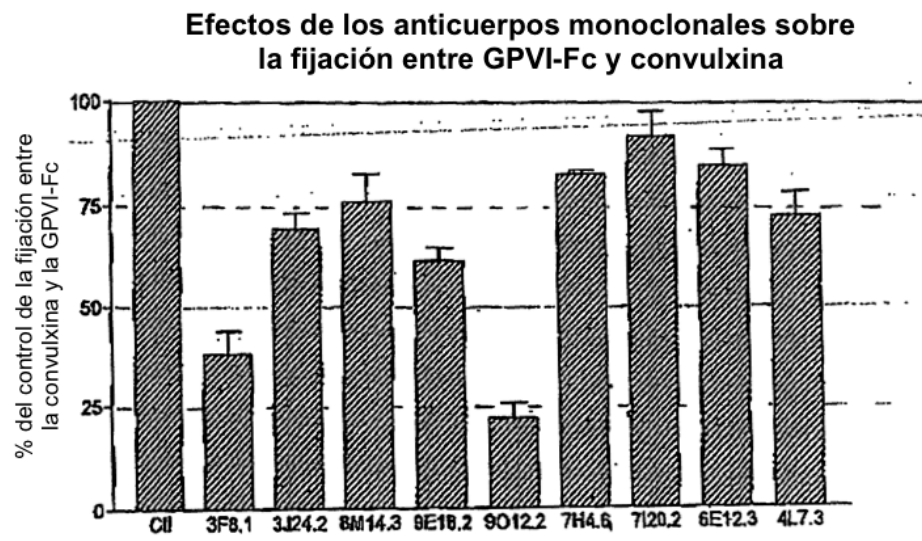


FIGURA 21

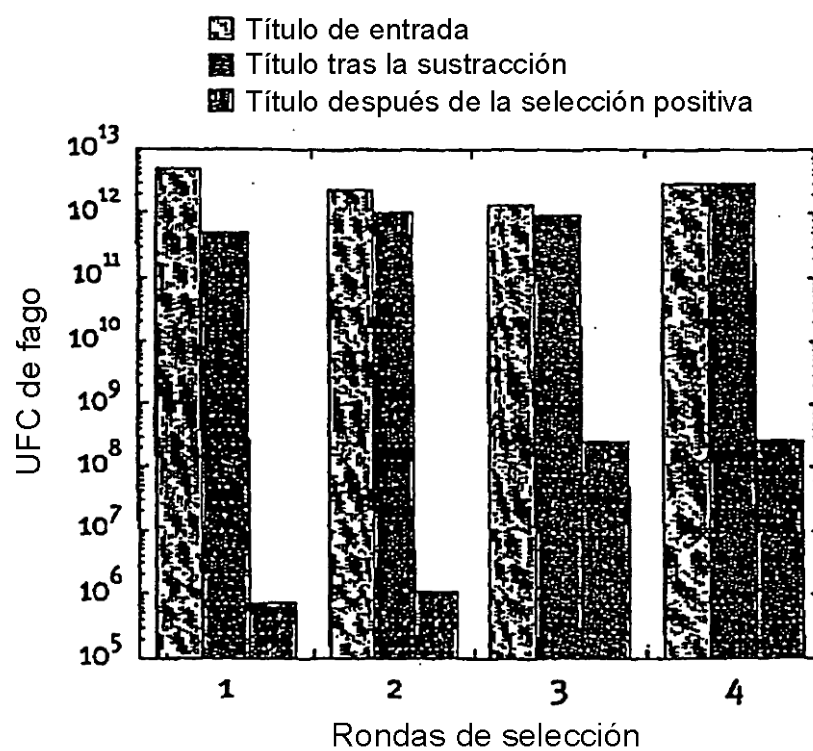


FIGURA 22

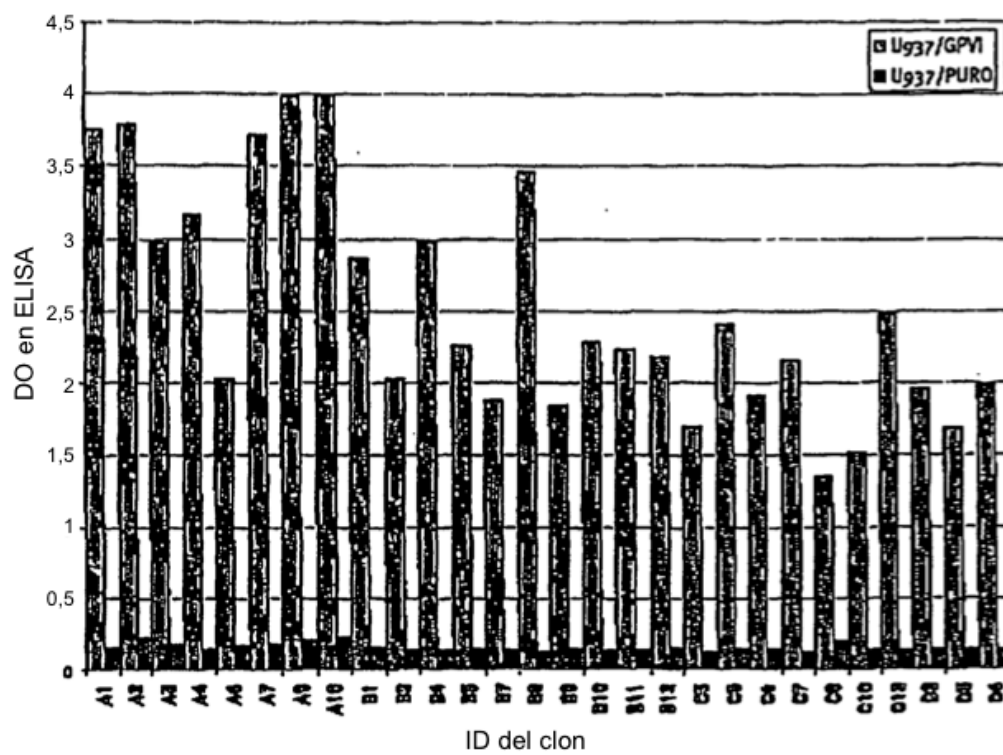


FIGURA 23a

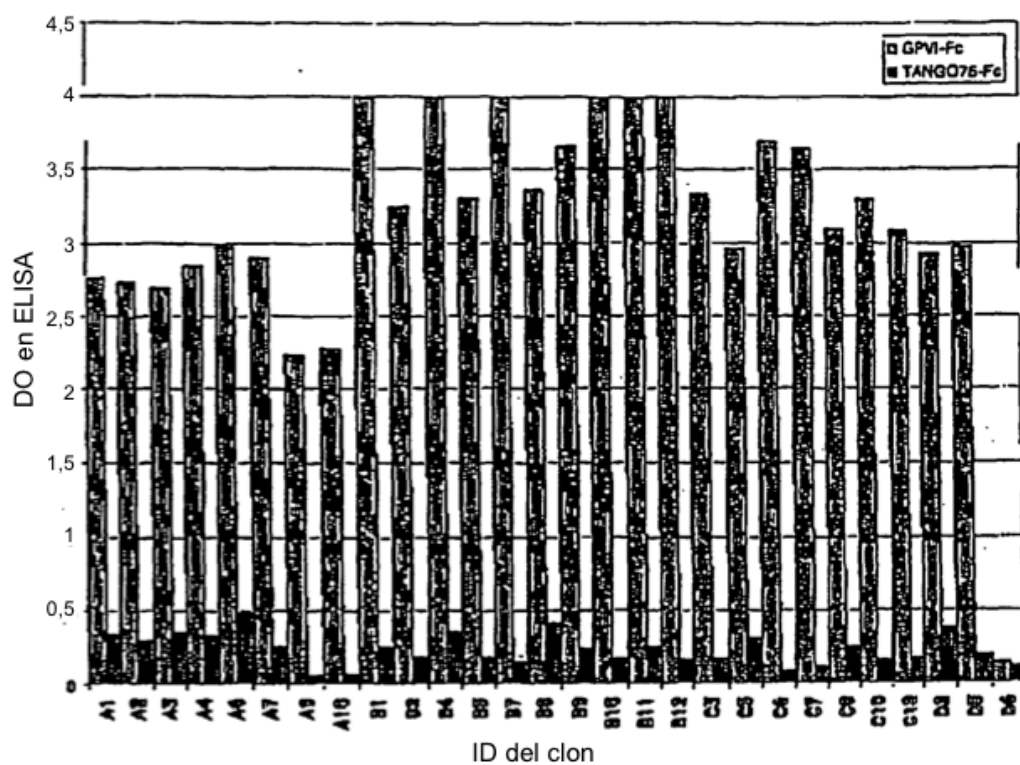


FIGURA 23b

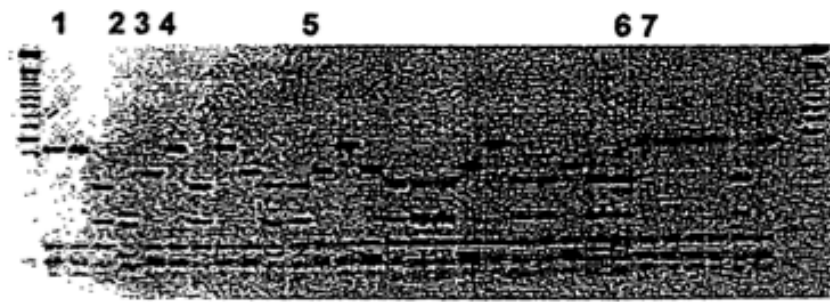


FIGURA 24

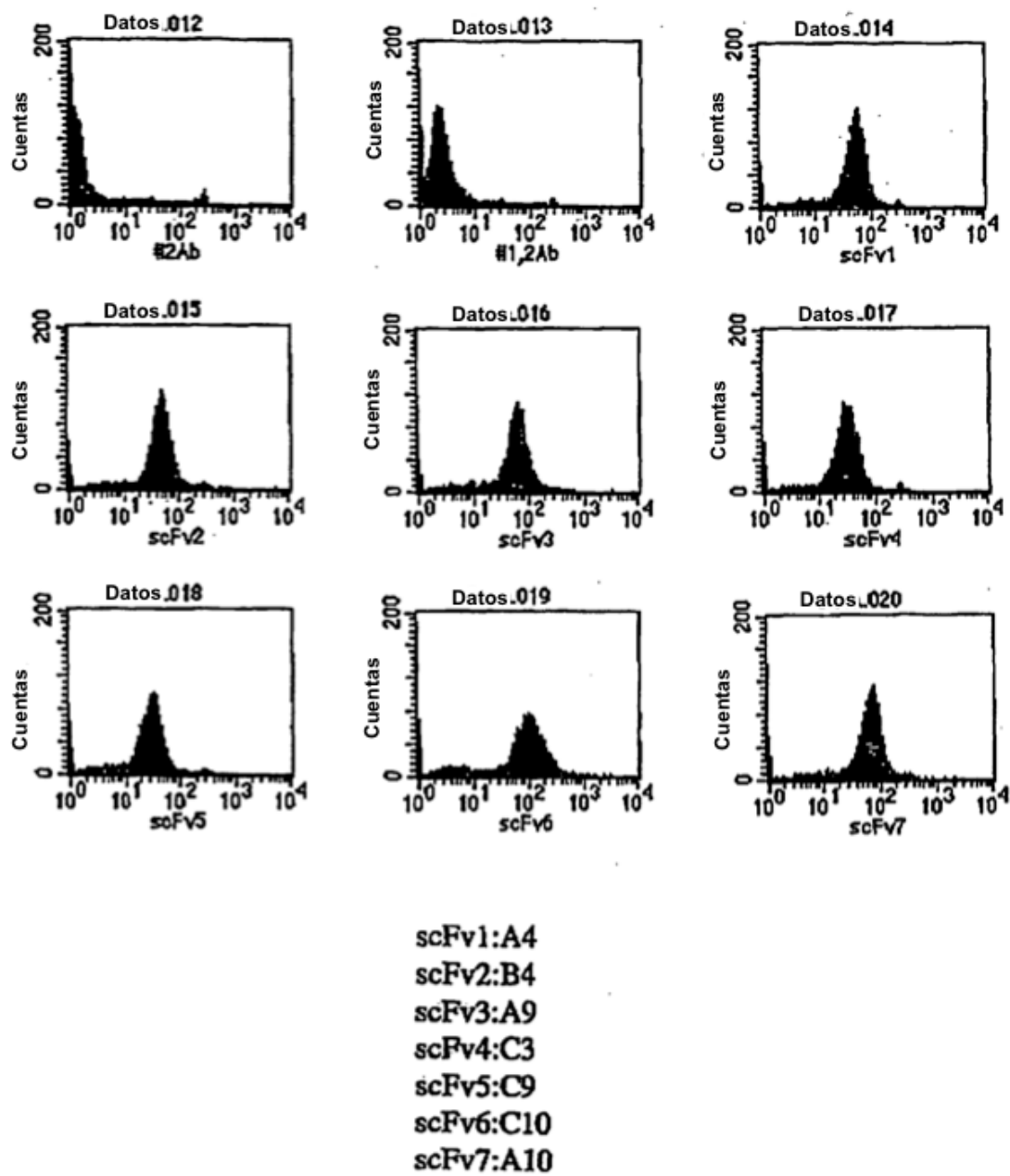


FIGURA 25

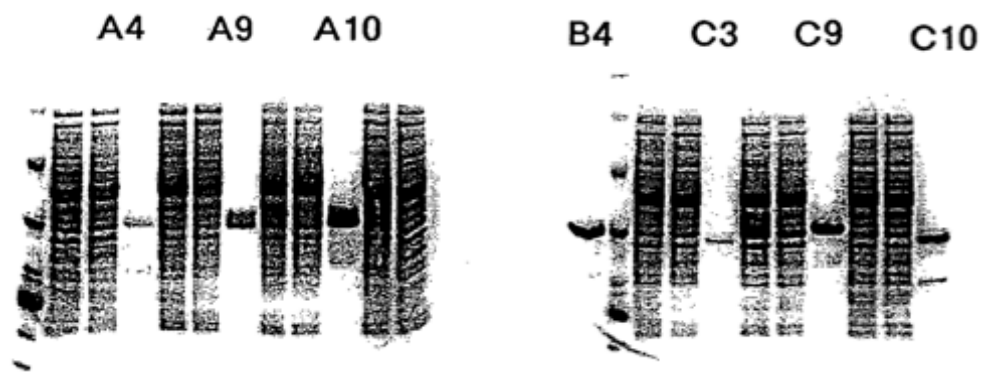


FIGURA 26

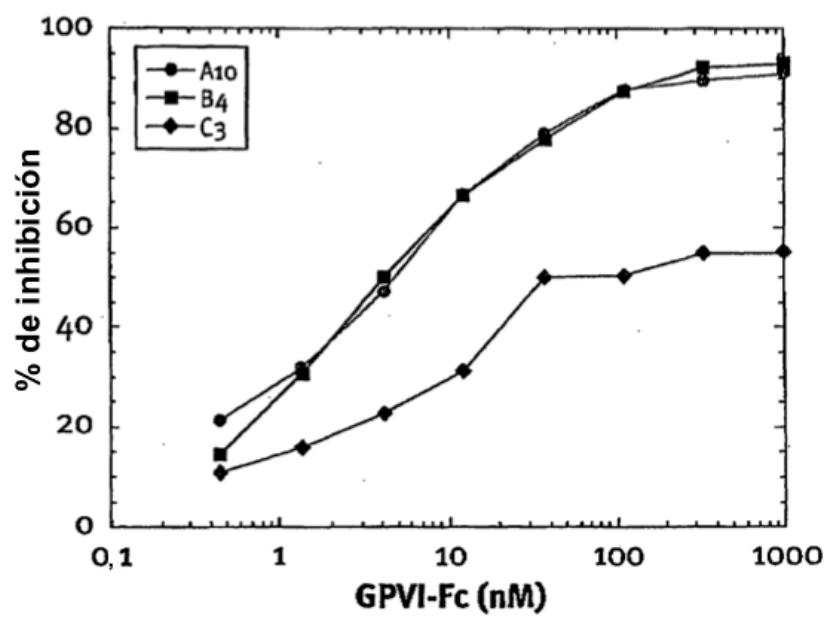


FIGURA 27