

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 981**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07018269 .6**
96 Fecha de presentación: **01.10.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1895017**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.03.2008**

54 Título: **UTILIZACIÓN DE ANTÍGENOS A33 Y JAM-IT.**

30 Prioridad:
03.10.2002 US 265542
31.07.2003 US 633008

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.02.2012

73 Titular/es:
GENENTECH, INC.
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:
Ashkenazi, Avi, J.;
Fong, Sherman;
Goddard, Audrey;
Gurney, Austin L.;
Napier, Mary A.;
Tumas, Daniel;
Van Lookeren, Menno y
Wood, William I.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 373 981 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de antígenos A33 y JAM-IT.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 **[0001]** La presente invención se refiere en general a la identificación, aislamiento y producción recombinante de ADN novedoso y polipéptidos novedosos, la presencia de los cuales está asociada con enfermedades inflamatorias (antígenos asociados con la inflamación) y/o cáncer, y a composiciones y procedimientos para el diagnóstico y el tratamiento de condiciones caracterizadas por dichos antígenos.

15 Descripción de la técnica relacionada

20 **[0002]** La respuesta inflamatoria es compleja y está mediada por una serie de moléculas de señalización producidas de forma local por mastocitos, terminaciones nerviosas, plaquetas, leucocitos y activación de complementos. Ciertas moléculas de señalización provocan que el recubrimiento de células endoteliales se vuelva más poroso y/o incluso expresen selectinas que actúan como moléculas de la superficie celular que reconocen y atraen leucocitos a través del reconocimiento de carbohidratos específicos. La unión más fuerte de los leucocitos está mediada por las integrinas, las cuales median en el movimiento de los leucocitos a través del endotelio. Las moléculas de señalización adicionales actúan como quimioattractores, provocando que los leucocitos unidos avancen lentamente hacia la fuente del atractor. Otras moléculas de señalización producidas en la evolución de una respuesta inflamatoria escapan a la sangre y estimulan la médula ósea para que produzca más leucocitos y se liberen al torrente sanguíneo.

25 **[0003]** La inflamación es iniciada habitualmente por un antígeno, el cual puede ser a la práctica cualquier molécula capaz de iniciar una respuesta inmune. En condiciones fisiológicas normales éstas son moléculas exógenas, pero las moléculas generadas por el propio organismo pueden servir como catalizadores tal como se sabe que pasa en varios estados de la enfermedad.

30 **[0004]** La proliferación de células T en un cultivo mixto de leucocitos o una reacción linfocitaria mixta (MLR) es una indicación establecida de la capacidad de un compuesto para estimular el sistema inmune. En una respuesta inflamatoria, los leucocitos de respuesta pueden ser neutrofílicos, eosinofílicos, monocíticos o linfocíticos. El examen histológico de los tejidos afectados proporciona evidencias de una respuesta estimulante o inhibidora inmune. Ver *Current Protocols in Immunology*, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley and Sons, Inc.

35 **[0005]** La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD) es un término utilizado para describir colectivamente trastornos de los intestinos que incluyen tanto la colitis ulcerativa (UC) como la enfermedad de Crohn, ambas clasificadas como trastornos diferentes, pero comparten características comunes y probablemente comparten patología. Lo común del criterio de diagnóstico dificulta determinar con precisión cuál de los dos trastornos sufre el paciente; sin embargo, el tipo y la localización de la lesión son habitualmente diferentes en cada uno. Las lesiones de la UC son de forma característica una úlcera superficial de la mucosa y aparecen en el colon, proximal al recto. Las lesiones de la CD son de forma característica fisuras lineales extensas y pueden aparecer en cualquier parte del intestino, implicando ocasionalmente el estómago, el esófago y el duodeno.

40 **[0006]** Los tratamientos convencionales para IBD implican habitualmente la administración de agentes antiinflamatorios o inmunosupresores, tales como sulfasalacina, corticosteroides, 6-mercaptopurina/azatropina o ciclosporina, todos ellos sólo aportan un alivio parcial al paciente afectado. Sin embargo, cuando fallan las terapias antiinflamatorias/inmunosupresoras, las colectomías son la última línea de defensa. La cirugía es requerida para aproximadamente el 30% de los pacientes de CD durante el primer año después del diagnóstico, con un aumento de la probabilidad para un procedimiento quirúrgico de aproximadamente un 5% anualmente desde ese momento. Desafortunadamente, la CD también tiene una tasa elevada de reaparición, ya que aproximadamente un 5% de los pacientes requieren cirugía posterior después del año inicial. Los pacientes de UC tienen además un riesgo sustancialmente creciente de desarrollar cáncer colorrectal. Presumiblemente, esto es debido a los ciclos recurrentes de lesión en el epitelio, seguido de un recrecimiento que aumenta continuamente el riesgo de transformación neoplásica.

45 **[0007]** Un miembro recientemente descubierto de la superfamilia de inmunoglobulinas conocida como Molécula de Adhesión de Unión (JAM) se ha identificado que está selectivamente concentrada en las uniones intercelulares de células endoteliales y epiteliales de orígenes diferentes. Martin-Padura, I. et al., *J. Cell Biol.* 142(1): 117-27 (1998).

JAM es una proteína de membrana integral del tipo I con dos bucles disulfuro extracelulares entre cadenas del tipo V. JAM porta una sustancial homología con el antígeno A33 (figura 1 o figura 18). Se observó que un anticuerpo monoclonal dirigido a JAM inhibía la trans migración de monocitos espontánea e inducida por quimioquinas a través de una monocapa de células endoteliales *in vitro*. Martin-Padura, *supra*. Recientemente se ha descubierto que
 5 aumenta la expresión de JAM en el colon de ratones CRF2-4 -/- con colitis. CRF2-4 -/- (ratones knockout de subunidades IL-10R) desarrollan una colitis espontánea mediada por linfocitos, monocitos y neutrófilos. Varios animales también desarrollaron adenocarcinoma de colon. Como resultado, es probable que los compuestos de la presente invención se expresen en niveles elevados en, o en cualquier caso, asociados con enfermedades humanas, tales como la enfermedad inflamatoria de intestino, otras enfermedades inflamatorias de intestino, así
 10 como carcinoma colorrectal.

[0008] JAM y los polipéptidos aquí descritos portan una homología significativa con el antígeno A33, un conocido marcador asociado con el cáncer colorrectal. El antígeno A33 se expresa en más del 90% de los cánceres de colon primarios o metastáticos, así como epitelio de colon normal. En los carcinomas que se originan de la mucosa colónica, el antígeno A33 se expresa de forma homogénea en más de un 95% de los casos. Sin embargo, el antígeno A33 no se ha detectado en un amplio rango de otros tejidos normales, es decir, su expresión parece ser específico de órgano. Por lo tanto, el antígeno A33 parece jugar un papel importante en la inducción del cáncer colorrectal.
 15

[0009] Dado que el cáncer de colon es una enfermedad ampliamente extendida, el diagnóstico y tratamiento precoz es un objetivo médico importante. El diagnóstico y tratamiento del cáncer de colon se puede llevar a cabo utilizando anticuerpos monoclonales (mAbs) específicos que tienen por tanto etiquetas (*tags*) fluorescentes, magnéticos nucleares o radioactivos. Se pueden utilizar mAbs etiquetados con genes radioactivos, toxinas y/o fármaco para el tratamiento *in situ* con la descripción mínima del paciente. Los mAbs también se pueden utilizar para el diagnóstico durante el diagnóstico y el tratamiento de los cánceres de colon. Por ejemplo, cuando los niveles en suero del antígeno A33 son elevados en un paciente, una caída de los niveles después de la cirugía indicaría que la resección del tumor fue un éxito. Por otro lado, un aumento posterior en los niveles de antígeno A33 en el suero después de la cirugía indicaría que podría haberse formado la metástasis del tumor original o que podrían haber aparecido nuevos tumores primarios.
 20
 25

[0010] Dichos anticuerpos monoclonales se pueden utilizar en lugar de, o conjuntamente con cirugía y/u otras quimioterapias. Por ejemplo, los análisis preclínicos y los estudios de localización en pacientes infectados con carcinoma colorrectal con un mAb para A33 se describen en Welt et al., *J. Clin. Oncol.* 8: 1894-1906 (1990) y Welt et al., *J. Clin. Oncol.* 12: 1561-1571 (1994), mientras que U.S.P. 4.579.827 y U.S.S.N. 424.991 (E.P. 199.141) están dirigidos a la administración terapéutica de anticuerpos monoclonales, el último de los cuales se refiere a la aplicación de mAb anti-A33.
 30
 35

[0011] El documento WO00/37638 describe métodos y composiciones para inhibir el crecimiento de células neoplásicas. Se describe un polipéptido de 321 aminoácidos referido como PRO362.
 40

[0012] El documento WO00/53758 describe métodos y composiciones para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune. Se describe PRO362.
 45

[0013] El documento describe métodos y composiciones para el tratamiento y diagnóstico de trastornos caracterizados por la presencia de antígenos asociados con enfermedades inflamatorias y/o cáncer. Se describe PRO362.
 50

[0014] El documento WO01/36432 describe proteínas secretadas humanas y materiales y métodos relacionados, incluyendo HMSOW51 (número de gen 11), que tienen cierta similitud con los polipéptidos de la invención.
 55

[0015] El documento WO99/40100 describe proteínas secretadas humanas y materiales y métodos relacionados, incluyendo el número de gen 11, que codifica un polipéptido que tiene cierta similitud con los polipéptidos de la invención.
 60

[0016] El documento WO00/12703 describe moléculas de transporte de proteínas humanas y materiales y métodos relacionados, incluyendo la SEC ID NO:6, que tiene cierta similitud con los polipéptidos de la invención.
 65

[0017] El número de acceso UniProt Q80WA3 describe una proteína murina que tiene cierta similitud con los polipéptidos de la invención.
 70

Descripción resumida de la invención

[0018] En un aspecto, la presente invención se refiere en general a composiciones tal como se define en las reivindicaciones útiles en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades inflamatorias en mamíferos, incluyendo humanos. La presente invención se basa, en parte, en la identificación de polipéptidos que están implicados en enfermedades inflamatorias en mamíferos.

[0019] En un aspecto tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a medios para el tratamiento de un trastorno inflamatorio en un mamífero, mediante la administración al mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de una inmunoadhesina, que comprende una secuencia de dominio extracelular de un polipéptido STIgMA o PRO362 fusionado a una secuencia de región constante de inmunoglobulina.

[0020] En ciertas realizaciones, tal como se define en las reivindicaciones, el polipéptido STIgMA se selecciona del grupo que consiste en los polipéptidos de SEC ID NOS: 2, 32, 33, y 34. El polipéptido PRO362 comprende la secuencia SEC ID NO: 2.

[0021] En otra realización, el trastorno inflamatorio se selecciona del grupo que consiste en: enfermedad inflamatoria del intestino; lupus eritematoso sistémico; artritis reumatoide; artritis crónica juvenil; espondiloartropatías; esclerosis sistémica, por ejemplo, escleroderma; miopatías inflamatorias idiopáticas, por ejemplo, dermatomiositis, polimiositis; síndrome de Sjörger; vasculitis sistémica; sarcoidosis; anemia hemolítica autoinmune, por ejemplo pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna; trombocitopenia autoinmune, por ejemplo, púrpura trombocitopénica idiopática; trombocitopenia mediada por el sistema inmune; tiroiditis, por ejemplo enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica; diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune, por ejemplo glomerulonefritis, nefritis tubulointerstitial; enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática; enfermedades hepatobiliares tales como las hepatitis infecciosas, por ejemplo hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos; hepatitis crónica activa autoinmune; cirrosis biliar primaria; hepatitis granulomatosa; y conlangitis esclerosante; enfermedades inflamatorias y fibróticas del pulmón (por ejemplo, fibrosis quística); enteropatía sensible al gluten; enfermedad de Whipple; enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune incluyendo las enfermedades de piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis; enfermedades alérgicas del pulmón, tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes incluido el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped.

[0022] El trastorno inflamatorio se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, hepatitis crónica, neumonía, asma crónica y bronquitis.

Breve descripción de los dibujos**[0023]**

La figura 1 muestra una comparación entre los polipéptidos codificados por el antígeno A33 (SEC. ID NO: 6), el DNA40628 (SEC. ID NO: 1), el DNA45416 (SEC. ID NO: 2), el DNA35638 (SEC. ID NO: 9) y JAM (SEC. ID NO: 10).

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos derivada (SEC. ID NO: 1) de un polipéptido PRO301 de secuencia nativa. Este polipéptido tiene 299 aminoácidos de largo, teniendo una secuencia señal en el residuo 1 a 27, un dominio extracelular en el residuo 28 a aproximadamente 235, homología con la superfamilia de Ig en el residuo 94 a 235, un potencial dominio transmembrana en el residuo 236 a aproximadamente 258 y un dominio intracelular en aproximadamente el residuo 259 a 299.

La figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO. 2) derivada de los nucleótidos 119-1081 de la secuencia de nucleótidos mostrada en las figuras 6A y 6B (DNA45416, SEC ID NO. 7). También se muestra en la figura 3 con líneas subrayadas las localizaciones de un sitio de glicosaminoglicano y un dominio transmembrana.

La figura 4A muestra el montaje de consenso DNA35936 (SEC ID NO. 3), y la figura 4B muestra consen01 (SEC ID NO. 4), que se utilizaron en el aislamiento de DNA40628 (SEC ID No: 11). La figura 4C muestra consen02 (DNA42257) (SEC ID NO. 5) que se utilizó en el aislamiento de DNA45416 (SEC ID NO. 7).

La figura 5 muestra la secuencia de nucleótidos de un ADNc de DNA40628 de secuencia nativa (SEC ID No. 11), que es un ADNc de PRO301 de secuencia nativa, también denominado como "UNQ264" y/o "DNA40628-1216".

La figuras 6A y B muestran una secuencia de nucleótidos DNA45416 (SEC ID NO. 7) que es un ADNc de PR0362 de secuencia nativa, también denominado como "UNQ317" y/o "DNA45416-1251". También se observa la metionina iniciadora y la traducción de la proteína para un polipéptido PR0362 de longitud completa (SEC ID NO. 2).

5 La figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID NO. 8) de un ADNc de PRO245 de secuencia nativa, donde la secuencia de nucleótidos se designa como "UNQ219" y/o "DNA35638".

La figura 8 muestra las secuencias de oligonucleótidos OLI2162 (35936.f1) (SEC ID NO. 12), OLI2163 (35936.pl) (SEC ID NO. 13), OLI2164 (35936.f2) (SEC ID NO. 14), OLI2165 (35936.r1) (SEC ID NO. 15), OLI2166 (35936.f3) (SEC ID NO. 16), OLI2167 (35936.r2) (SEC ID NO. 17), que se utilizaron en el aislamiento de DNA40628.

10 Las figuras 9A y B muestran una representación de doble cadena de DNA42257 (consen02) (SEC ID NO. 5) junto con las localizaciones de cinco cebadores oligonucleótidos, mostrados subrayados, todos utilizados en el aislamiento de DNA45416 (SEC ID NO. 7). Los oligonucleótidos representados son: 42257.f1 (SEC ID NO. 18), 42257.f2 (SEC ID NO. 19), 42257.r1 (SEC ID NO. 20), 42257.r2 (SEC ID NO. 21) y 42257.p1 (SEC ID NO. 22).

15 Las figuras 10A y B describen la puntuación, emparejamiento y porcentaje de homología en la alineación con Blast entre 2 fragmentos solapantes de DNA40628 y A33_HUMAN, un precursor del antígeno A33 humano. La figura 10A compara los residuos codificados 24 a 283 de DNA40628 (SEC ID NO. 23) con los residuos codificados 17 a 284 de A33_HUMAN (SEC ID NO. 24); la figura 10B compara los residuos codificados 21 a 239 de DNA40628 (SEC ID NO. 25) con los residuos codificados 12 a 284 de A33_HUMAN (SEC ID NO. 26), respectivamente.

20 La figura 11 muestra la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido PRO245 de secuencia nativa (SEC ID NO. 9) codificado por la secuencia de nucleótidos de la figura 7 (DNA35638, SEC ID NO. 8). Este polipéptido tiene 312 aminoácidos de longitud, teniendo la secuencia señal en el residuo 1 a 28 y un potencial dominio transmembrana en aproximadamente el residuo 237 hasta aproximadamente 259.

25 La figura 12 indica una identidad del 25,3% entre la secuencia de aminoácidos codificada por DNA40628 (SEC ID NO. 1) y el antígeno A33 (SEC ID NO. 6).

30 La figura 13 indica una identidad del 20,8% entre la secuencia de aminoácidos codificada por DNA45416 (SEC ID NO. 2) y el antígeno A33 (SEC ID NO. 6).

35 La figura 14 indica una identidad del 24,3% entre la secuencia de aminoácidos codificada por DNA35638 (SEC ID NO. 9) y el antígeno A33 (SEC ID NO. 6).

La figura 15 indica una identidad del 67,6% entre la secuencia de aminoácidos codificada por DNA40628 (SEC ID NO. 1) y JAM (SEC ID NO. 10).

40 La figura 16 indica una identidad del 23,3% entre la secuencia de aminoácidos codificada por DNA45416 (SEC ID NO. 2) y JAM (SEC ID NO. 10).

45 La figura 17 indica una identidad del 34,2% entre la secuencia de aminoácidos codificada por DNA35638 (SEC ID NO. 9) y JAM (SEC ID NO. 10).

La figura 18 indica una identidad del 26% entre la secuencia de aminoácidos codificada por el antígeno A33 (SEC ID NO. 6) y JAM (SEC ID NO. 10).

50 La figura 19 muestra los resultados del procedimiento de hibridación de transferencia de puntos descrito en el ejemplo 8.

La figura 20 muestra los resultados del ensayo de expresión del ARNm de Taqman descrito en el Ejemplo 9.

55 La figura 21 muestra la unión de la proteína codificada por DNA40628 a neutrófilos humanos tal como se describe en el ejemplo 7.

60 La figura 22 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 31) de PRO1868 con ▼ representando un supuesto sitio de separación por señal, • representando cisteínas extracelulares conservadas, el dominio transmembrana subrayado y las líneas de puntos por encima representando los potenciales sitios de N-glicosilación. Este polipéptido tiene 310 aminoácidos de longitud, teniendo la secuencia señal en el residuo 1 a 30 y un potencial dominio transmembrana en aproximadamente el residuo 242 a aproximadamente 266.

- La figura 23 muestra la hibridación in situ de PR0362 en secciones congeladas de hígado de ratón.
- La figura 24 muestra la hibridación in situ de PR0362 en secciones congeladas de hígado humano.
- 5 La figura 25 muestra la hibridación in situ de PR0362 en macrófagos alveolares activados y células de Kupffer.
- La figura 26 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR0362 en células de Hofbauer de placenta.
- La figura 27 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR0362 en células sinoviales de tipo A.
- 10 La figura 28 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR03 62 en células de microglia de cerebro.
- La figura 29 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR0362 en células de tejido asmático humano.
- 15 La figura 30 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR0362 en células de tejido de hepatitis crónica humana.
- La figura 31 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR0245 en células de vénulas de endotelio alto (HEV) de nódulo linfático y amígdala de tejido humano normal.
- 20 La figura 32 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR0245 en endotelio arteriolar de tejido de pulmón humano inflamado y normal, así como en túbulos seminíferos normales de testículos en células espermatogénicas.
- La figura 33 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR0245 en tejido de carcinoma testicular, de pulmón y mamario humano.
- 25 La figura 34 muestra la hibridación in situ de ARNm de PR0245: en tejido de carcinoma de mama humano.
- La figura 35 muestra el análisis inmunohistoquímico de PR0362 en macrófagos.
- 30 La figura 36 muestra el análisis inmunohistoquímico de PR0362 en células de Kupffer.
- La figura 37 muestra el análisis inmunohistoquímico de PR0362 en células microgliales.
- La figura 38 muestra el análisis inmunohistoquímico de PR0362 en células Hofbauer.
- 35 La figura 39 muestra análisis SDS-PAGE de ARNm de PRO1868 detectado mediante PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) en líneas de células T J45 y Molt4, y líneas de células B JY, RPMI8866 y RAMOS.
- La figura 40 muestra un esquema que resume la unión de PRO245 por células T citolíticas, células NK-T, y células NK.
- 40 La figura 41 muestra los resultados por citometría de flujo de la unión entre células NK (CD56+) y la proteína de fusión PRO245-Fc.
- 45 La figura 42 muestra los resultados por citometría de flujo de unión entre células dendríticas de sangre periférica (PBDCs) y la proteína de fusión PRO245-Fc.
- La figura 43 muestra un gráfico que representa resultados por citometría de flujo de la unión entre células T J45 y la proteína de fusión PRO245-Fc.
- 50 La figura 44 muestra los resultados por citometría de flujo de la unión entre células T J45 y la proteína de fusión PRO245-Fc.
- La figura 45 muestra un gráfico de los resultados por citometría de flujo que demuestra la capacidad del PRO1868 etiquetado con His en exceso de bloquear la adherencia de células J45 a la proteína de fusión PRO245-Fc.
- 55 La figura 46 muestra los resultados por citometría de flujo de la capacidad de PRO1868 etiquetado con His de bloquear la proteína de fusión PRO245-Fc a células NK (CD56+).
- 60 La figura 47 muestra un gráfico que representa el porcentaje de adhesión de células J45 marcadas a pocillos recubiertos con concentraciones variantes de PRO245.

La figura 48 muestra la inmunoprecipitación de células J45 biotiniladas en una matriz de proteína A de fusión PRO245-Fc reticulada a Fc.

La figura 49 muestra la inmunoprecipitación de PRO1868 de células J45 y PBMC utilizando matrices de proteína A reticuladas a la fusión PRO245-Fc.

La figura 50 muestra un gráfico que representa la unión de PRO245 biotinilado a pocillos recubiertos con PRO1868.

La figura 51 muestra un gráfico que representa la unión de PRO1868 biotinilado a pocillos recubiertos con PRO245-Fc.

La figura 52 muestra los datos que representan la inhibición de la adhesión de células J45 a la proteína de fusión PRO245-Fc por anticuerpos anti-PRO1868. Los datos son representativos de tres experimentos independientes; las barras de errores representan la SD en una condición de n=6.

La figura 53 muestra los resultados por citometría de flujo que indican la capacidad de proteína PRO1868 etiquetada con 6 His para competir con la unión entre las células NK CD56+ y la proteína de fusión PRO245-Fc.

La figura 54 muestra la unión de PRO1868 a células CHO que expresan PRO245 bajo diversas condiciones.

La figura 55 muestra la unión específica de anticuerpos anti-PRO1868 a células CHO que expresan PRO245 (CuL8r).

La figura 56 muestra la secuencia de aminoácidos de STIgMA humano (hSTIgMA; SEC ID NO: 32) y STIgMA humano corto (hSTIgMA corto; SEC ID NO: 33) y la alineación con STIgMA murino (SEC ID NO: 34). Se muestran la secuencia líder hidrofóbica, la región transmembrana y los potenciales sitios de glicosilación unidos a N. Se indican los límites de los dominios de Ig deducidos de los límites de exón-intrón del gen de STIgMA humano.

Figura 57. El análisis de transferencia Northern que muestra la expresión de STIgMA humano en placenta, pulmón, corazón, hígado y glándulas adrenales (A). Estaban presentes dos transcritos de 1,5 y 1,8 kb en los tejidos humanos que expresan STIgMA.

La figura 58. (A) Análisis PCR TAQMAN™ que muestra una expresión incrementada de STIgMA humano en las líneas de células mielomonocíticas HL60 y THP-1 y en macrófagos diferenciados. Se hallaron niveles de expresión bajos en células T Jurkat, líneas de células B MOLT3, MOLT4 y RAMOS. (B) Expresión incrementada de ARNm de STIgMa durante la diferenciación de monocitos in vitro. Los monocitos aislados de sangre periférica humana se diferenciaron mediante la adhesión a plástico durante un periodo de 7 días. El ARN total se extrajo a diferentes puntos de tiempo durante la diferenciación. (C) Expresión incrementada de la proteína STIgMA durante la diferenciación de monocito a macrófago. Los monocitos se trataron tal como se indica en (B), los lisados de las células completas se desarrollaron en un gel y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con un anticuerpo policlonal (4F7) a STIgMA humano. El anticuerpo policlonal reconoció una banda de 48 y 38 kDa que representaban posiblemente la forma larga y la forma corta de STIgMA.

Figura 59. Caracterización molecular de la proteína huSTIgMA en líneas celulares: (A) Se expresó HuSTIgMA-gd de manera transitoria en células 293E, se inmunoprecipitó con anti gd y los "blots" se incubaron con anti gd o un anticuerpo policlonal al dominio extracelular de STIgMA. (B) La huSTIgMA expresada en células 293 es una proteína N-glicosilada monomérica. STIgMA se fosforila en la tirosina tras el tratamiento de células HEK293 con pervanadato de sodio, pero no recluta la Syk quinasa. La STIgMA fosforilada migraba a una masa molecular ligeramente más elevada en comparación con STIgMA no fosforilada.

Figura 60. Expresión selectiva de STIgMA en macrófagos derivados de monocitos humanos. Se tiñeron células mononucleares de sangre periférica con anticuerpos específicos para células B, T, NK, monocitos y con un anticuerpo monoclonal (3C9) conjugado a ALEXA™ A488 para STIgMA. No hubo expresión en todos los leucocitos de sangre periférica, así como en células dendríticas derivadas de monocitos, pero se expresó en macrófagos diferenciados in vitro.

Figura 61. Se incrementó el ARNm y la proteína de STIgMA por IL-10 y dexametasona. (A) La PCR a tiempo real muestra un aumento de la expresión de ARNm de STIgMA después del tratamiento con IL-10, TGFbeta y se indujo de manera muy intensa por dexametasona, pero se reguló por descenso mediante el tratamiento con LPS, IFNγ, y TNFα. (B) Las células mononucleares de sangre periférica separada con Ficoll se trataron con varias citoquinas y dexametasona durante 5 días y se tiñeron por duplicado con anti CD14 y anti STIgMA. El análisis de flujo mostró un

incremento brusco en la expresión de STIgMA en la superficie de monocitos tratados con dexametasona y después del tratamiento con IL-10 y LPS.

5 Figura 62. Localización subcelular de STIgMA en macrófagos derivados de monocitos. Los monocitos se cultivaron durante 7 días en un medio de diferenciación de macrófagos, se fijaron en acetona y se tiñeron con anticuerpo policlonal anti STIgMA 6F1 o CD63 y FITC secundario de cabra anti-ratón. Las células se estudiaron en un microscopio confocal. El STIgMA se halla en el citoplasma donde se colocaliza con la proteína de membrana lisosomal CD63. STIgMA también se expresó en los extremos trasero y delantero de los macrófagos en un patrón similar al de F-actina. Escala =10 m.

10 Figura 63. Localización de ARNm de STIgMA en enfermedades inflamatorias crónicas. La hibridación in situ mostró la presencia de ARNm de STIgMA en macrófagos alveolares obtenidos de tejido de un paciente con neumonía (a, B) o un paciente con asma crónica (C, D). El ARNm de STIgMa también se expresó en células Kupffer de hígado en tejido obtenido de una biopsia de hígado de un paciente con hepatitis crónica (E, F).

15 Figura 64. La expresión de ARNm de STIgMA se incrementó en sinovia inflamada. El ARNm de STIgMA era bajo o inexistente en membranas sinoviales de una articulación obtenida de la sustitución de la rodilla de un paciente sin inflamación en las articulaciones (A, C), pero se expresó de manera muy intensa en células, potencialmente sinoviocitos o macrófagos sinoviales, en el pannus de un paciente con osteoartritis (B, D).

20 Figura 65. Detección de proteína STIgMA con anticuerpo policlonal 6F1 en células que recubren la sinovia de un paciente con enfermedad degenerativa en las articulaciones (A, B, C). No se observó detección inmunohistoquímica de STIgMA en una sinovia de control (D).

25 Figura 66. Se expresó la proteína STIgMA en un subtipo de macrófagos residentes en el tejido y su expresión se aumentó en enfermedades inflamatorias crónicas. (A) STIgMA se expresó en la membrana de células CHO que expresan de manera estable STIgMA. Se encontró una expresión elevada de la proteína STIgMA en macrófagos alveolares (B) en tejidos obtenidos de un paciente con asma crónica. (C) Expresión de STIgMA en histiocitos del intestino delgado humano. La sección se obtuvo de tejido extraído quirúrgicamente y podría contener un neoplasma. (D) Expresión de la proteína STIgMA en células Hofbauer en placenta humana antes del nacimiento. Se observó una expresión elevada en glándula adrena (E) de proteína STIgMa en macrófagos y en células Kupffer de hígado humano (F). La tinción se realizó en secciones fijadas con acetona de 5 µm de grosor utilizando DAB como cromógeno. Las imágenes se fotografiaron a 20 y 40 aumentos.

35 Figura 67. Tinción inmunohistoquímica de CD68 y STIgMA en una placa vascular obtenida de un paciente con aterosclerosis. Las secciones consecutivas se fijaron y tiñeron con un anticuerpo monoclonal para CD68 humano (A,B) y un anticuerpo policlonal 6F1 desarrollado contra STIgMA humana (C,D). La proteína STIgMA apareció en una población de macrófagos y células de espuma presentes en la placa aterosclerótica y se solapaba con macrófagos positivos en CD68, según se observa a partir de la tinción en secciones consecutivas: Aumentos: 10x (A,C) y 20X (B,D).

40 Figura 68. Cotinción de STIgMA y CD68 en macrófagos intersticiales de corazón. Se obtuvieron secciones de 5 µm de un corazón humano (autopsia) y se tiñeron con un anticuerpo monoclonal para STIgMA (3C9) y un anticuerpo secundario marcado con FITC anti-ratón. Se detectó CD68 mediante la tinción de un anticuerpo monoclonal marcado con PE para CD68. Aumentos: 20X

45 Figura 69. El ARNm de STIgMA aumentó significativamente en tejido de colon obtenido de pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad pulmonar oclusiva crónica (COPD) y asma. Se realizó una PCR a tiempo real en ARN extraído de varios tejidos. El ARNm para STIgMA aumentó significativamente en tejidos obtenidos de pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y COPD. Se realizó un análisis estadístico utilizando la prueba U de Mann-Whitney.

50 Figura 70. Las células que expresan STIgMa humano mostraron una mayor adherencia a células endoteliales humanas. (A) STIgMa se expresó de manera estable en una línea de células T Jurkat humanas. (B) Las células se precargaron con el colorante fluorescente BCECF (Molecular Probes, Oregon) y se añadieron a una placa de 96 pocillos recubierta con una monocapa de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratada con o sin 10 ng/ml de TNFα. Después de 3 lavados, se contó la fluorescencia en un espectrofluorómetro que indicaba el número de células que permanecían adherentes a las células HUVEC. El gráfico era representativo de 4 experimentos independientes.

60 Figura 71. Inhibición de la progresión de un modelo de ratón con artritis inducida por colágeno (CIA) mediante la

proteína de fusión IgG muSTIgMA-Fc. A un grupo de ratones (CIA) n =7 se les administraron 100 µg de proteína de fusión IgG muSTIgMA-Fc (cuadrados), mientras que un grupo de control de ratones CIA (n = 8) recibió 100 µg de IgG1 murina (círculos), 3 veces por semana durante 6 semanas. Los ratones se examinaron diariamente por los signos de inflamación y se valoraron en una escala de 0-16 (detalles en el ejemplo 25) y los resultados se representaron gráficamente (media ± SD, test T de Student valor p = 0,0004 para IgG1 de control vs. La proteína muSTIgMa de prueba).

Descripción detallada de la realización preferida

I. Definiciones

[0024] Los términos "PR0301", "PR0362", "PR0245", "PRO1868" o "polipéptido PR0301", "polipéptido PR0362", "polipéptido PR0245", "PRO1868" y "antígeno asociado al cáncer" cuando se utilizan en la presente invención comprenden PRO301, PR0362, PRO245, o PRO1868 de secuencia nativa y a las variantes de los mismos (que más adelante también se definen en la presente). Además, los términos "PRO301" y "JAM-1" se utilizan indistintamente como los términos "PR0362", "JAM4", "STIGMA," y "STIg-MA". Además, los términos "PR0245", "JAM-IT" y "JAM-2" se utilizan indistintamente como los términos "PRO1868", "SHATR" y "JAM-3". Los polipéptidos PRO301, PR0362, PR0245 o PRO1868 pueden aislarse a partir de una serie de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de alguna otra fuente, o prepararse mediante procedimientos de recombinación o sintéticos. Tal como se indica, las designaciones indicadas se utilizan para referirse a las respectivas moléculas de secuencia nativa y sus variantes.

[0025] De este modo, por ejemplo, STIgMa incluye un polipéptido que comprende los aminoácidos 1 a 321 de SEC ID No. 2; los aminoácidos 1 a X de SEC ID NO: 2 (donde X es cualquiera de los aminoácidos 271 a 280); aminoácidos 21 a 321 de SEC ID NO: 2; aminoácidos 21 a X de SEC ID NO: 2 (donde X es cualquiera de los aminoácidos 271 a 280); aminoácidos 1 a 399 de SEC ID NO: 32; aminoácidos 21 a 399 de SEC ID NO: 32; aminoácidos 1 a 305 de SEC ID NO: 33; aminoácidos 21 a 305 de SEC ID NO: 33; aminoácidos 1 a 280 de SEC ID NO: 34; aminoácidos 21 a 280 de SEC ID NO: 34; los dominios extracelulares y variantes en que parte o todo el dominio transmembrana se ha eliminado o inactivado.

[0026] Los términos "enfermedad inflamatoria" y "trastorno inflamatorio" se utilizan indistintamente y significan una enfermedad o trastorno en los que un componente del sistema inmune de un mamífero causa, media o de algún otro modo contribuye a una respuesta inflamatoria que contribuye a la morbilidad del mamífero. También se incluyen enfermedades en las que la reducción de la respuesta inflamatoria tiene un efecto de mejora en la progresión de la enfermedad. Las enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmune, incluyendo enfermedades autoinmunes, se incluyen dentro de este término.

[0027] El término enfermedad "mediada por células T" significa una enfermedad en la cual las células T directa o indirectamente median o de algún otro modo contribuyen a la morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por células T puede estar asociada con efectos mediados por la célula, efectos mediados por linfocinas, etc. e incluso los efectos asociados con las células B, si las células B se estimulan, por ejemplo, mediante linfocinas secretadas por las células T.

[0028] Entre los ejemplos de enfermedades inflamatorias y relacionadas con el sistema inmune, algunas de las cuales están mediadas por células T, se incluyen, sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjörgen, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna) trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática, enfermedades hepato biliares tales como las hepatitis infecciosas (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis crónica activa autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y conlangitis esclerosante, enfermedades inflamatorias y fibróticas del pulmón (por ejemplo, fibrosis quística), enteropatía sensible al gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune, incluyendo las enfermedades de piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas del pulmón, tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes incluido el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped.

[0029] "Tumor", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células

neoplásicas, ya sea maligno o benigno, y a todos los tejidos y células pre-cancerosos.

[0030] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero sin limitación, el carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma y la leucemia. Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen el cáncer de mama, el cáncer de próstata, el cáncer de colon, el cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer colorrectal, el carcinoma endométrico, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón, el cáncer de hígado, el cáncer de vulva, el cáncer tiroideo, el carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0031] "Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de evitar el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Entre los necesitados del tratamiento se incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que se previene la enfermedad. En el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmune, un agente terapéutico puede alterar directamente la magnitud de la respuesta de un componente de la respuesta inmune, o hacer la enfermedad más susceptible al tratamiento con otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, antimicóticos, agentes antiinflamatorios, quimioterapéuticos, etc.

[0032] La "patología" de una enfermedad relacionada con el sistema inmune incluye todo fenómeno que compromete el bienestar del paciente. Esto incluye, sin limitación, el crecimiento celular anormal o incontrolable (células neutrofilicas, eosinofílicas, monocíticas, linfocíticas), la producción de anticuerpos, la auto-producción de anticuerpos, la producción de complemento, la interferencia con el funcionamiento normal de las células vecinas, la liberación a niveles anormales de citoquinas u otros productos de secreción, la supresión o el empeoramiento de cualquier respuesta inflamatoria o inmunológica, la infiltración de células inflamatorias (neutrofilicas, eosinofílicas, monocíticas, linfocíticas) en los espacios celulares, etc.

[0033] El término "mamífero" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoológico, de eventos deportivos, o de compañía, tales como caballos, cerdos, ganado, perros, gatos y hurones, etc. En una realización preferente de la presente invención, el mamífero es un humano.

[0034] La administración "combinada con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administraciones simultáneas (concurrente) y consecutivas en cualquier orden.

[0035] El término "agente citotóxico" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a una sustancia que inhibe o impide la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo I^{131} , I^{125} , Y^{90} y Re^{186}), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, micótico, vegetal o animal o fragmentos de las mismas.

[0036] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen la adriamicina, la doxorubicina, la epirubicina, el 5-fluorouracilo, el arabinósido de citosina ("Ara-C"), la ciclofosfamida, el tiotepa, el busulfano, la citoxina, los taxoides, por ejemplo el paclitaxel (Taxol[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y el doxetaxel (Taxotere[®], Rhône-Poulenc Roher, Antony, Francia), el toxotere, el metotrexato, el cisplatino, el malfalán, la vinblastina, la bleomicina, el etopósido, la ifosfamida, la mitomicina C., la mitoxantrona, la vincristina (Louvristina), la vinorelbina, el carboplatino, el tenipósido, la daunomicina, la carminomicina, la aminopterina, la dactinomicina, las mitomicinas, las esperamicinas (ver Patente de Estados Unidos N° 4.675.187), el melfalán, y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición los agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores, tales como el tamoxifeno y la onapristona.

[0037] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente células cancerígenas que expresan o sobreexpresan cualquiera de los genes identificados en la presente invención, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de las células que expresan o sobreexpresan dichos genes en fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los alcaloides vinca (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores topo II como por ejemplo doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G I también afectan la interrupción de la fase

S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como por ejemplo tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Chapter 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: filadelfia, 1995), especialmente la página 13.

[0038] El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúa sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas de polipéptidos tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteínica (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF- α o TNF- β , y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0039] "Cantidad terapéuticamente efectiva" es la cantidad de antagonista o agonista de PR0301, PR0362, PRO245 o PRO1868 activos que se requiere para conseguir una inhibición o estimulación medible, según sea el caso, de la respuesta inflamatoria.

[0040] Una "PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868, respectivamente, derivado de la naturaleza. Dicho PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante medios recombinantes o sintéticos. Los términos "PRO301 de secuencia nativa", "PRO362 de secuencia nativa", "PRO245 de secuencia nativa", y "PRO1868 de secuencia nativa" comprenden específicamente formas naturales truncadas o secretadas de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868, respectivamente, (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de ajuste alternativas) y variantes alélicas naturales de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868, respectivamente.

[0041] En otra realización, el polipéptido STIgMA de secuencia nativa es un PRO362 de secuencia nativa madura o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 321 de la figura 3 (SEC ID NO: 2), con o sin una secuencia señal N-terminal, con o sin la metionina de iniciación en la posición 1, con o sin alguno o todos los potenciales dominios transmembrana, en aproximadamente las posiciones 276-306, y con o sin el dominio intracelular en aproximadamente las posiciones 307 a 321. En una realización adicional, el polipéptido STIgMa de secuencia nativa es un polipéptido maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 399 de SEC ID NO: 32 (huSTIgMA), con o sin una secuencia señal N-terminal, con o sin la metionina de iniciación en la posición 1, y con o sin alguno o todos los dominios transmembrana en aproximadamente las posiciones 277 a 300. En otra realización adicional, el polipéptido STIgMa de secuencia nativa es un polipéptido maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 305 de SEC ID NO: 33 (huSTIgMA short), con o sin una secuencia señal N-terminal, con o sin la metionina de iniciación en la posición 1, y con o sin alguno o todos los dominios transmembrana en aproximadamente las posiciones 187 a 206. En una realización diferente, el polipéptido STIgMa de secuencia nativa es un polipéptido maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 280 de SEC ID NO: 34 (muSTIgMA), con o sin una secuencia señal N-terminal, con o sin la metionina de iniciación en la posición 1, y con o sin alguno o todos los dominios transmembrana en aproximadamente las posiciones 181 a 204.

[0042] El "dominio extracelular de PR0301, PR0362 (STIgMA), PRO245 o PRO1868" o "ECD de PR0301, PR0362, PRO245 o PRO1868" se refiere a una forma del polipéptido PR0301, PR0362 (STIgMA), PRO245 o PRO1868, respectivamente, que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplasmático de las respectivas moléculas de longitud completa. Normalmente, ECD de PR0301, ECD de PR0362 (STIgMA), ECD de PRO245 o ECD de PRO1868 tendrá menos de un 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmáticos y preferiblemente, tendrá menos de un 0,5% de dichos dominios.

[0043] Opcionalmente, el ECD del polipéptido PR0362 (STIgMA) comprenderá los residuos de aminoácidos 1 o

aproximadamente 21 a X de la figura 3 (SEC ID NO: 2), o SEC ID NO: 32, donde X es cualquier aminoácido de aproximadamente 271 a 281, o los residuos de aminoácidos 1 o aproximadamente 21 a X de SEC ID NO: 33, donde X es cualquier aminoácido de aproximadamente 178 a 186, o los residuos de aminoácidos 1 o aproximadamente 21 a X de SEC ID NO: 34, donde X es cualquier aminoácido desde aproximadamente 176 a 184 de SEC ID NO: 34.

[0044] Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos PRO301, PR0362 (STIgMA), PR0245 o PRO1868 de la presente invención se identifica según el criterio utilizado habitualmente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero muy probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del dominio tal como se identifica inicialmente.

[0045]] “Variante de PRO362” significa un polipéptido PRO362 activo tal como se define posteriormente que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido PRO362, con o sin su secuencia señal nativa, con o sin la metionina de iniciación, con o sin el potencial dominio transmembrana y con o sin el dominio intracelular, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a). En una realización particular, la variante de PRO362 tiene por lo menos aproximadamente un 80% de homología en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido PRO362 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la figura 3 (SEC ID No: 2) para un polipéptido PRO362 de secuencia nativa de longitud completa. Dichas variantes de polipéptido PRO362 incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO362 en los que se añaden o eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de la figura 3 (SEC ID NO: 2). Normalmente, una variante de polipéptido PRO362 tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos e incluso más preferiblemente por los menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la figura 3 (SEC ID NO: 2). Preferiblemente, el mayor grado de identidad en la secuencia tiene lugar en los dominios extracelulares (aminoácidos 1 a X de la figura 3, SEC ID NO: 2, donde X es cualquier residuo de aminoácido de 271 a 281).

[0046] Una "variante de STIgMA" incluye específicamente las variantes de PRO362 definidas anteriormente, junto con las variantes de SEC ID Nos: 32, 33 y 34. En particular, las variantes de STIgMA incluyen específicamente un polipéptido STIgMA activo tal como se define posteriormente que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido o SEC ID No: 32, 33 ó 34, con o sin su secuencia señal nativa, con o sin la metionina de iniciación, con o sin todo o parte del potencial dominio transmembrana y con o sin el dominio intracelular, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a). En una realización particular, la variante de STIgMA tiene por lo menos aproximadamente un 80% de homología en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido STIgMA que tiene la secuencia de aminoácidos deducida de SEC ID No: 32, 33 ó 34. Dichas variantes de STIgMA incluyen, por ejemplo, polipéptidos STIgMA en los que se añaden o eliminan uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de SEC ID NO: 32, 33 y 34. Normalmente, una variante de polipéptido STIgMA tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, preferiblemente por lo menos aproximadamente un 85% de identidad en la secuencia de aminoácidos, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos e incluso más preferiblemente por los menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 32, 33 ó 34. Preferiblemente, el mayor grado de identidad en la secuencia tiene lugar en los dominios extracelulares

[0047] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias de PR0301, PR0362 (STIgMA), PR0245 o PRO1868 identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de PR0301, PR0362 (STIgMA), PR0245 o PRO1868, respectivamente, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[0048] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias que codifican PR0301, PR0362 (STIgMA), PR0245 o PRO1868 identificadas en la presente invención (por ejemplo, DNA40628, DNA45416, DNA35638, DNA77624) se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia que codifica PR0301, PR0362 (STIgMA), PR0245 o

PRO1868, respectivamente, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan.

[0049] Una molécula de ácido nucleico “aislada” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en el medio natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o disposición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se distinguen de la molécula de ácido nucleico tal como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye moléculas de ácido nucleico contenidas en células que normalmente expresan un polipéptido codificado, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0050] Una molécula de ácido nucleico “aislada” que codifica el polipéptido PR0301, PRO362(STIgMA), PR0245 o PRO1868 es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está normalmente asociada en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido PR0301, PRO362(STIgMA), PR0245 o PRO1868. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido PR0301, PRO362(STIgMA), PR0245 o PRO1868 está en una forma o disposición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican el polipéptido PR0301, PRO362, PR0245 o PRO1868 se distinguen de las moléculas de ácido nucleico DNA40628, DNA45416, DNA35638 o DNA77624 tal como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el polipéptido PR0301, PRO362, PR0245 o PRO1868 incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido PR0301, PRO362, PR0245 o PRO1868 contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido PR0301, PRO362, PR0245 o PRO1868, cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0051] El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0052] Un ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

[0053] El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-PR0301, anti-PRO362 (anti-STIgMA), anti-PRO245 o anti-PRO1868 individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas, y neutralizantes) y composiciones de anticuerpos anti-PR0301, anti-PRO362, anti-PRO245 o anti-PRO1868 con especificidad poliepitópica. El término “anticuerpo monoclonal”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades.

[0054] La “astringencia” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología

deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0055] “Condiciones astringentes” o “condiciones de astringencia elevada”, tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido de un lavado de astringencia elevada que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0056] Las “condiciones moderadamente astringentes” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

[0057] El término “epítipo etiquetado” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido de la presente invención fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de manera que no interfiera en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0058] “Activo” o “actividad” en el contexto de variantes del polipéptido de la presente invención se refiere a forma o formas de proteínas de la presente invención que retienen las actividades biológica y/o inmunológica de un polipéptido nativo o natural de la presente invención.

[0059] “Actividad biológica” en el contexto de un anticuerpo, polipéptido u otra molécula que se puede identificar mediante los ensayos de cribado descritos en la presente invención (por ejemplo, una molécula pequeña orgánica o inorgánica, péptido, etc.) se refiere a la capacidad de dichas moléculas de alterar la infiltración de células inflamatorias en un tejido, de alterar la proliferación de células T y de alterar la liberación de linfoquinas por las células. Otra actividad preferida es afectar en la permeabilidad vascular.

[0060]] El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido nativo descrito en la presente invención. De forma similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que mimetiza o estimula una actividad biológica de un polipéptido nativo descrito en la presente invención. Entre las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas se incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos nativos de la presente invención, péptidos, pequeñas moléculas orgánicas, etc., agonistas o antagonistas.

[0061] Una “molécula pequeña” se define en la presente invención como una molécula que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 600 daltons.

[0062] “Anticuerpos” (Abs) e “inmunoglobulinas” (Igs) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Mientras los anticuerpos muestran especificidad de unión a un antígeno específico, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de la especificidad de antígeno. Los polipéptidos del último tipo se producen, por ejemplo, a niveles bajos por el sistema

linfático y a niveles elevados por mielomas. El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre especialmente, sin limitación, anticuerpos monoclonales intactos, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada.

5
 [0063] “Anticuerpos nativos” e “inmunoglobulinas nativas” son glicoproteínas habitualmente heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestos de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, mientras que el número de uniones disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuros entre cadenas espaciados de forma regular. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de un conjunto de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante (V_H) en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que hay residuos de aminoácidos concretos que forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y pesada.

10
 [0064] El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de dominios variables se denominan estructura (“framework”) (FR). Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres CDRs, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las CDRs en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Rabat et al., *NIH Publ. No.* 91-3142, Vol. 1, páginas 647-669 (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

20
 [0065] El término “fragmentos de anticuerpo” comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o la región variable del anticuerpo intacto. Algunos ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al., *Protein Eng.*, 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

25
 [0066] La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos “Fab”, cada uno de los cuales posee un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento “Fc” residual. La designación “Fc” refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y que incluso es capaz de reticular con el antígeno.

30
 [0067] “Fv” es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión a antígeno. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. Es en esta configuración que las tres CDRs de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L . Colectivamente, las seis CDRs confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDRs específicas para antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión completo.

35
 [0068] El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal del dominio de la cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región de la bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente invención para Fab' en el cual el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tiene cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

40
 [0069] Las “cadenas ligeras” de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie vertebrada pueden asignarse a uno entre dos tipos claramente diferentes, denominados kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de

aminoácidos de sus dominios constantes.

[0070] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM y varias de ellas pueden dividirse a su vez en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0071] El término “anticuerpo monoclonal” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que incluyen habitualmente diferentes anticuerpos dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, sin estar contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador “monoclonal” indica el carácter del anticuerpo por obtenerse a partir de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención, se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se puede fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también se pueden aislar de las bibliotecas de fagos-anticuerpos fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo. Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.750.373, 5.571.698, 5.403.484 y 5.223.409 que describen la preparación de anticuerpos utilizando fagémidos y vectores tipo fago.

[0072] Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

[0073] Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que varios o todos los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, ciertos residuos de la región de estructura (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana también se pueden sustituir por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o estructura importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y optimizar la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de, como mínimo, uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a aquellas de las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente, como mínimo, una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo “primatizado” en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido mediante la inmunización de monos macaco con el antígeno de interés. Los anticuerpos que contienen residuos de monos del Viejo Mundo también son posibles en la presente invención. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.658.570; 5.693.780; 5.681.722; 5.750.105 y 5.756.096.

[0074] Los fragmentos de anticuerpo “Fv de cadena única” o “sFv” comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido Fv

comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv ver Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

5 **[0075]** El término “diacuerpos” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de
 10 cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido ($V_H - V_L$). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0076] Un polipéptido “aislado”, incluyendo un anticuerpo aislado, es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son
 15 materiales que interferirían con las utilidades de diagnóstico o terapéuticas del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteínicos y no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta más de un 95% en peso del compuesto según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de
 20 secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El compuesto aislado, por ejemplo, anticuerpo u otro polipéptido, incluye el compuesto *in situ* en células recombinantes ya que por lo menos un componente del medio natural del compuesto no estará presente. Normalmente, sin embargo, el compuesto aislado se preparará mediante por lo
 25 menos una etapa de purificación.

[0077] La palabra “marcador” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al compuesto, por ejemplo, anticuerpo o polipéptido, para
 30 generar un compuesto “marcado”. El “marcador” puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

[0078] Por “fase sólida” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir el compuesto de la presente invención. Entre los ejemplos de fases sólidas que se engloban en la presente invención se incluyen las formadas
 35 parcial o totalmente de cristal (por ejemplo, cristal de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliácridamidas, poliestireno, polivinilalcohol y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la Patente de Estados Unidos No. 4.275.149.

[0079] Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como los anticuerpos anti-ErbB2 descritos en la presente invención y, opcionalmente, un agente quimioterapéutico) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen
 40 habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0080] Tal y como se utiliza en la presente invención, el término “inmuno adhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones
 45 efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es otra aparte del reconocimiento y sitio de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina habitualmente es una
 50 secuencia de aminoácidos contigua que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmuno adhesina se puede obtener a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

55 II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Preparación de los polipéptidos PRO362

60 1. Polipéptidos PRO362 de longitud completa

[0081] La presente descripción proporciona secuencias de nucleótidos aisladas que codifican polipéptidos a los que

se hace referencia en la presente solicitud como PRO362. En particular, los Solicitantes han identificado y aislado ADNc que codifica un polipéptido PRO362, tal y como se describe con mayor detalle en los Ejemplos siguientes. Utilizando los programas informáticos de alineación de secuencias BLAST y FastA, los solicitantes hallaron que PRO301 de secuencia nativa de longitud completa (figura 2, SEC ID No: 1), PRO362 (figura 3, SEC ID No: 3), PRO245 (figura 11, SEC ID No: 9) y PRO1868 (SEC ID No: 31) tienen una homología significativa tanto para el antígeno A33 como JAM. (Véase las figuras 1, 12-18). Por consiguiente, actualmente se cree que PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868 descritos en la presente solicitud son miembro recientemente identificados de la familia de proteínas del antígeno A33 y se pueden asociar con trastornos inflamatorios, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino, así como enfermedades neoplásicas humanas, tales como cáncer colorrectal.

2. Variantes de PRO262

[0082] Además del PRO362 de secuencia nativa de longitud completa descrita en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de PRO362. Las variantes de PRO362 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN de PRO362, respectivamente, o mediante la síntesis de los polipéptidos PRO362 deseados. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procedimientos post-traduccionales del PRO362, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la membrana.

[0083] Las variaciones en el PRO362 de secuencia nativa de longitud completa o en varios dominios del PRO362 descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones que codifican el PRO362 que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del PRO362 en comparación con el PRO362 de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del PRO362. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del PRO362 con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizadas en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando de forma sistemática inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad en el ensayo in vitro descrito en los Ejemplos siguientes.

[0084] Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para producir el ADN de variante de PRO245 se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter et al., *Nucl. Acids. Res.*, **13**: 4331 (1986); Zoller et al., *Nucl. Acids. Res.*, **10**: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells et al., *Gene*, **34** 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, **317**:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

[0085] El análisis de aminoácidos por rastreo también se puede utilizar para identificar uno o más aminoácidos que pueden variar a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido entre este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, *J. Mol. Biol.*, **150**:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

3. Modificaciones de PRO362

[0086] Las modificaciones covalentes de PRO362 están incluidas en el alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados del PRO362 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del PRO362. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular PRO362 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-PRO362, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados

habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

[0087] Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspártico, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

[0088] Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO362 incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en PRO362 de secuencia nativa y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el PRO362 de secuencia nativa y/o la alteración de la proporción y/o composición de los residuos azúcares unidos al sitio o sitios de glicosilación.

[0089] La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO362 se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina en el PRO362 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos de PRO362 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO362 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0090] Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el polipéptido PRO362 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, páginas 259-306 (1981).

[0091] La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido PRO362 se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación químicas son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, et. al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge, et al. *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato del polipéptido se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura et al. *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

[0092] Otro tipo de modificación covalente de PRO362 comprende la unión del polipéptido PRO362 a uno de un conjunto de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

[0093] El PRO362 de la presente invención también se puede modificar de manera que forme una molécula quimérica que comprenda PRO362 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del PRO362 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo terminal amino o carboxilo del PRO362. La presencia de dichas formas etiquetadas con epítipo del PRO362 se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo-etiqueta permite que el PRO362 se purifique fácilmente mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo-etiqueta. En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO362 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula IgG.

[0094] En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field et al., *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan et al., *Molecular and Cellular Biology*, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3 (6): 547-553 (1990)]. Entre otros polipéptidos etiqueta se incluyen el péptido-Flag [Hopp et al., *BioTechnology*, 6: 1204-1210

(1988)]; el péptido epítipo KT3 [Martin et al., *Science*, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítipo de α -tubulina [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266: 15163-15166 (1991)]; y el péptido-etiqueta de la proteína T7 del gen 10 [Lutz-Freyemuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6393-6397 (1990)].

5 4. Producción y aislamiento de PRO362

[0095] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de PRO362 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico de PRO362. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar PRO362. Por ejemplo, la secuencia de PRO362, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewan et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes del PRO362 de forma separada y se pueden combinar utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir PRO362 de longitud completa.

a. Aislamiento del ADN que codifica PRO362

[0096] El ADN que codifica PRO362 se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm de PRO362 y expresarlo a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN de PRO362 humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano, tal como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica PRO362 también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante síntesis de oligonucleótidos.

[0097] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como anticuerpos para PRO362 u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica PRO362 es utilizar la metodología de PCR [Sambrook et al., *supra*; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0098] Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca para que se minimicen los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ^{32}P , biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook et al., *supra*.

[0099] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear a otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en los bancos de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otros bancos de datos de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar a través de la alineación de secuencias utilizando programas de software informático, tales como BLAST, BLAST-2, ALIGN, DNASTar e INHERIT que utilizan varios algoritmos para medir la homología.

[0100] El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook et al., *supra*, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en el ADNc.

b. Selección y transformación de células huésped

[0101] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente para la producción de PRO362 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un técnico en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y

técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., *supra*.

5 **[0102]** Los procedimientos de transfección son conocidos por el técnico en la materia, por ejemplo, CaPO y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento de calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook et al., *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariontes u otras células que contienen barreras célula-pared sustanciales. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw et al., *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transformaciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en la levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., *J. Bact.*, 130: 946 (1977) y Hsiao et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policondones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown et al., *Methods in enzymology*, 185:527-537 (1990) y Manssur et al., *Nature*, 336: 348-352 (1988).

20 **[0103]** Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariontes, de levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariontes adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y K5772 (ATCC 53.635).

30 **[0104]** Además de los procariontes, los microbios eucariotas, tales como hongos o levaduras filamentosos, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican PRO362. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente.

35 **[0105]** Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO362 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles se incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Algunos ejemplos más específicos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO. Urlaub and Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); y tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se estima que está dentro de la técnica.

c. Selección y utilización de un vector replicable

45 **[0106]** El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica PRO362 se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un técnico en la materia.

55 **[0107]** El PRO362 se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de PRO362 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procarionte seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder

del factor alfa (incluyendo secuencias líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, el último descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como líderes virales secretores.

[0108] Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

[0109] Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0110] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico de PRO362, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo natural es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

[0111] Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos de PRO362 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales son conocidos. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariontes se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al., *Nature*, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, *Nucleic Acids Res.*, 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica PRO362.

[0112] Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.*, 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess et al., *J. Adv. Enzyme Reg.*, 7:149 (1968); holland, *Biochemistry*, 17:4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucoquinasa y glucoquinasa.

[0113] Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada mediante condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativos asociados con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen adicionalmente en EP 73.657.

[0114] La transcripción de PRO362 desde vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0115] Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el PRO362 por eucariotas superiores mediante

la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante de PRO362, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

[0116] Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADNs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica PRO362.

[0117] En Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de PRO362 en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

d. *Detección de la amplificación/expresión de los genes*

[0118] La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN, cadenas dobles de híbridos de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la doble cadena está unida a una superficie, de manera que tras la formación de cadenas dobles en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la cadena doble.

[0119] La expresión génica se puede medir, alternativamente, mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo de células o fluidos del organismo, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de ejemplo pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido PRO362 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de PRO362 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

e. *Purificación de polipéptido*

[0120] Las formas de PRO362 se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisatos de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Tritón X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión de PRO362 PRO326 se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como el ciclo congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar células.

[0121] Se puede desear purificar PRO362 de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefrosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo del PRO362.

[0122] Se pueden utilizar varios procedimientos de purificación de proteínas y dichos procedimientos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación

seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción utilizado y el PRO362 concreto producido.

f. *Detección de la interacción celular*

[0123] Para determinar si los polipéptidos de la invención son moléculas de tráfico o adhesión celular, se pueden realizar un conjunto de ensayos *in vitro*.

1) Análisis por citometría de flujo/FACS

[0124] Para examinar la interacción entre PRO362 con tipos de células específicos, se pueden generar proteínas de fusión de IgG humanas biotiniladas, tales como la fusión de PRO362-IgG humana. Las células que interactúan con las proteínas de fusión biotiniladas se pueden aislar utilizando perlas magnéticas conjugadas con estreptavidina. Las células que interactúan con las proteínas de fusión biotiniladas se pueden caracterizar y analizar posteriormente para la expresión de Ag CD de superficie mediante citometría de flujo y/o clasificación FACS. Las células examinadas por la interacción con la fusión de PRO362-IgG humana biotinilada pueden incluir, por ejemplo, células de sangre periférica, tales como células NK, células NK/T o células T citolíticas y más específicamente, células B purificadas, neutrófilos, monocitos o células dendríticas.

[0125] La inhibición de la interacción entre PRO362 con tipos de células específicos se puede caracterizar posteriormente mediante un análisis de la inhibición, específicamente la capacidad de los anticuerpos, tales como anti-PRO362, de inhibir dicha interacción celular.

2) Coinmunoprecipitación

[0126] Tras la identificación de células que interactúan con PRO362, se puede realizar un análisis posterior para identificar el receptor particular responsable de la interacción de PRO362.

2. Distribución del tejido

[0127] La localización de tejidos que expresan los polipéptidos de la presente invención se pueden identificar mediante la determinación, por ejemplo, de la expresión del ARNm o la expresión de proteína en varios tejidos humanos. La localización de dichos genes proporciona información sobre qué tejidos está probablemente afectados por las actividades estimuladoras e inhibitoras de los polipéptidos de la presente invención. La localización de un gen en un tejido específico también proporciona un tejido de muestra para los ensayos de bloqueo de actividad descritos a continuación.

[0128] La expresión génica en varios tejidos se puede medir mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:5201-5205 [1980]), transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer cadenas dobles específicas, incluyendo cadenas dobles de ADN, cadenas dobles de ARN y cadenas dobles de híbridos de ADN-ARN o cadenas dobles de ADN-proteína.

[0129] Alternativamente, la expresión génica en varios tejidos se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o bien policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra una secuencia nativa de un polipéptido de la presente invención o contra un péptido sintético basado en la secuencia de ADN que codifican el polipéptido de la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a un ADN que codifica un polipéptido de la presente invención y que codifica un epítipo de anticuerpo específico. A continuación, se proporcionan técnicas generales para generar anticuerpos y protocolos especiales para la transferencia Northern e hibridación *in situ*.

3. Estudios de unión a anticuerpo

[0130] La actividad de los polipéptidos de la presente invención se puede verificar adicionalmente mediante estudios de unión a anticuerpo, en los que se prueba la capacidad de los anticuerpos anti-PRO362 para inhibir el efecto de los polipéptidos PRO362 en las células de los tejidos. Entre los ejemplos de anticuerpos se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados, la preparación de los cuales se

describirá posteriormente en la presente invención.

[0131] Los estudios de unión a anticuerpo se pueden llevar a cabo en cualquier de los procedimientos de ensayo conocidos, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación. Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* páginas 147-158 (CRC Press Inc. 1987).

[0132] Los ensayos de unión competitiva dependen de la capacidad de un patrón marcado para competir con el analito muestra de prueba por la unión con una cantidad limitada de anticuerpo. La cantidad de proteína diana en la muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de patrón que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad de patrón que se une, los anticuerpos se insolubilizan preferiblemente antes o después de la competición, de manera que el patrón y el analito que se unen a los anticuerpos se pueden separar convenientemente del patrón y el analito que permanece sin unir.

[0133] Los ensayos sándwich implican la utilización de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo, de la proteína a detectar. En un ensayo sándwich, el analito muestra de prueba se une mediante un primer anticuerpo que está inmovilizado sobre un soporte sólido y, a continuación, un segundo anticuerpo se une al analito, formando de esta manera un complejo de tres partes insoluble. Ver, por ejemplo, la Patente USA No. 4.376.110. El segundo anticuerpo puede marcarse a sí mismo con un grupo detectable (ensayos de sándwich directos) o se puede medir utilizando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está marcado con un grupo detectable (ensayo de sándwich indirecto). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso el grupo detectable es una enzima.

[0134] Para la inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser nueva o congelada o puede estar incrustada en parafina y fijada con un conservante, tal como formalina, por ejemplo.

4. Ensayos basados en células

[0135] Los ensayos basados en células y modelos animales para enfermedades relacionadas con el sistema inmune se pueden utilizar para entender con mayor detalle la relación entre los genes y los polipéptidos identificados en la presente invención y el desarrollo y patogénesis de la enfermedad relacionada con el sistema inmune.

[0136] En una estrategia diferente, las células de un tipo de células que se sabe que están implicadas en una enfermedad concreta relacionada con el sistema inmune se transfectan con los ADNcs descritos en la presente invención, y se analiza la capacidad de estos ADNcs para alterar la función inmune. Las células adecuadas se pueden transfectar con el gen deseado y se monitoriza la actividad de la función inmune. Dichas líneas celulares transfectadas se pueden utilizar entonces para analizar la capacidad de los anticuerpos poli- o monoclonales o composiciones de anticuerpos para alterar la función inmune, por ejemplo, para modular la proliferación de células T o la infiltración de células inflamatorias. Las células transfectadas con las secuencias codificantes de los genes identificados en la presente invención se pueden utilizar adicionalmente para identificar candidatos de fármacos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune.

[0137] Además, se pueden utilizar cultivos primarios derivados de animales transgénicos (tal y como se ha descrito a continuación) en los ensayos basados en células de la presente invención, aunque se prefieren líneas celulares estables. Las técnicas para derivar las líneas celulares continuas a partir de animales transgénicos son conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Small et al., *Mol. Cell. Biol.* 5, 642-648 [1985]).

[0138] Un ensayo basado en células adecuado es la reacción de linfocitos mezclados (MLR). *Current Protocols in Immunology*, unidad 3.12; editada por J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober. National Institutes of Health, publicada por John Wiley and Sons, Inc. En este ensayo, se analiza la capacidad de un compuesto de prueba para estimular la proliferación de células T activadas.

[0139] Se cultiva una suspensión de células T de respuesta con células estimuladoras alogénicas y se mide la proliferación de células T mediante la captación de timidina tritiada. Este ensayo es una medida general de la reactividad de células T. Dado que la mayoría de células responde a y producen IL-2 después de la activación, las diferencias de respuesta en este ensayo refleja en parte las diferencias en la producción de IL-2 por las células de respuesta. Los resultados de MLR pueden verificarse mediante un ensayo de detección de linfoquinas (IL-2) estándar. *Current Protocols in Immunology*, supra 3.15, 6.3.

[0140] Una respuesta proliferativa de células T en un ensayo MLR puede ser debida a una respuesta mitogénica o puede ser debida a una respuesta estimuladora por las células T. La verificación adicional de la actividad estimuladora de células T de los polipéptidos de la presente invención se puede obtener mediante un ensayo de

estimulación. La activación de células T requiere una señal específica de antígeno mediada a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y una señal coestimuladora mediada a través de una segunda interacción de unión a ligando, por ejemplo, la interacción de unión a B7(CDBO.CD86)/CD28. El entrecruzamiento con Cd28 aumenta la secreción de linfoquinas por células T activadas. La activación de células T tiene controles tanto negativos como positivos a través de la unión de ligandos que tienen un efecto negativo o positivo. CD28 y CTLA-4 son glicoproteínas relacionadas en la superfamilia de Ig que se unen a B7. La unión de CD28 a B7 tiene un efecto de coestimulación positiva de la activación de células T; en cambio, la unión de CTLA-4 a B7 tiene un efecto de desactivación de células T negativo. Chambers, C. A. y Allison, J. P., *Curr. Opin. Immunol.* (1997) 9:396. Schwartz, R. H., *Cell* (1992) 71:1065; Linsey, P.S. y Ledbetter, J.A., *Annu. Rev. Immunol.*, (1993) 11:191; June, C.H. *et al.*, *Immunol. Today* (1994) 15:321; Jenkins, M.K., *Immunity* (1994) 1:443-446.

[0141] Los polipéptidos de la presente invención, así como otros compuestos de la presente invención, que son estimuladores (coestimuladores) de la proliferación de células T, tal como se ha determinado mediante MLR y ensayos de coestimulación, por ejemplo, son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmune caracterizadas por una función inmune escasa, subóptima o inadecuada. Estas enfermedades se tratan mediante la estimulación de la proliferación y activación de células T (e inmunidad mediada por células T) y la potenciación de la respuesta inmune en un mamífero a través de la administración de un compuesto estimulador, tal como los polipéptidos estimulantes de la presente invención. El polipéptido estimulante puede ser un polipéptido PRO362 o un anticuerpo agonista para el mismo. La terapia inmunoadyuvante para el tratamiento de tumores, descrita con más detalle a continuación, es un ejemplo de esta utilización de los compuestos estimulantes de la presente invención.

[0142] Los anticuerpos que se unen a polipéptidos inhibidores actúan para potenciar la respuesta inmune mediante la eliminación del efecto inhibitorio de los polipéptidos inhibidores. Este efecto se observa en experimentos que utilizan anticuerpos anti-CTLA-4 que aumentan la proliferación de células T, supuestamente mediante la eliminación de la señal inhibitoria provocada por la unión a CTLA-4. Walunas, T.L. *et al.*, *Immunity* (1994) 1:405. Esta utilización también se confirma en experimentos con glicoproteínas 4-1BB, un miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral que se une a un ligando (4-1BBL) expresado en células T cebadas y señala la activación y crecimiento de células T. Alderson, M. E. *et al.*, *J. Immunol.* (1994) 24:2219. La inhibición de la unión a 4-1BB mediante el tratamiento con un anticuerpo anti-41BB aumenta la gravedad de la enfermedad injerto contra huésped y se puede utilizar para erradicar tumores. Hellstrom, I. y Hellstrom, H.E. *Crit. Rev. Immunol.* (1998) 18:1.

[0143] Por otro lado, los polipéptidos de la presente invención, tales como anticuerpos antagonistas, así como otros compuestos de la presente invención, que son inhibidores de la proliferación/activación de células T y/o la secreción de linfoquinas, se pueden utilizar directamente para suprimir la respuesta inmune. Estos compuestos son útiles para reducir el grado de la respuesta inmune y para tratar las enfermedades relacionadas con el sistema inmune caracterizadas por una respuesta hiperactiva, superóptima o autoinmune. Alternativamente, los anticuerpos que se unen a los polipéptidos estimulantes de la presente invención y bloquean el efecto estimulante de estas moléculas se pueden utilizar para suprimir la respuesta inmune mediada por células T mediante la inhibición de la proliferación/activación de células T y/o la secreción de linfoquinas. El bloqueo del efecto estimulante de los polipéptidos suprime la respuesta inmune del mamífero.

5. Modelos de animales

[0144] Los resultados de los ensayos *in vitro* basados en células se pueden verificar adicionalmente utilizando modelos de animales *in vivo* y ensayos de la función de las células T. Se puede utilizar una serie de modelos de animales bien conocidos para entender adicionalmente el papel de los genes identificados en la presente invención en el desarrollo y la patogénesis de enfermedades relacionadas con el sistema inmune, y para ensayar la eficacia de agentes terapéuticos candidatos, incluyendo anticuerpos, y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluyendo antagonistas de moléculas pequeñas. La naturaleza *in vivo* de dichos modelos los hace particularmente predictivos de las respuestas en pacientes humanos. Entre los modelos de animales de enfermedades relacionadas con el sistema inmune se incluyen animales no recombinantes y recombinantes (transgénicos). Entre los modelos de animales no recombinantes se incluyen, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos de murinos. Dichos modelos se pueden generar mediante la introducción de células en ratones singéneos utilizando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en vena de cola, implante de bazo, implante intraperitoneal, implante bajo la cápsula renal, etc.

[0145] La hipersensibilidad por contacto es un ensayo *in vivo* simple de la función inmune mediada por células. En este procedimiento, las células epidérmicas se exponen a haptenos exógenos que ocasionan a una reacción de hipersensibilidad de tipo retrasado que se mide y se cuantifica. La sensibilidad por contacto implica una fase de sensibilización inicial seguido de una fase de estimulación. La fase de estimulación aparece cuando las células

epidérmicas encuentran un antígeno con el que previamente han tenido contacto. Tiene lugar un hinchamiento e inflamación, haciendo que éste sea un excelente modelo de dermatitis de contacto alérgica humana. En *Current Protocols in Immunology*, Eds., J. E. Cologan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., 1994, unidad 4.2 se describe con detalle un procedimiento adecuado. Ver también, Grabbe, S. y Schwarz, T. *Immun. Today* 19(1): 37-44 (1998).

[0146] La enfermedad injerto contra huésped aparece cuando células inmunocompetentes se trasplantan en pacientes inmunosupresores o tolerantes. Las células donantes reconocen y responden a antígenos huésped. La respuesta puede variar desde inflamación aguda amenazadora de la vida hasta casos suaves de diarrea y pérdida de peso. Los modelos de enfermedad injerto contra huésped proporcionan un medio de valoración de la reactividad de células T contra antígenos de MHC y antígenos de trasplantes menores. En *Current Protocols in Immunology*, *supra*, unidad 4.3 se describe con detalle un procedimiento adecuado.

[0147] Un modelo de animal para rechazo de aloinjerto de piel es un medio de valorar la capacidad de las células T para mediar en la destrucción de tejido in vivo que es indicativo de y una medida de su papel en la inmunidad antiviral y de tumores. Los modelos más comunes y aceptados utilizan injertos de cola-piel murinos. Los experimentos repetidos han demostrado que el rechazo de aloinjerto de piel está mediado por células T, células T ayudantes y células T efectoras agresoras, y no anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. Y Sachs, D. H., *Fundamental Immunology*, 2ª Edición, W. E. Paul, ed., Raven Press, NY, 1989, 889-992. En *Current Protocols in Immunology*, *supra*, unidad 4.4 se describe con detalle un procedimiento adecuado. Otros modelos de rechazo del trasplante que se pueden utilizar para ensayar los compuestos de la presente invención son los modelos de trasplante alogeneico de corazón descritos por Tanabe, M *et al. Transplantation* (1994) 58:23 y Tinubu, S.A. *et al. J. Immunol.* (1994) 4330-4338.

[0148] Los modelos de animales para la hipersensibilidad de tipo retrasado proporciona un ensayo de función inmune mediada por células también. Las reacciones de hipersensibilidad de tipo retrasado son una respuesta inmune in vivo mediada por células T caracterizada por la inflamación que no alcanza un máximo hasta después de que haya pasado un periodo de tiempo después de la estimulación con un antígeno. Estas reacciones también aparecen en enfermedades autoinmunes específicas de tejido, tales como esclerosis múltiple (MS) y encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, un modelo para MS). En *Current Protocols in Immunology*, *supra*, unidad 4.5 se describe con detalle un procedimiento adecuado.

[0149] EAE es una enfermedad autoinmune mediada por células T caracterizada por la inflamación de células T y células mononucleares y la posterior desmielinización de axones en el sistema nervioso central. EAE se considera generalmente un modelo animal relevante para MS en humanos. Bolton, C., *Multiple Sclerosis* (1995) 1:143. Se han desarrollado modelos agudos y de recaída-remisión. Se puede ensayar la actividad estimuladora o inhibitoria de las de células T contra la enfermedad desmielinizante mediante por el sistema inmune para los compuestos de la presente invención utilizando el protocolo descrito en *Current Protocols in Immunology*, anterior, unidades 15.1 y 15.2. Ver también los modelos para la enfermedad de mielina en la que oligodendrocitos o células de Schwann se injertan en el sistema nervioso central tal como se ha descrito en Duncan I. D. *et al., Molec. Med Today* (1997) 554-561.

[0150] Un modelo animal para artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte características clínicas, histológicas e inmunológicas de la artritis reumatoide autoinmune humana y es un modelo aceptable para la artritis autoinmune humana. Los modelos de ratón y rata se caracterizan por sinovitis, erosión del cartílago y hueso subcondrial. Se puede ensayar la actividad contra la artritis autoinmune para los compuestos de la presente invención utilizando los protocolos descritos en *Current Protocols in Immunology*, anterior, unidades 15.5. Ver también el modelo que utiliza un anticuerpo monoclonal para las integrinas CD18 y VLA-4 descritas en Issekutz, A. C. *et al., Immunology* (1996) 88:569.

[0151] Se ha descrito un modelo de asma en el que se inducen una hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por antígeno, eosinofilia e inflamación pulmonar mediante la sensibilización de un animal con ovoalbúmina y a continuación la estimulación del animal con la misma proteína suministrada mediante un aerosol. Varios modelos de animales (cobaya, rata, primate no humano) muestran síntomas similares al asma atópica en humanos tras el estímulo con antígenos del aerosol. Los modelos murinos tienen muchas de las características del asma humana. En Wolyniec, W. W. *et al., Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* (1998) 18: 777 y las referencias citadas en la misma se describen procedimientos adecuados para ensayar la actividad y la efectividad en el tratamiento del asma para los compuestos de la presente invención.

[0152] Adicionalmente, se puede ensayar en modelos de animales la psoriasis como enfermedad para los compuestos de la presente invención. La evidencia sugiere una patogénesis de las células T para la psoriasis. Los

compuestos de la presente invención se pueden ensayar en el modelo de ratón scid/scid descrito por Schon, M. P. *et al.*, *Nat. Med.* (1997) 3:183, en el que los ratones demuestran lesiones histopatológicas en la piel que se parece a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera de piel humana/ratón scid preparada tal como se ha descrito por Nickoloff, B. J. *et al.*, *Am. J. Path.* (1995) 146:580.

5
[0153] Los modelos de animales recombinantes (transgénicos) se pueden diselar mediante la introducción de la parte codificante de los genes identificados en la presente invención en el genoma de los animales de interés, utilizando técnicas estándar para la producción de animales transgénicos. Entre los animales que pueden servir como diana para la manipulación transgénica se incluyen, sin limitación, babuinos, chimpanzés y monos. Entre las técnicas conocidas en el sector para introducir un transgén en dichos animales se incluyen microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, Patente USA No. 4.873.191); transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas germinales (por ejemplo, Van der Putten *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-615 [1985]); marcaje de genes en células madre embrionarias (Thompson *et al. Cell* 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo. *Mol. Cel., Biol.* 3, 1803-1814 [1983]); transferencia de genes mediada por esperma (Lavitrano *et al. Cell.* 57, 717-73 [1989]). Para una revisión, ver, por ejemplo, la Patente USA No. 4.736.866.

10
[0154] Para el objetivo de la presente invención, entre los animales transgénicos se incluyen aquellos que portan el transgén sólo en parte de sus células ("animales mosaicos"). El transgén se puede integrar como un transgén individual o en concatámeros, por ejemplo, los tándems cabeza con cabeza o cabeza con cola. La introducción selectiva de un transgén en un tipo de célula concreta también es posible siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 623-636 (1992).

15
[0155] La expresión del transgén en animales transgénicos se puede monitorizar mediante técnicas estándar. Por ejemplo, el análisis con transferencia Southern o la amplificación por PCR se pueden utilizar para verificar la integración del transgén. A continuación, se puede analizar el nivel de expresión de ARNm utilizando técnicas, tales como la hibridación *in situ*, análisis con transferencia Northern, PCR o inmunocitoquímica.

20
[0156] En los animales se pueden examinar además los signos de patología de enfermedad inmune, por ejemplo, mediante un examen histológico para determinar la infiltración de células inmunes en tejidos específicos. También se pueden llevar a cabo experimentos de bloqueo en los que los animales transgénicos son tratados con los compuestos de la presente invención para determinar la extensión de los efectos en la proliferación de las células T. En estos experimentos, se administran al animal los anticuerpos de bloqueo que se unen al polipéptido de la presente invención, preparados tal y como se ha descrito anteriormente, y se determina el efecto en la función inmune.

25
[0157] Alternativamente, se pueden construir animales "knock out" que tienen un gen defectuoso o alterado que codifica un polipéptido identificado en la presente invención, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y el ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica un polipéptido concreto se puede utilizar para clonar el ADN genómico que codifica ese polipéptido según las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica un polipéptido concreto se puede eliminar o reemplazar por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para monitorizar la integración. Habitualmente, varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3') están incluidos en el vector [ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell.* 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado de manera homóloga con el ADN endógeno [ver, por ejemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992)]. A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimera de agregación [ver, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson ed. (IRL. Oxford, 1987), páginas 113-152]. A continuación, los embriones quiméricos se pueden implantar en un animal criado hembra pseudoembarazada y el embrión se lleva a término para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y se utiliza para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knockout se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de las condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido.

13. Composiciones farmacéuticas

30
[0158] Las moléculas activas de la presente invención, tal como se definen en las reivindicaciones, se pueden administrar para el tratamiento de enfermedades inflamatorias en forma de composiciones farmacéuticas.

[0159] Las formulaciones terapéuticas de la molécula activa se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla de la molécula activa que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

[0160] Las lipofecciones o liposomas también se pueden utilizar para liberar el polipéptido en las células.

[0161] La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta a tratar, preferiblemente aquéllos con actividades complementarias que no se afectan de forma adversa entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente citotóxico, una citoquina o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo deseado.

[0162] Las moléculas activas también pueden estar contenidas en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0163] Las formulaciones a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

[0164] Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros, tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico, permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos más cortos de tiempo. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un periodo largo de tiempo, se desnaturalizan o agregan como resultado de la exposición a una humedad de 37°C, dando lugar a una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear varias estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación se descubre que es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio de tio-disulfuros, se puede conseguir la estabilización mediante la modificación de residuos sulfhidrilos, la liofilización a partir de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, la utilización de aditivos adecuados y el desarrollo de composiciones específicas de matriz de polímeros.

14. Métodos de tratamiento

[0165] Se considera que los polipéptidos, anticuerpos, y otros compuestos activos de la presente invención se pueden utilizar para tratar varias enfermedades y condiciones inflamatorias, tales como enfermedades mediadas por células T, incluyendo aquellas caracterizadas por la infiltración de células leucocitos en un tejido, estimulación de la proliferación de células T, inhibición de la proliferación de células T, aumento o descenso de la permeabilidad vascular o la inhibición de la misma.

[0166] PR0301, PR0362, PRO245 y PRO1868 codifican miembros de una familia de proteínas caracterizadas por la

homología al antígeno A33.

[0167] PR0301, PR0362, PRO245 y PRO1868 (SEC ID NO: 1, SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 9 y SEC ID NO: 31, respectivamente), comparten homología con la molécula de adhesión de unión (JAM), Martin-Padura *et al.*, *J. Cell. Biol.* 1998 142(1): 117-127. La identidad más sustancial está compartida por la proteína PRO301 codificada por DNA40628 (SEC ID No. 1) en un 67%. La JAM está implicada en el reclutamiento de monocitos en respuesta a MCP-1, MCP-3 y LPS *in vivo*. Los anticuerpos para JAM bloquean la trans migración de monocitos *in vivo*. La JAM se localiza en el epitelio y endotelio murino como una molécula de adhesión de unión para la trans migración de monocitos. Otros leucocitos también pueden utilizar JAM, pero no existe ninguna información que apoye esta idea. La JAM está elevada en el colon de ratones con colitis y probablemente juega un papel de reclutamiento de monocitos o leucocitos en la lesión colónica.

[0168] Entre las patologías o trastornos de ejemplo a tratar con los compuestos de la invención se incluyen, pero sin limitación, enfermedad inflamatoria del intestino (es decir, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (escleroderma), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjörgen, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxismal nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointerstitial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, polineuropatía idiopática desmielinizante o síndrome de Guillain-Barré y polineuropatía inflamatoria desmielinizante crónica, enfermedades hepato biliares tales como las hepatitis infecciosas (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis crónica activa autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, y conlangitis esclerosante, enfermedades inflamatorias y fibróticas del pulmón, tales como fibrosis quística, enteropatía sensible al gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmune, incluyendo las enfermedades de piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas, tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes incluido el rechazo del injerto y la enfermedad de injerto contra huésped.

[0169] En el lupus eritematoso sistémico, el mediador central de la enfermedad es la producción de anticuepos auto-reactivos para propias proteínas/tejidos y la posterior generación de la inflamación mediada por el sistema inmune. Los anticuerpos median directa e indirectamente la lesión en el tejido. Aunque no se ha observado que los linfocitos T estén directamente implicados en el daño tisular, los linfocitos T son necesarios para el desarrollo de anticuerpos auto-reactivos. La génesis de la enfermedad es de este modo dependiente de los linfocitos. Los órganos y sistemas múltiples están afectados clínicamente incluyendo el riñón, el pulmón, el sistema musculoesquelético, el sistema mucocutáneo, ojo, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, tracto gastrointestinal, médula espinal y sangre.

[0170] La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria autoinmune sistémica crónica que implica principalmente a la membrana sinovial de múltiples articulaciones con la lesión resultante en el cartílago articular. La patogénesis es dependiente de los linfocitos T y está asociada con la producción de factores reumatoides, auto-anticuerpos dirigidos contra las propias IgG, con la formación resultante de complejos inmunes que alcanzan niveles elevados en fluidos de la articulación y sangre. Estos complejos en la articulación pueden inducir el infiltrado marcado de linfocitos y monocitos en la sinovia y los posteriores cambios sinoviales marcados: el espacio/fluido de las articulaciones se infiltra mediante células similares con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, frecuentemente en patrón simétrico. Sin embargo, también aparece en dos formas importantes. Una forma es el desarrollo de lesiones extra-articulares con la enfermedad articular progresiva presente y las lesiones típicas de la fibrosis pulmonar, vaculitis y úlceras cutáneas. La segunda forma de la enfermedad extra-articular es el denominado síndrome de Felty que aparece de forma tardía en la evolución de la enfermedad de RA, algunas veces después de que la enfermedad articular haya quedado inactiva, e implica la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede estar acompañado por vaculitis en múltiples órganos con formaciones de infartos, úlceras en la piel y gangrena. Los pacientes también desarrollan frecuentemente nódulos reumatoides en el tejido subcutáneo que recubre las articulaciones afectadas; la etapa tardía de los nódulos tienen centros neuróticos rodeados por un infiltrado de células inflamatorias mezcladas. Otras manifestaciones que pueden aparecer en RA incluyen: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria, neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca y nódulos reumatoides.

[0171] La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria idiopática crónica que empieza frecuentemente con como mínimo 16 años. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la RA; algunos pacientes que presentan un

resultado positivo en el factor reumatoide se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad se subclasifica en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser aguda y es habitualmente destructivo y conduce a la anquilosis de la articulación y el crecimiento retardado. Otras manifestaciones pueden incluir uveitis anterior crónica y amiloidosis sistémica.

5

[0172] Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto génico HLA-B27. Entre los trastornos se incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada con la enfermedad del intestino inflamatoria, espondilitis asociada con psoriasis, espondiloartropatía de inicio juvenil y espondiloartropatía no diferenciada. Las características diferenciables incluyen la sacroileitis con o sin espondilitis; artritis inflamatoria asimétrica; asociación con HLA-B27 (un alelo definido serológicamente del locus HLA-B de MHC de clase I); inflamación ocular, y ausencia de autoanticuerpos asociados con otra enfermedad reumatoide. La célula más implicada como clave de la inducción de la enfermedad es el linfocito T CD8+, una célula que dirige un antígeno presentado por células T CD8+ de moléculas MHC de clase I puede reaccionar contra el alelo HLA-B27 de MHC de clase I como si fuera un péptido exógeno expresado por moléculas MHC de clase I. Se ha realizado la hipótesis de que un epítipo de HLA-B27 puede mimetizar un epítipo antigénico bacteriano o microbiano y de este modo inducen una respuesta de células T CD8+.

10

15

[0173] La esclerosis sistémica (escleroderma) tiene una etiología desconocida. Una característica de la enfermedad es el endurecimiento de la piel; probablemente inducido por un procedimiento inflamatorio activo. El escleroderma puede ser localizado o sistémico; las lesiones vasculares son habituales y la lesión de las células endoteliales en la microvasculatura en un suceso inicial e importante en el desarrollo de esclerosis sistémica; la lesión vascular puede estar mediada por el sistema inmune. Se supone una base inmunológica por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y la presencia de anticuerpos antinucleares en muchos pacientes. La ICAM-1 frecuentemente favorece la expresión en la superficie celular de los fibroblastos en lesiones de piel que sugieren que la interacción de las células T con estas células puede tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. Entre otros órganos implicados se incluyen: el tracto gastrointestinal: la atrofia del músculo liso y la fibrosis que da lugar a una peristalsis/motilidad anormal; riñón: la proliferación concéntrica de íntima subendotelial que afecta las arterias arqueadas pequeñas e interlobulares con un flujo sanguíneo cortical renal resultante reducido, da lugar a proteinuria, azotemia e hipertensión; músculo esquelético: atrofia, fibrosis intersticial; inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial; y corazón: necrosis en banda de contracción, cicatrización/fibrosis.

20

25

30

[0174] Las miopatías inflamatorias idiopáticas incluyendo la dermatomiositis, polimiositis y otros son trastornos de la inflamación muscular crónica de etiología desconocida que dan lugar a una debilidad del músculo. La lesión/inflamación muscular es frecuentemente simétrica y progresiva. Los autoanticuerpos se asocian con la mayoría de las formas. Estos autoanticuerpos específicos de la miositis están dirigidos contra e inhiben la función de los componentes, proteínas y ARNms implicados en la síntesis de proteínas.

35

[0175] El síndrome de Sjögren es debido a una inflamación mediada por el sistema inmune y la posterior destrucción funcional de las glándulas lacrimales y las glándulas salivares. La enfermedad puede estar asociada con o acompañada por enfermedades del tejido conectivo inflamatorio. La enfermedad está asociada con la producción de autoanticuerpos contra los antígenos Ro y La, los cuales son complejos ARN-proteína pequeños. Las lesiones dan lugar a queratoconjuntivitis seca, xerostomía, con otras manifestaciones o asociaciones que incluyen cirrosis biliar, neuropatía periférica o sensorial y púrpura palpable.

40

45

[0176] La vasculitis sistémica incluye enfermedades en las que la lesión primaria es la inflamación y en algunos casos existe un daño posterior en los vasos sanguíneos que da lugar a una isquemia/necrosis/degeneración en tejidos a los que llegan los vasos sanguíneos afectados y la posible disfunción final del órgano. La vasculitis también puede aparecer como una lesión secundaria o secuela de otras enfermedades mediadas por el sistema inmune-inmunitario, tales como artritis reumatoide, esclerosis sistémica, etc., particularmente en enfermedades también asociadas con la formación de complejos inmunes. Entre las enfermedades del grupo de vasculitis sistémica primaria se incluyen: vasculitis necrotizante sistémica, poliarteritis nodosa, angitis alérgica y granulomatosis, poliangiitis; granulomatosis de Wegener; granulomatosis linfomatoide; y arteritis de células gigantes. Entre las vasculitis diversas se incluyen: síndrome del nódulo linfático mucocutáneo (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis del SNC aislada, enfermedad de Behet, tromboangiitis obliterante (enfermedad de Buerger) y venulitis necrotizante cutánea. El mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis enumeradas se cree que son principalmente debidas a la deposición de complejos de inmunoglobulinas en la pared del vaso sanguíneo y la posterior inducción de una respuesta inflamatoria vía ADCC, complejo de activación o ambos.

50

55

60

[0177] La sarcoidosis es una enfermedad de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de

granulomas epitelioides en casi cualquier tejido del cuerpo; la implicación del pulmón es lo más habitual. La patogénesis implica la persistencia de macrófagos activados y células linfoides en sitios de la enfermedad con las posteriores secuelas crónicas resultantes de la liberación de productos local y sistémicamente activos liberados por estos tipos de células.

5
[0178] La anemia hemolítica autoinmune que incluye la anemia hemolítica autoinmune, la pancitopenia inmune, y la hemoglobinuria paroxismal nocturna es un resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con antígenos expresados en la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos otras células sanguíneas incluyendo plaquetas también) y es un reflejo de la eliminación de estas células recubiertas de anticuerpo a través de la lisis mediada por complemento y/o mecanismos mediados por receptor ADCC/Fc.

10
[0179] En la trombocitopenia autoinmune que incluye púrpura trombocitopénica y trombocitopenia mediada por el sistema inmune en otros escenarios clínicos, la destrucción/eliminación de plaquetas aparece como resultado de la unión de anticuerpos o complementos a plaquetas y la posterior eliminación mediante lisis de complemento, mecanismos mediados por receptor ADCC/Fc.

15
[0180] La tiroiditis que incluye la enfermedad de Grave, la tiroiditis de Hashimoto, la tiroiditis linfocítica juvenil, y la tiroiditis atrófica son el resultado de una respuesta autoinmune contra los antígenos de la tiroides con la producción de anticuerpos que reaccionan con proteínas presentes en y frecuentemente específicas para la glándula tiroidea. Los modelos experimentales existentes incluyen modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepa de pollos obesos); modelos inducibles: inmunización de animales con tiroglobulina, antígeno microsómico de tiroides (tiroide peroxidasa).

20
[0181] La diabetes mellitus tipo I o diabetes dependiente de insulina es la destrucción autoinmune de células β de las isletas pancreáticas: esta destrucción está mediada por auto-anticuerpos y células T autorreactivas. Los anticuerpos para insulina o el receptor de insulina también puede producir el fenotipo de la no respuesta a insulina.

25
[0182] Las enfermedades renales mediadas por el sistema inmune, incluyendo glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de la lesión mediada por anticuerpos o linfocitos T en el tejido renal directamente como resultado de la producción de anticuerpos autorreactivos o células T contra antígenos renales, o bien, indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o complejos inmunes en el riñón que son reactivos contra otros antígenos no renales. De este modo, otras enfermedades mediadas por el sistema inmune que dan lugar a la formación de complejos inmunes también pueden inducir enfermedades renales mediadas por el sistema inmune como una secuela indirecta. Ambos mecanismos inmunes directo e indirecto dan lugar a una respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de lesiones en los tejidos renales con una alteración funcional orgánica resultante y en algunos casos la progresión para la insuficiencia renal. Ambos mecanismos inmunes humorales y celulares pueden estar implicados en la patogénesis de las lesiones.

30
[0183] Las enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, incluyendo Esclerosis Múltiple; polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barre; y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, se cree que tienen una base autoinmune y dan lugar a una desmielinización nerviosa como resultado del daño causado a los oligodendrocitos o a la mielina directamente. En la MS existen evidencias para sugerir que la inducción y progresión de la enfermedad son dependientes de los linfocitos T. La Esclerosis Múltiple es una enfermedad desmielinizante que es dependiente de los linfocitos T y tiene una evolución de recaída-remisión o una evolución progresiva crónica. La etiología es desconocida; sin embargo, las infecciones virales, la predisposición genética, el medio, y la autoinmunidad contribuyen. Las lesiones contienen infiltrados de predominantemente células microgliales mediadas por linfocitos T y macrófagos de infiltración; linfocitos T CD4+ son el tipo de células predominantes en las lesiones. El mecanismo de la muerte celular por oligodendrocitos y la posterior desmielinización no son conocidos pero es probable que estén dirigidos por linfocitos T.

35
[0184] La enfermedad de pulmón inflamatoria y fibrótica, incluyendo la neumonía eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, puede implicar una respuesta inmuno-inflamatoria desregulada. La inhibición de esa respuesta tendría efecto terapéutico.

40
[0185] La enfermedad de la piel autoinmune o mediada por el sistema inmune incluyendo enfermedades de la piel bullosa, eritema multiforme y dermatitis por contacto están mediadas por auto-anticuerpos, la génesis de los cuales es dependiente de los linfocitos T.

45
[0186] La psoriasis es un enfermedad inflamatoria mediada por linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células que procesan antígenos y algunos neutrófilos.

[0187] Las enfermedades alérgicas, incluyendo asma; rinitis alérgica, dermatitis atópica; hipersensibilidad a la comida; y la urticaria son dependientes de los linfocitos T. Estas enfermedades están mediadas predominantemente por la inflamación inducida por linfocitos T, la inflamación mediada por IgE o una combinación de ambas.

5 [0188] Las enfermedades asociadas a trasplantes, incluyendo el rechazo de injerto y la enfermedad de injerto contra huésped (GHVD) son dependientes de los linfocitos T; la inhibición de la función de los linfocitos T es mejorable.

[0189] Los pacientes que padecen otras enfermedades se pueden beneficiar del aumento de la respuesta inmune y/o inflamatoria. Entre dichas enfermedades se incluyen, pero sin limitación, la infección viral (incluyendo, pero sin limitarse a, AIDS, hepatitis A, B, C, D, E), infección bacteriana, infecciones micóticas, e infecciones por protozoos y parásitos (moléculas o derivados/agonistas que estimulan la MLR se pueden utilizar terapéuticamente para aumentar la respuesta inmune en agentes infecciosos), enfermedades de inmunodeficiencia incluyendo inmunodeficiencia heredada, adquirida, inducida infecciosa (como en la infección por VIH) o iatrogénica (es decir, proveniente de la quimioterapia) y la neoplasia.

15 [0190] Se ha demostrado que algunos pacientes de cáncer humanos desarrollan una respuesta de anticuerpo y/o linfocitos T a antígenos en células neoplásicas. También se ha observado en modelos de animales de neoplasia que el aumento de la respuesta inmune puede dar lugar al rechazo o la regresión de ese neoplasma concreto. Las moléculas que afectan a la respuesta de linfocitos T en la MLR tienen utilidad in vivo en la alteración de la respuesta inmune contra la neoplasia.

[0191] La inhibición de moléculas con propiedades proinflamatorias pueden tener una ventaja terapéutica en la lesión por reperfusión; apoplejía; infarto de miocardio; aterosclerosis; lesión pulmonar aguda; choque hemorrágico; quemaduras; sepsis/choque séptico; necrosis tubular aguda; endometriosis; enfermedad de las articulaciones degenerativa y pancreatitis.

25 [0192] Los compuestos de la presente invención se administran a un mamífero, preferiblemente un humano, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, mediante las rutas intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación (intranasal, intrapulmonar). Se prefiere la administración intravenosa o por inhalación de los polipéptidos y anticuerpos.

[0193] Se puede desear también administrar anticuerpos contra otros antígenos asociados a una enfermedad inmune o asociados a un tumor, tales como, sin limitación, anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4 o factor endotelial vascular (VEGF). Alternativamente, o además, se pueden coadministrar al paciente dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes descritos en la presente invención. Algunas veces, puede ser beneficioso administrar también una o más citoquinas al paciente. En una realización, los polipéptidos de la presente invención se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar en primer lugar, seguido de un polipéptido u otro compuesto de la presente invención. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o la administración en primer lugar. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son aquellas que se utilizan actualmente y pueden disminuirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y el polipéptido de la presente invención.

45 [0194] Para el tratamiento o la reducción de la gravedad de la enfermedad relacionada con el sistema inmune, la dosis apropiada de un compuesto de la presente invención dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente se administra con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al compuesto, y la discreción del profesional que atiende al paciente. El compuesto se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos. Preferiblemente, es deseable determinar la curva dosis-respuesta y la composición farmacéutica de la presente invención primero in vitro y a continuación en modelos de animales útiles antes de ensayar en humanos.

55 [0195] Por ejemplo, dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de polipéptido es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar entre aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o a más tiempo, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

60

15. Artículos de fabricación

[0196] En otra realización de la presente invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y un marcador. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es habitualmente un polipéptido o un anticuerpo de la presente invención. El marcador en el recipiente o asociado con el mismo indica que la composición se utiliza para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad de elección, particularmente una enfermedad relacionada con el sistema inmune. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Pueden incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones para su uso.

16. Diagnóstico y pronóstico de enfermedades

[0197] Las proteínas de la superficie celular, tales como proteínas que se sobreexpresan en ciertas enfermedades relacionadas con el sistema inmune, son excelentes dianas para los fármacos candidatos o el tratamiento de la enfermedad. Las mismas proteínas junto con proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en los estados de la enfermedad relacionada con el sistema inmune son útiles adicionalmente en el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra las proteínas producto de los genes amplificados en la esclerosis múltiple, artritis reumatoide u otra enfermedad relacionada con el sistema inmune se pueden utilizar como diagnóstico o pronóstico. Dichos anticuerpos y un portador (por ejemplo, un tampón) se pueden incluir en un kit de diagnóstico en un envase adecuado junto con las instrucciones para utilizar el anticuerpo para detectar el producto proteico.

[0198] Se encontró que la expresión de los polipéptidos PRO362 aumentaba significativamente en tejidos asociados con neoplasia, así como enfermedades inflamatorias. De este modo, los anticuerpos PRO262 son útiles para diagnosticar tejidos inflamados y neoplasmas.

[0199] Por ejemplo, los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos, se pueden utilizar para detectar cualitativamente o cuantitativamente la expresión de proteínas codificadas por los genes sobreexpresados o altamente expresados. El anticuerpo está preferiblemente equipado con un marcador detectable, por ejemplo fluorescente, y la unión se puede monitorizar mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en el sector. Estas técnicas son particularmente adecuadas, si el gen sobreexpresado codifica una proteína de la superficie celular. Dichos ensayos de unión son conocidos en la técnica y se pueden realizar esencialmente tal y como se ha descrito anteriormente.

[0200] La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos génicos marcadores se puede realizar, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Con este objetivo, se extrae una muestra histológica del paciente, y se aplica un anticuerpo marcado a la misma, preferiblemente mediante el recubrimiento del anticuerpo sobre la muestra biológica. Este procedimiento también permite la determinación de la distribución del producto génico marcador en el tejido examinado. Será evidente para los expertos en la materia que existen una gran variedad de procedimientos histológicos fácilmente disponibles para la detección *in situ*.

[0201] Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo con objetivos ilustrativos, y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

[0202] Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos de que se indique lo contrario. El origen de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo del documento, por los números de acceso de la ATCC pertenecen a la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

EJEMPLO 1 (ANTECEDENTES)Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO301 humano

5 **[0203]** Se utilizaron secuencias del dominio extracelular (ECD) (incluyendo la secuencia señal de secreción, si existe) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos de proteínas pública Swiss-Prot para buscar bases de datos de marcadores de secuencia expresada (EST). Las bases de datos de EST incluían bases de datos públicas de EST (por ejemplo, GenBank), una base de datos de EST privada (LIFESEQ*, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST-2
10 **[Altshul et al. *Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)]** como comparación de las secuencias de proteína de ECD con una traducción de 6 marcos de las secuencias de EST. Aquellas comparaciones que daban lugar a un resultado BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o superior que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y ensamblaron en las secuencias de ADN consenso con el programa "phrap" (Phil Green, Universidad de Washington, Seattle, Washington).

15 **[0204]** Se ensambló una secuencia de ADN de consenso que codifica DNA35936 utilizando phrap. En algunos casos, la secuencia de ADN de consenso se extendió utilizando ciclos de blast y phrap para extender la secuencia de consenso tanto como fuera posible utilizando las tres fuentes de secuencias EST indicadas anteriormente.

20 **[0205]** En base a la secuencia consenso, se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés y 2) para utilizar como sondas para aislar un clon de la secuencia de codificación de longitud completa. Los cebadores de PCR directos e inversos (indicados como *.f y *.r, respectivamente) pueden variar de 20 a 30 nucleótidos (habitualmente aproximadamente 24) y se diseñan para producir un producto de PCR de 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de sondas (indicadas como *.p) tienen
25 habitualmente de 40-55 pb (habitualmente aproximadamente 50) de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia consenso es mayor de 1-1,5 kbp. Con el fin de cribar diversas bibliotecas para una fuente de un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante una amplificación por PCR, como en *Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology*, con la pareja de cebadores de PCR. A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar los clones que codificaban el gen de interés
30 mediante el procedimiento de clonación in vivo utilizando el oligonucleótido de sonda y uno de los cebadores de PCR.

[0206] Con el fin de cribar diversas bibliotecas para una fuente de un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante una amplificación por PCR con la pareja de cebadores de PCR identificados anteriormente.
35 A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar los clones que codificaban el gen de PRO301 utilizando el oligonucleótido de sonda y uno de los cebadores de PCR.

[0207] El ARN para la construcción de las bibliotecas de ADNc se aisló de riñón fetal humano. Las bibliotecas de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc se construyeron mediante procedimientos estándar utilizando reactivos comercialmente disponibles (por ejemplo, Invitrogen, San Diego, CA; Clontech, etc.). El ADNc se cebó con oligo dT que contenía un sitio notI, unido por extremo romo a adaptadores con hemoquinasa Sall, se dividió con NotI, se separó por tamaño adecuadamente mediante electroforesis de gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio Sfil; véase Holmes *et al., Science* 253: 1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y NotI.
45

[0208] Se secuenció un clon de ADNc en su totalidad. La secuencia de nucleótidos de longitud completa de DNA40628 de secuencia nativa se muestra en la figura 5 (SEC ID No: 11). El clon DNA40628 contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación de traducción claro en las posiciones de nucleótidos 52-54 (figura 5; (SEC ID No: 11)). El precursor del polipéptido estimado tiene 299 aminoácidos de longitud con un peso molecular estimado de 32583 daltons y un pl de 8,29. El clon DNA40628 se ha depositado con la ATCC y se le asignó el depósito de ATCC no. 209432.
50

[0209] En base al análisis de alineación de secuencias BLAST y FastA de la secuencia de longitud completa, el PRO301 codificado por DNA40628 muestra una identidad en la secuencia de aminoácidos con el precursor del antígeno 33 (30%) y con la proteína receptora de virus cocksackie y adenovirus (29%).
55

[0210] Las secuencias de nucleótidos utilizados en el procedimiento anterior fueron los siguientes:

60 OLI2162 (359396.f1) (SEC ID No. 12)
TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTCCC
OLI2163 (35936.p1) (SEC ID No. 13)

TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAACTGTTGTGCCT
 OLI2164 (35936.f2) (SEC ID No. 14)
 ACACCTGGTTCAAAGATGGG
 OLI2165 (35936.r1) (SEC ID No. 15)
 5 TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG
 OLI2166 (35936.f3) (SEC ID No. 16)
 TTGCCTTACTCAGGTGCTAC
 OLI2167 (35936.r2) (SEC ID No. 17)
 10 ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG

EJEMPLO 2

Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO362 humano

15 **[0211]** Se utilizaron secuencias del dominio extracelular (ECD) (incluyendo la señal de secreción, si existe) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos de proteínas pública Swiss-Prot para buscar bases de datos de marcadores de secuencia expresada (EST). Las bases de datos de EST incluían bases de datos públicas de EST (por ejemplo, GenBank) y una base de datos de ADN de EST privada (LIFESEQ*, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST-3 (por ejemplo, Altshul *et al. Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)) como comparación de las secuencias de ECD de proteínas con una traducción de 6 marcos de la secuencia de EST. Aquellas comparaciones que daban lugar a un resultado BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o superior que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y ensamblaron en las secuencias de ADN de consenso con el programa "phrap" (Phil Green, Universidad de Washington, Seattle, Washington).

25 **[0212]** Se ensambló una secuencia de ADN de consenso en comparación con otras secuencias EST utilizando phrap. Esta secuencia de consenso se designa en la presente invención como DNA42257 (SEC ID No: 5) (véase la figura 4C). En base a la secuencia de consenso DNA42257 (SEC ID No: 5) mostrada en la figura 4C, se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés y 2) para utilizar como sondas para aislar un clon de la secuencia de codificación de longitud completa para PRO362. Los cebadores de PCR directos e inversos varían generalmente de 20 a 30 nucleótidos y se diseñan frecuentemente para producir un producto de PCR de 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de sondas tienen habitualmente de 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia de consenso es mayor de 1-1,5 kbp. Con el fin de cribar diversas bibliotecas para un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante una amplificación por PCR, como en *Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology*, con la pareja de cebadores de PCR. A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar los clones que codificaban el gen de interés utilizando el oligonucleótido de sonda y uno de los cebadores de PCR.

40 **[0213]** Se sintetizaron cebadores de PCR (directos e inversos):

Cebador de PCR directo 1 (42257.f1) 5'-TATCCTCCAATTGAGCACCCCTGG-3' (SEC ID No. 18)
 Cebador de PCR directo 2 (42257.f2) 5'-GTCCGAAGACATCCCAACAAG-3' (SEC ID No. 19)
 Cebador de PCR inverso 1 (42257.r1) 5'-CTTACAATGTGCGCTGTGCTGCTC-3' (SEC ID No. 20)
 Cebador de PCR inverso 2 (42257.r2) 5'-AGCCAAATCCAGCAGCTGGCTTAC-3' (SEC ID No. 21)

45 **[0214]** Adicionalmente, se construyó una sonda de hibridación sintética de oligonucleótidos a partir de la secuencia de consenso DNA42257 que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

Sonda de hibridación (42257.p1)
 50 5'-TGGATGACCGGAGCCACTACACGTGTGAAGTCACCTGGCAGACTCCTGAT-3' (SEC ID No. 22)

55 **[0215]** Con el fin de cribar diversas bibliotecas para una fuente de un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante una amplificación por PCR con la pareja de cebadores de PCR identificados anteriormente. A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar los clones que codificaban el gen de PRO362 utilizando el oligonucleótido de sonda y uno de los cebadores de PCR.

60 **[0216]** El ARN para la construcción de las bibliotecas de ADNc se aisló de tejido de cerebro fetal humano (LIB 153). Las bibliotecas de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc se construyeron mediante procedimientos estándar utilizando reactivos comercialmente disponibles, tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligo dT que contenía un sitio notI, unido por extremo romo a adaptadores con hemoquinasa Sall, se dividió con NotI, se separó por tamaño adecuadamente mediante electroforesis de gel, y se clonó en una orientación

definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio Sfil; véase Holmes *et al.*, *Science* 253: 1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y NotI.

5 [0217] La secuenciación del ADN de los clones aislados tal como se ha descrito produjo la secuencia de ADN de longitud completa para un PRO362 aislado [designado en la presente invención como UNQ317 (DNA45416-1251) (SEC ID No. 7).

10 [0218] La secuencia de nucleótidos completa de UNQ137 (DNA45416-1251) se muestra en la figura 6 (SEC ID No. 7). El clon UNQ367 (DNA45416-1251) (SEC ID No. 7) contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación de traducción claro en las posiciones de nucleótidos 1082-1084 (figura 6, SEC ID No. 7). El precursor del polipéptido estimado tiene 321 aminoácidos de longitud (figura 3, SEC ID No. 2). La proteína PRO362 de longitud completa mostrada en la figura 3 tiene un peso molecular estimado de 35.544 daltons y un pI de 8,51. El análisis del polipéptido PRO362 de longitud completa tal como se muestra en la figura 3 (SEC ID No. 2) pone de manifiesto la presencia de un sitio de unión a glucosaminoglicano en aproximadamente el aminoácido 149 a aproximadamente el aminoácido 152 y un dominio transmembrana desde aproximadamente el aminoácido 276 a aproximadamente el aminoácido 306. El clon UNQ317 (DNA45416-1251) se ha depositado con la ATCC de no. de depósito 209620.

EJEMPLO 3 (ANTECEDENTES)

20 Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO245 humano

25 [0219] Se utilizaron secuencias del dominio extracelular (ECD) (incluyendo la señal de secreción, si existe) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos de proteínas pública Swiss-Prot para buscar bases de datos de marcadores de secuencia expresada (EST). Las bases de datos de EST incluían bases de datos públicas de EST (por ejemplo, GenBank) y una base de datos de ADN de EST privada (LIFESEQ*, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST-2 (por ejemplo, Altshul *et al. Methods in Enzymology* 266: 460-480 (1996)) como comparación de las secuencias de ECD de proteínas con una traducción de 6 marcos de la secuencia de EST. Aquellas comparaciones que daban lugar a un resultado BLAST de 70 (o en algunos casos de 90) o superior que no codificaban proteínas conocidas se agruparon y ensamblaron en las secuencias de ADN de consenso con el programa "phrap" (Phil Green, Universidad de Washington, Seattle, Washington).

35 [0220] Una secuencia de consenso de ADN se ensambló en comparación a otras secuencias EST, en las que la secuencia de consenso se designa en la presente invención como DNA30954 (SEC ID No: 27). En base a la secuencia de consenso DNA30954, se sintetizaron oligonucleótidos para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés y para utilizar como sondas para aislar un clon de la secuencia de codificación de longitud completa para PRO245.

40 [0221] Se sintetizó una pareja de cebadores de PCR (directos e inversos):

cebador de PCR directo:

5'-ATCGTTGTGAAGTTAGTGCCCC-3' (SEC. ID. No: 28)

cebador de PCR inverso:

5'-ACCTGCGATATCCAACAGAATTG-3' (SEC. ID. No: 29)

45 [0222] Los cebadores directos e inversos de PCR varían generalmente de 20 a 30 nucleótidos y se diseñan frecuentemente para producir un producto de PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias sonda tienen habitualmente 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia de consenso es superior a aproximadamente 1-1,5 kbp. Con el fin de cribar varias bibliotecas para un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante amplificación por PCR, tal como se describe en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, con la pareja de cebadores de PCR.

55 [0223] Adicionalmente, se construyó una sonda de hibridación sintética de oligonucleótidos a partir de la secuencia de consenso DNA30954 que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos:

sonda de hibridación:

5'-GGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATTAGTGGCTCCAGCAGTTCC.3' (SEC ID No. 30)

60 [0224] Con el fin de cribar diversas bibliotecas para una fuente de un clon de longitud completa, se cribó el ADN de las bibliotecas mediante una amplificación por PCR con la pareja de cebadores de PCR identificados anteriormente. A continuación, se utilizó una biblioteca positiva para aislar los clones que codificaban el gen de PRO245 utilizando

el oligonucleótido de sonda y uno de los cebadores de PCR.

[0225] El ARN para la construcción de las bibliotecas de ADNc se aisló de tejido de hígado fetal humano. Las bibliotecas de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc se construyeron mediante procedimientos estándar utilizando reactivos comercialmente disponibles, tales como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc se cebó con oligo cT que contenía un sitio notI, unido por extremo romo a adaptadores con hemoquinas Sall, se dividió con NotI, se separó por tamaño adecuadamente mediante electroforesis de gel, y se clonó en una orientación definida en un vector de clonación adecuado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio Sfil; ver Holmes *et al.*, *Science* 253: 1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y Nol.

[0226] La secuenciación del ADN de los clones aislados tal y como se ha descrito anteriormente produjo la secuencia de ADN de longitud completa para un PRO245 de secuencia nativa (designada en la presente invención como UNQ219 (DNA35638) (SEC ID No: 8)) y la secuencia de proteína derivada (SEC ID No: 9).

[0227] La secuencia de nucleótidos completa de UNQ219 (DNA35638) se muestra en la Figura 7 (SEC. ID. No: 8). El clon UNQ219 (DNA35638) (SEC ID No: 8) contiene un único marco de lectura abierto con un sitio de iniciación de traducción claro en las posiciones de nucleótidos 89-91 [Kozak *et al.*, *supra*] y un extremo final en el codón de finalización en las posiciones de nucleótidos 1025-1027 (figura 7, SEC ID No: 8) El precursor del polipéptido estimado tiene 312 aminoácidos de longitud (figura 11) (SEC ID No: 9). El clon UNQ219 (DNA35638) se ha depositado con la ATCC el 17 de septiembre de 1997 y se asignó el depósito de ATCC no. 209265.

EJEMPLO 4 (ANTECEDENTES)

Inhibición de la proliferación estimulada por VEGF del crecimiento de células endoteliales

[0228] Se pusieron en placas células endoteliales capilares corticales adrenales bovinas (ACE) (de un cultivo primario, máximo 12-14 surcos) en placas de microtitulado de 96 pocillos (Amersham Life Science) a una densidad de 500 células/pocillo por 100 μ L en DMEM bajo en glucosa, suero de ternero al 10%, 2 mM de glutamina, 1x de pen/estrept y fungizona, complementado con 3 ng/mL de VEGF. Los controles se pusieron en placas del mismo modo pero algunos no incluían VEGF. Se añadió una muestra de prueba de los polipéptidos PRO301 y PRO245 en un volumen de 100 l para obtener un volumen final de 200 mL. Se incubaron las células durante 6-7 días a 37°C. Se aspiró el medio y se lavaron las células 1 x con PBS. Se añadió una mezcla de reacción de fosfatasa ácida (100 μ L, 0,1M de acetato de sodio, pH 5,5, 0,1% de Triton-100, 10 mM de fosfato de p-nitrofenilo). Tras una incubación de 2 horas a 37°C, se detuvo la reacción mediante la adición de 10 mL de NaOH 1 N. Se midió la DO en el lector de placas de microtitulación a 405 nm. Los controles eran sin células, con sólo células, células + FGF (5 ng/mL), células + VEGF (3 ng/mL), células + VEGF (3 ng/ml) + TGF- β (1 ng/ml), y células + VEGF (3 ng/mL) + LIF (5 ng/mL). (Se sabe que TGF- β a una concentración de 1 ng/ml bloquea un 70-90% de la proliferación de células estimulada por VEGF.)

[0229] Se evaluaron los resultados mediante el cálculo del porcentaje de inhibición de la proliferación de células estimuladas por VEGF (3 ng/mL), determinado mediante la medición de la actividad de la fosfatasa ácida a DO₄₀₅ nm. (1) en relación con las células sin estimulación, y (2) en relación a la inhibición por TGF- β de referencia de la actividad estimulada por VEGF. Los resultados, mostrados en la tabla 1, son indicativos de la utilidad de los polipéptidos PRO301 y PRO245 en la inhibición del crecimiento celular, especialmente en la terapia del cáncer y específicamente en la inhibición de la angiogénesis tumoral.

Tabla 1

Compuesto de prueba	Concentración	% Proliferación en relación al control
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	7,0 nM	1,02
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	70,0 nM	0,88
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	700,0 nM	0,44
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	0,01%	0,92
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	0,1%	0,85
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	1,0%	0,68

Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,01%	0,76
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,1%	0,35
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	1,0%	0,11
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,48 nM	1,03
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	4,8 nM	0,95
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	48,0 nM	0,49

EJEMPLO 5

Actividad estimuladora en el ensayo de la Reacción Linfocitaria Mixta (MLR)

- 5
- [0230] A continuación, se describen ensayos para determinar si los polipéptidos PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868 son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T estimulados. Los compuestos que estimulan la proliferación de linfocitos son terapéuticamente útiles cuando el aumento de la respuesta inflamatoria es ventajoso, por ejemplo, el aumento de la respuesta inmune contra la neoplasia. Los antagonistas a dichos compuestos que estimulan la proliferación de linfocitos son terapéuticamente útiles cuando la reducción de la respuesta inflamatoria es ventajosa. Un agente terapéutico puede tomar la forma de un agonista o un antagonista del polipéptido de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murino-humano, humanizados o humanos contra el polipéptido.
- 10
- [0231] El protocolo básico para este ensayo se describe en *Current Protocol in Immunology*, Unidad 3.12, J.E. Coligan A.M. Kruisbeek, DH Marglies, EM Shevach y W Strober, Eds. National Institute of Health. Publicada por John Wiley & Sons.
- 15
- [0232] Más específicamente, en una variante del ensayo, se aíslan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de individuos mamíferos, por ejemplo, un voluntario humano, mediante leucoféresis (un donante suministrará las PBMCs estimulantes, el otro donante suministrará las PBMCs de respuesta). Si se desea, las células se congelan en suero bovino fetal y DMSO tras el aislamiento. Las células congeladas pueden descongelarse durante toda una noche en medios de ensayo (37°C, 5% de CO₂) y a continuación se pueden lavar y resuspender hasta 3 x 10⁶ células/ml de medios de ensayo (RPMI; un 10% de suero bovino fetal, un 1% de penicilina-estreptomicina, un 1% de glutamina, un 1% de HEPES, un 1% de aminoácidos no esenciales, un 1% de piruvato).
- 20
- [0233] El estimulador de las PBMCs se prepara mediante la irradiación de las células (aproximadamente 3000 Rads). El ensayo se prepara mediante la colocación en placas en pocillos por triplicado de una mezcla de 100 µl de muestra de prueba diluida al 1% de 0,1%; 50 µl de células de estimulador irradiadas y 50 µl de células PBMC de respuesta. Como control se utilizan 100 µl de medios de cultivo celular o 100 ml de CD4-IgG. Los pocillos se incuban a continuación a 37°C, un 5% de CO₂ durante 4 días. En el día 5, cada pocillo se pulsa con timidina tritiada (1,0 mC/pocillo; Amersham). Las células se lavan 3 veces y a continuación se evalúa la captación de marcador.
- 25
- [0234] Se analizaron los polipéptidos PRO301, PRO362 y PRO245 en otra variante del ensayo. En esta variante de este ensayo, se aislaron las PBMC de los bazo de ratones Balb/c y ratones C57B6. Las células se laminaron de bazo obtenidos recientemente en medios de ensayo (RPMI; un 10% de suero bovino fetal, un 1% de penicilina-estreptomicina, un 1% de glutamina, un 1% de HEPES, un 1% de aminoácidos no esenciales, un 1% de piruvato) y se aislaron las PBMCs mediante el revestimiento de estas células sobre Linfocito M (Organon Teknika), centrifugando a 2000 rpm durante 20 minutos, recogiendo y lavando la capa de células mononucleares en medios de ensayo y resuspendiendo las células a 1 x 10⁷ células/ml de medios de ensayo. A continuación, el ensayo se llevó a cabo tal y como se ha descrito anteriormente.
- 30
- [0235] Los resultados, mostrados en la Tabla 2, indican que los polipéptidos PRO301, PRO362 y PRO245 de la presente invención son activos como estimuladores de la proliferación de linfocitos T estimulados. Los incrementos positivos sobre el control se consideran positivos, siendo preferidos incrementos mayores o iguales al 180%. Sin embargo, cualquier valor superior al control indica un efecto estimulante para la proteína de prueba.
- 35
- 40
- 45

Tabla 2

Compuesto	Concentración	Porcentaje de aumento sobre el Control
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	0,1%	181,7
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	1,0%	187,3
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	0,1%	193,4
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	1,0%	204,1
Proteína de DNA45416 (SEC ID No: 2)	0,1%	87,4
Proteína de DNA45416 (SEC ID No: 2)	1,0%	180,2
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,1%	189,7
Proteína de DNA35639 (SEC ID No: 9)	0,1%	193,7
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	1,0%	212,5
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	1,0%	300,5

EJEMPLO 65 Infiltrados de células inflamatorias en la piel de cobayas

[0236] El siguiente ejemplo muestra que los polipéptidos de la presente invención son proinflamatorios en que estimulan infiltrados de células inflamatorias (es decir neutrofilicos, eosinofilicos, monolíticos o linfocíticos) en piel de cobaya. El ensayo descrito en la presente invención monitoriza la capacidad de cada proteína de inducir un infiltrado de células inflamatorias en la piel de una cobaya. Los compuestos que estimulan la infiltración estimuladora son terapéuticamente útiles cuando el aumento de la respuesta inflamatoria es ventajoso. Los compuestos que inhiben la proliferación de linfocitos son terapéuticamente útiles cuando la supresión de la respuesta inflamatoria es ventajosa. Un agente terapéutico puede tomar la forma de antagonistas de los polipéptidos de la presente invención, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murino-humano, humanizados o humanos contra el polipéptido.

[0237] Se anestesiaron intramuscularmente con quetamina (75-80 mg/kg de peso corporal) y Xilacina (5 mg/kg de peso corporal) cobayas sin pelo (Charles River Labs) que pesaban 350 gramos o más. Las muestras de proteína de PRO301, PRO362 y PRO245 y control se inyectaron intradérmicamente en las espaldas de cada animal a un volumen de 100 µl por punto de inyección. Existían aproximadamente 16-24 puntos de inyección por animal. Se inyectaron intracardialmente un ml de colorante azul de Evans (1% en solución salina fisiológica tamponada). Los animales se sacrificaron después de 6 horas y se realizó la biopsia en cada sitio de inyección en la piel y se fijaron en formalina. Las pieles se prepararon para una evaluación histopatológica. De cada sitio se evaluó la infiltración de células inflamatorias en la piel. Los sitios con células inflamatorias visibles se marcaron como positivas. Las muestras que inducían un infiltrado de células inflamatorias se marcaron como sustancias proinflamatorias.

Tabla 3

Compuesto	Actividad proinflamatoria
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	+
Proteína de DNA45461 (SEC ID No: 2)	+
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	+
Control negativo	-

[0238] En base a estos resultados, PRO1868 (SEC ID NO: 31) probablemente también tiene actividad proinflamatoria.

30 **EJEMPLO 7 (ANTECEDENTES)**Interacción con neutrófilos humanos

[0239] El siguiente ejemplo muestra la capacidad de los polipéptidos de la presente memoria de unirse a neutrófilos humanos, una molécula asociada con la inflamación y la respuesta inflamatoria.

[0240] Se incubaron neutrófilos aislados de la sangre de donantes humanos (PMN), tal como se describe en Scan.

J. Clin. Invest. Suppl. 97: 51-76 (1968), con una proteína de fusión Ig codificada por DNA40628 (preparada tal como se describe en los siguientes ejemplos) o un anticuerpo humanizado de control negativo.

5 [0241] Se resuspendieron los PMN en un tubo de microcentrífuga en PBS a una densidad de 2×10^6 células equivalentes por condición. Las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo y se sedimentaron a 400 x g entre lavados. Las células de PMN se bloquearon con BSA al 0,5% en PBS (reactivo de bloqueo) a 4°C durante 1 hora. Después de la incubación, las células se lavaron adicionalmente dos veces más con reactivo de bloqueo. Los PMN se sedimentaron después del lavado final y se resuspendieron en 1 ml de tampón de bloqueo a 0,1 µg/ml en la proteína DNA40626 y el anticuerpo de control. La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 4°C. Las células de PMN se resuspendieron suavemente cada 15 minutos en hielo, a continuación se lavaron y se sedimentaron 5 veces en tampón de bloqueo, durando cada lavado 5 minutos a 4°C y sedimentando a 400 x g. A continuación se aplicó a las células de PMN una dilución 1:1000 de Fc de IgG de cabra y anti-humano específico de la conjugación con fosfatasa alcalina en el tampón de bloqueo. Las células de PMN se incubaron durante 1 hora a 4°C con un mezclado suave cada 15 minutos sobre hielo. A continuación, las células de PMN se lavaron 5 veces con tampón de bloqueo, se resuspendieron en el sustrato apropiado para fosfatasa alcalina y se distribuyeron en 4 alícuotas equivalentes de 100 µl sobre una placa de microtitulación. El desarrollo del color se leyó a D.O. 405. Los resultados se muestran en la figura 21.

20 EJEMPLO 8 (ANTECEDENTES)

Hibridación de tejido por transferencia de puntos (dot)

25 [0242] Una transferencia ("blot") madre de ARN humano (Clontech) se hibridó durante toda la noche a 65°C en tampón Expresshyb® (Clontech) según las instrucciones del fabricante con 100 nM de sonda de ADNc de DNA40628 (SEC ID No. 7) marcada con psoralen-biotina. Se utilizó estreptavidina-fosfatasa alcalina para detectar la sonda biotinilada. La transferencia se desarrolló con sustrato CDP-star (Ambion) y se expuso durante varios tiempos sobre película Biomax (Kodak). Un análisis de hibridación de ADNc de tejidos humanos muestra que el ARNm de DNA40628 se expresa en una amplia gama de tejidos, pero no en cerebelo y la médula espinal (figura 19). El ARNm de DNA40628 se expresa de manera elevada en el colon, próstata, estómago, ovario, glándula salivar, riñón, pulmón, tráquea y placenta.

35 EJEMPLO 9

Sobreexpresión de productos génicos

40 [0243] Este ejemplo muestra que los genes que codifican varias proteínas indicadas en la figura 20 se sobreexpresan en el colon colítico de ratones CRF2-4-/- "knock out". Los agentes terapéuticos pueden tomar la forma de antagonistas de los productos génicos indicados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos murino-humano, humanizados o humanos contra los mismos.

45 [0244] Los ratones CRF2-4-/- (Spencer *et al.*, *J. Exp. Med.* 187, 571-578 (1998)) son animales knockout de receptor IL-10 que tienen una subunidad del gen que codifica el receptor IL-10 eliminado. Los ratones son insensibles a las funciones de reducción de la expresión de IL-10 para la activación de macrófagos, y no pueden reducir la expresión de la respuesta de liposacáridos desencadenantes de la secreción de TNF-α por macrófagos. Desarrollan una colitis crónica que puede conducir a un adenocarcinoma colónico. La colitis espontánea está mediada por linfocitos, monocitos y neutrófilos. IL-10 suprime la respuesta inflamatoria modulando la expresión de ciertas citoquinas inflamatorias.

50 [0245] Las sondas para las proteínas indicadas en la figura 20 se crearon a partir de plantillas de ARNm para los productos génicos indicados y se utilizaron en el ensayo de 5'-nucleasa (por ejemplo, TaqMan™) y en PCR cuantitativa a tiempo real (por ejemplo, ABI Prizm 7700 Sequence Detection System™ (Perkin-Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA). Los resultados se expresan en unidades delta CT. Una unidad corresponde a un ciclo de PCR o aproximadamente una amplificación de dos veces en relación a lo normal, dos unidades corresponden a cuatro veces, 3 unidades a 8 veces, etc. La cuantificación se obtuvo utilizando cebadores y un ARNm etiquetado con fluorescente TaqMan™ derivado de los productos génicos de ensayo relacionados con el sistema inflamatorio indicados en la figura 20. Se prefieren las regiones de los productos génicos indicados que más probablemente contienen secuencias de ácidos nucleicos únicas y que menos probablemente han ajustado ("spliced out") intrones, para la derivación del cebador, por ejemplo, la región 3'-no traducida.

60 [0246] La reacción del ensayo de 5'-nucleasa es una técnica fluorescente basada en PCR que utiliza la actividad 5'-exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para monitorizar la amplificación a tiempo real. Se utilizan dos

cebadores oligonucleótidos para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extendible mediante la enzima Taq ADN polimerasa y está marcada con un colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente de sofocación. Cualquier emisión inducida por láser del colorante fluorescente se destruye por el colorante de destrucción cuando los dos colorantes están situados de manera próxima ya que están en la sonda. Durante la reacción de amplificación, la sonda se divide mediante la enzima Taq ADN polimerasa de una manera dependiente de la plantilla. Los fragmentos resultantes de la sonda se disocian en solución y la señal de la liberación del colorante informador está libre del efecto de destrucción del segundo fluoróforo. Se libera una molécula de colorante informador para cada nueva molécula sintetizada y la detección del colorante informador no destruido proporcionó la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

[0247] El procedimiento de la 5'-nucleasa se realiza en un dispositivo de PCR cuantitativa a tiempo real, tal como el ABI Prism 7700™ Sequence Detection. El sistema consiste en un termociclador, láser, cámara del dispositivo acoplado por carga (CCD) y ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge en tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos y se detecta en el CCD. El sistema incluye un software para hacer funcionar los dispositivos y para analizar los datos.

[0248] Los datos del ensayo de 5'-nucleasa se expresan inicialmente como ct, o el ciclo umbral. Esto se define como el ciclo en el que la señal informadora se acumula por encima del nivel base de fluorescencia. Los valores Ct se utilizan como la medida cuantitativa del número relativo de copias de inicio de una secuencia diana concreta en una muestra de ácidos nucleicos.

[0249] Los resultados de la amplificación de ARNm se muestran en la figura 20. La expresión en animales naturales se comparó con animales CRF2-4 -/- KO con beta-actina como patrón de referencia. Se midieron cuatro animales en cada grupo. A los cuatro animales KO se les diagnosticó colitis y, además, tres de ellos tenían adenocarcinoma de colon.

[0250] La figura 20 muestra que ARNm de JAM se incrementa en 3,3 veces en el colon de ratones CRF2-4 -/- con colitis.

[0251] Como resultado, es probable que PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868 hubieran tenido también una expresión elevada en la enfermedad inflamatoria humana, tal como la enfermedad inflamatoria del intestino y otras enfermedades inflamatorias de los intestinos.

EJEMPLO 10 (ANTECEDENTES)

Inducción de apoptosis de células endoteliales

[0252] La capacidad de los polipéptidos de la presente invención para inducir la apoptosis en células endoteliales se ensayó en células endoteliales de vena umbilical venosa humana (HUVEC, Cell Systems). El primer día, se pusieron células en placas para microtítulos de 96 pocillos (Amersham Life Science, microplaca centelleante cytoStar-T. RPNQ 160, estéril, tratada con cultivo de tejidos, envuelta individualmente), en suero al 10% (medio CSG, Cell Systems), en una densidad de 2×10^4 células por pocillo en un volumen total de 100 μ l. El segundo día, se añadieron los polipéptidos PRO301 y PRO245 codificados por DNA40628 y DNA35638, respectivamente, por triplicado en diluciones del 1%, 0,33% y 0,11%. En el tercer día se determinó la capacidad de los polipéptidos PRO301 y PRO245 para inducir la apoptosis utilizando un kit disponible comercialmente, el Kit de Detección de Apoptosis (R&D Systems, Minnesota) en el que la anexina V., un miembro de las proteínas de unión a calcio y fosfolípidos, se utiliza para la detección de la apoptosis, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se añadieron a las células la anexina V marcada con fluoresceína y el yoduro de propidio. Se realizó el análisis con citómetros equipados con un solo láser que emite una luz de excitación a 488 nm. En esta prueba, las células vivas no se teñirán con ningún fluorocromo, las células necróticas se teñirán con ambos fluorocromos, y las células que experimentan la apoptosis se teñirán sólo con el reactivo de la anexina V-FITC. La señal generada por la anexina V-FITC se detectó en el detector de señal de FITC. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 4.

TABLA 4

Compuesto de prueba	Concentración	% sobre la fluorescencia base
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	0,11%	115,8
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	0,33%	199,3
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	1,0%	335,6
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,11%	77,6
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,33%	143,7
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	1,0%	146,0
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	6,82 nM	67,2
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	20,46 nM	102,6
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	62,0 nM	118,8

[0253] La capacidad de los compuestos de las proteínas de la presente invención para inducir la apoptosis de las células epiteliales, especialmente en combinación con la interrupción en la formación de la unión celular tal y como se indica en el Ejemplo 2, es indicativo de que los compuestos juegan un papel en la adhesión y la trans migración celulares. De forma similar a la JAM murino, los compuestos son probables moléculas de unión celular en el epitelio y el endotelio, lo cual explica su extensa distribución en el tejido. La inducción de la apoptosis de las células endoteliales indica un papel en el crecimiento y la apoptosis de las células.

EJEMPLO 11

Ensayo antitumoral *in vitro*

[0254] La actividad antiproliferativa de los polipéptidos PRO301 y PRO362 de la presente invención se determinó en el ensayo de investigación para el descubrimiento de fármacos anticancerígenos *in vitro* orientado hacia enfermedades, del National Cancer Institute (NCI), utilizando un ensayo de unión a colorante sulforrodamina B (SRB) esencialmente como se describe por Skehan et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**: 1107-1112 (1990). Las 60 líneas de células tumorales utilizadas en este estudio ("el panel NCI"), así como las condiciones para su mantenimiento y cultivo *in vitro* se han descrito por Monks et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**: 757-766 (1991). El objetivo de este cribado es evaluar inicialmente la actividad citotóxica y/o citoestática de los compuestos de prueba contra diferentes tipos de tumores (Monks et al., *supra.*: Boyd, *Cancer: Prime, Pract. Oncol. Update*, **3(10)**: 1-12 [1989]).

[0255] Se recogieron células de aproximadamente 60 líneas de células tumorales humanas con tripsina/EDTA (Gibco), se lavaron una vez, se resuspendieron en IMEM y se determinó su viabilidad. Las suspensiones celulares se añadieron mediante pipeta (volumen de 100 µl) en placas de microtítulos separadas de 96 pocillos. La densidad de células para la incubación de 6 días era inferior que para la incubación de 2 días para evitar el sobrecrecimiento. Los inoculados se dejaron durante un periodo de preincubación de 24 horas a 37°C para su estabilización. Se añadieron diluciones de dos veces la concentración de prueba deseada a tiempo cero en alícuotas de 100 µl a los pocillos de placas de microtítulos (dilución 1:2). Los compuestos de prueba se evaluaron a cinco diluciones semilogarítmicas (1000 a 100.000 veces). Las incubaciones tuvieron lugar durante dos días y seis días en una atmósfera de CO₂ al 5% y 100% de humedad.

[0256] Después de la incubación, se extrajo el medio y las células se fijaron en 0,1 ml de ácido tricloroacético al 10% a 40°C. Las placas se enjuagaron cinco veces con agua desionizada, se secaron, se tñeron durante 30 minutos con 0,1 ml de colorante sulforrodamina B al 0,4% (Sigma) disuelto en ácido acético al 1%, se enjuagaron cuatro veces con ácido acético al 1% para eliminar el colorante no unido, se secaron y el tinte se extrajo durante 5 minutos con 0,1 ml de base Tris [tris(hidroximetil)aminometano] 10 mM, pH 10,5. La absorbancia (DO) de sulforrodamina B a 492 nm se midió utilizando un lector de la placa de microtítulos de 96 pocillos conectado a un ordenador.

[0257] Una muestra de prueba se consideró positiva si muestra por lo menos un 50% de efecto inhibitor del crecimiento en una o más concentraciones. Los resultados se muestran en las siguientes Tablas, en la que las abreviaturas son las siguientes:

NSCL = carcinoma de pulmón de células no pequeñas
SNC = sistema nervioso central

Tabla 5

Compuesto de prueba	Concentración	Longitud de ensayo	Línea celular tumoral	
			Tipo	Designación
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	0,075 nM	6	Colon Melanoma	HCC-2998 M14
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	700 nM	6	Melanoma	M14
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	152 nM	6	Colon Melanoma	SR LOX IMVI
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	15,2 nM	6	Melanoma	LOX IMVI
Proteína de DNA40628 (SEC ID No: 1)	0,85 nM	6	NSCL Ovario Próstata	HOP62 OVCAR-3 PC3
Proteína de DNA45416 (SEC ID No: 2)	15 nM	2	Ovario	SK-OV-3
Proteína de DNA45416 (SEC ID No: 2)	15 nM	6	NSCL Próstata	NCI-H322M PC-3
Proteína de DNA45416 (SEC ID No: 2)	4,7 nM	6	Melanoma	LOX IMVI
Proteína de DNA45416 (SEC ID No: 2)	47 nM	6	NSCL Colon	NCI-H322M Colo 205
Proteína de DNA45416 (SEC ID No: 2)	152 nM	2	SNC Mama	SR-295 T047D
Proteína de DNA45416 (SEC ID No: 2)	152 nM	6	Leucemia NSCL Colon SNC Melanoma	SR, HL-60 (TB), MOLT-4, K-562 NCI-H23, EKVX HCC-2998 U251 UACC.62, UACC- 257, LOX IMVI
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,35 nM	2	NSCL Ovárico	HOP92 OVCAR-4
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,35 nM	2	Leucemia	SR
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	0,35 nM	6	Colon	HCC-2998
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	3,5 nM	6	Leucemia Colon	SR SW-620
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	6,2 nM	6	Colon	HCT-116

Compuesto de prueba	Concentración	Longitud de ensayo	Línea celular tumoral	
			Tipo	Designación
Proteína de DNA35638 (SEC ID No: 9)	6,2 nM	6	Leucemia	RPMI-8226

EJEMPLO 12Utilización de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 como sonda de hibridación

5 **[0258]** El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica un PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 como sonda de hibridación.

10 **[0259]** El ADN que comprende la secuencia codificante de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 de secuencia nativa (tal y como se muestra en las figuras 5-7 y 61, SEC ID No: 11, 7, 8 y 31, respectivamente) se utiliza como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868, respectivamente) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

15 **[0260]** La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADNc o ADN de biblioteca genómica se realizan según las siguientes condiciones de astringencia elevada. La hibridación de la sonda radiomarcada derivada de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 a los filtros se realiza en una solución de formamida al 50%, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

20 **[0261]** A continuación, se identifican los ADNs que tienen una identidad secuencial deseada con el ADN que codifica un PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 de secuencia nativa de longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en el sector.

EJEMPLO 13Expresión de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 en *E.coli*

30 **[0262]** Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 mediante expresión recombinante en *E. coli*.

35 **[0263]** La secuencia de ADN que codifica PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar *et.al.*, *Gene*, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se desfosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor *trp*, una secuencia poli-His líder (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868, el finalizador transcripcional lambda, y un gen *argU*.

45 **[0264]** A continuación, la mezcla de unión se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los procedimientos descritos en Sambrook *et. al.*, *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y, a continuación, se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plásmido se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

50 **[0265]** Los clones seleccionados se pueden desarrollar durante toda la noche en un medio de cultivo líquido tal como el caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de la expresión se activa.

[0266] Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante

centrifugación. El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y a continuación, las proteínas PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 solubilizadas se purifican, por ejemplo, utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

5
 [0267] El PRO301 se expresó en *E. coli* en forma de etiqueta de poli-His, utilizando el siguiente procedimiento. El ADN que codifica PRO301 se amplificó inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contenían sitios para enzimas de restricción que correspondían con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de traducción eficiente y fiable, una purificación rápida en una columna de quelación de metales y una extracción proteolítica con enteroquinas. Las secuencias etiquetadas con poli-His amplificadas por PCR se ligaron a continuación en un vector de expresión, que se utilizó para transformar un *E. coli* huésped basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). Los transformantes se desarrollaron en primer lugar en LB que contenía carbenicilina 50 mg/ml a 30°C con agitación hasta alcanzar una D.O. 600 de 3-5. Los cultivos se diluyeron entonces 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico·2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se desarrollaron durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Se tomaron muestras para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y se centrifugó todo el cultivo para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelaron hasta la purificación y replegamiento.

20
 [0268] La pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5-1 L (6-10 g de sedimentos) se resuspendieron en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón pH 8. Se añadieron sulfito sódico sólido y tetratiónato sódico hasta concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agitó durante toda la noche a 4°C. Esta etapa dio lugar a una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por la sulfitolización. La solución se centrifugó a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluyó con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante de metales (guanidina 6M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtró a través de filtros de 0,22 micras para depurarse. El extracto depurado se cargó en una columna de quelante de metales de 5 ml de Qiagen Ni²⁺-NTA equilibrada en el tampón de la columna quelante de metales. La columna se lavó con tampón adicional que contenía imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluyó con tampón que contenía imidazol 250 mM. Las fracciones que contenían la proteína deseada se agruparon y guardaron a 4°C. La concentración de proteínas se estimó por su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado según su secuencia de aminoácidos.

35
 [0269] La proteína se replegó diluyendo la muestra lentamente en tampón de replegamiento recién preparado que consistía en: Tris 20 mM, pH 8,6; NaCl 0,3 M; urea 2,5 M; cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegamiento se eligieron para que la concentración final se encontrara entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegamiento se agitó suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de replegamiento se desactivó mediante la adición de TFA hasta una concentración final del 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación adicional de la proteína, la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 micras y se añadió acetonitrilo hasta una concentración final del 2-10%. La proteína replegada se cromatografió en una columna de fase inversa Poros R1/H con un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Se analizaron alícuotas de fracciones con una absorbancia A₂₈₀ en geles de poliacrilamida-SDS y se agruparon las fracciones que contenían la proteína replegada homogénea. Por lo general, las especies replegadas de manera adecuada de la mayoría de proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que estas especies son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos resguardados de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen generalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de resolver las formas mal replegadas de las proteínas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

50
 [0270] Las fracciones que contenían la proteína PRO301 replegada deseada, respectivamente, se agruparon y se eliminó el acetonitrilo con una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formularon en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel con resinas Superfine G25 (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtrada de forma estéril.

55 EJEMPLO 14

Expresión de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 en células de mamíferos

60 [0271] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma glicosilada de un PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

[0272] El vector pRK5 (véase EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 está ligado en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook et. al., *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-PRO301, pRK5-PRO362, pRK5-PRO245 o pRK5-PRO1868, respectivamente.

[0273] En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se cultivan para confluir en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-PRO301, pRK5-PRO362, pRK5-PRO245 o pRK5-PRO1868 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen del ARN de VA [Thimmappaya et. al., *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de CaCl₂. A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO₄, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio nuevo y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

[0274] Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ³⁵S-cisteína y 200 µCi/ml ³⁵S-metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio acondicionado, se concentra en un filtro de giro y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

[0275] En una técnica alternativa, se puede introducir ADN de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Somparyrac et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12: 1575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un frasco giratorio y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-PRO301, pRK5-PRO362, pRK5-PRO245 o pRK5-PRO1868. En primer lugar, las células se concentran en el frasco giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el residuo celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el frasco giratorio que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los restos celulares. La muestra que contiene el PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

[0276] En otra realización, PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 pueden expresarse en células CHO. El pRK5-PRO301, pRK5-PRO362, pRK5-PRO245 o pRK5-PRO1868 pueden transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO₄ o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio puede reemplazarse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como la ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia de un polipéptido PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868, el medio de cultivo puede reemplazarse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio acondicionado. A continuación, el medio que contiene el polipéptido PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

[0277] El PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 etiquetado con epítipo puede expresarse también en células CHO huésped. El PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 puede subclonarse fuera del vector pRK5. La inserción del subclon puede experimentar PCR para fusionarse en el marco con una epítipo etiqueta seleccionada, tal como una etiqueta de poli-His en un vector de expresión de Baculovirus. La inserción de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 etiquetado con poli-His puede subclonarse a continuación en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal y como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje puede realizarse, tal y como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelante de Ni²⁺.

[0278] El PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868 se expresaron en células CHO mediante procedimientos de expresión transitorios y estables.

[0279] La expresión estable en células CHO se realizó utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresaron como una construcción IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionaron a una secuencia de región constante de IgG1 que contenía la bisagra, CH2 y los dominios de CH2 y/o como una forma etiquetada de poli-His.

[0280] Tras la amplificación por PCR, los ADN's respectivos se subclonaron en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar descritas en Ausubel et. al., *Current Protocols of Molecular Biology*, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen en general para que tengan sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el traslado adecuado de los de ADNc. El vector utilizado en la expresión en las células CHO es tal y como se describe en Lucas et. al., *Nucl. Acid Res.* 24:9 (1774-1779) (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

[0281] Se introdujeron doce microgramos del ADN plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección Superfect® (Qiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se desarrollaron tal y como se describe en Lucas et. al., *supra*. Aproximadamente se congelan 3×10^7 células en una ampolla para un crecimiento y producción posteriores tal y como se describe a continuación.

[0282] Las ampollas que contenían el ADN plásmido se descongelaron mediante un baño de agua y se mezclaron mediante centrifugación. El contenido se pipeteó en un tubo de centrifuga que contenía 10 ml de medio y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 μ m con un 5% de suero bovino fetal dialfiltrado a 0,2 μ m). A continuación, las células se fraccionaron en un centrifugador de 100 ml que contenía 90 ml del medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfirieron a un centrifugador de 250 ml lleno con 150 ml de medio de cultivo selectivo y se incubaron a 37°C. Después de otros 2-3 días, se sembraron centrifugadores de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con 3×10^5 células/ml. El medio celular se cambió por medio nuevo mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio de CHO adecuado, en realidad se utilizó un medio de producción descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. Un centrifugador de 3 L de producción se siembra a $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determinaron el pH y el número de células. En el día 1, se tomaron muestras en el centrifugador y se inició el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se tomaron muestras en el centrifugador, la temperatura se varió hasta 33°C, y se tomaron 30 ml de glucosa a 500g/l y 0,6 ml de antiespuma al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajustó según la necesidad manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cayera por debajo del 70%, el cultivo celular se recogió mediante centrifugación y se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m. El filtrado se guardó a 4°C o se cargó inmediatamente en columnas para la purificación.

[0283] Para las construcciones etiquetadas de poli-His, las proteínas se purificaron utilizando una columna de Ni²⁺-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombeó en una columna de 6 ml de Ni²⁺-NTA equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contenía 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4°C. Tras cargarse, la columna se lavó con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluyó con el tampón de equilibrio que contenía 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento que contenía 10 mM Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guardó a -80°C.

[0284] Las construcciones de inmunoadhesinas (que contienen Fc) se purificaron a partir del medio acondicionado tal y como se indica a continuación. El medio acondicionado se bombeó a una columna de Proteína A (Pharmacia) de 5 ml que había sido equilibrada en un tampón de 20 mM de fosfato sódico, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lavó ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluída se neutralizó inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contenían 275 μ l de tampón de Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento, tal como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad se calculó mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales por degradación Edman.

[0285] El PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868 también se produjeron mediante la expresión transitoria en células COS.

EJEMPLO 15Expresión de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 en levadura

5 **[0286]** El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 en levadura.

10 **[0287]** En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868, un péptido señal seleccionado y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868. Para la secreción, el ADN que codifica PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, la secuencia señal/líder secretora del factor alfa de la levadura, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de
15 PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868.

20 **[0288]** Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y una separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

25 **[0289]** El PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y, a continuación, concentrando el medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

EJEMPLO 1630 Expresión de PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 en células de insectos infectadas de Baculovirus

[0290] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de PRO301, PRO362 o PRO245 en células de insectos infectadas de Baculovirus.

35 **[0291]** El PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 se fusiona en dirección 5' a una etiqueta epítipo contenida en un vector de expresión de baculovirus. Dichas etiquetas epítipo incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, el PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 o la parte deseada del PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 (tal como la
40 secuencia que codifica el dominio extracelular) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

45 **[0292]** El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharming) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como se describe en O'Reilley et. al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University
50 Press (1994).

[0293] A continuación, el PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 etiquetado con poli-His expresado puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de quilato de Ni²⁺ tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por
55 Rupert et. al., *Nature*, **362**: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonicán dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se depuran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del
60 tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la

línea base a A₂₈₀ con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM de fosfato: 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye las proteínas unidas no específicamente. Después de alcanzar la línea base a A₂₈₀ de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni²⁺-NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 etiquetados con His₁₀ eluidas se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

[0294] Alternativamente, la purificación del PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

[0295] El PRO301, PRO362 y PRO245 se expresaron en células de insectos Sf9 infectadas de baculovirus. Aunque la expresión se realizó en realidad en una escala de 0,5-2 L, se puede escalar fácilmente para preparaciones más grandes (por ejemplo, 8 L). Las proteínas se expresaron como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que la región extracelular de las proteínas se fusionó a una secuencia de región constante de IgG1 que contenía la bisagra, dominios CH2 y CH3 y/o formas etiquetadas con poli-His.

[0296] Tras la amplificación por PCR, las secuencias codificantes respectivas se subclonaron en un vector de expresión de baculovirus (pb.PH.IgG para fusiones de IgG y pb.PH.His.c para proteínas etiquetadas con poli-His) y el vector y el ADN de baculovirus Baculogold[®] (Pharming) se cotransfectaron en células *Spodoptera frugiperdo* ("Sf9") 105 (ATCC CRL 1711), utilizando Lipofectina (Gibco BRL). pb.PH.IgG y pb.PH.His son modificaciones del vector de expresión de baculovirus disponible comercialmente pVL1393 (Phanning), con regiones polienlazadoras modificadas para incluir las secuencias etiqueta His o Fc. Las células se desarrollaron en medio TNM-FH de Hink suplementado con FBS al 10% (Hyclone). Las células se incubaron durante 5 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y posteriormente se utilizó para la primera amplificación viral mediante la infección de células Sf9 en medio TNM-FH de Hink suplementado con FBS al 10% en una multiplicidad de infección aproximada (MOI) de 10. Las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y la expresión de las construcciones en el vector de expresión de baculovirus se determinó mediante la unión por lotes de 1 ml de sobrenadante con 25 ml de gránulos de Ni-NTA (Qiagen) para proteínas etiquetadas con histidina o gránulos de Proteína-A Sefarosa CL-4B (Pharmacia) para proteínas etiquetadas con IgG seguido de análisis SDS-PAGE en comparación con una concentración conocida de patrón de proteína mediante tinción con azul de Coomassie.

[0297] El sobrenadante de la primer amplificación viral se utilizó para infectar una cultivo celular con agitación (500 ml) de células Sf9 desarrolladas en medio ESF-921 (Expression Systems LLC) con una MOI aproximada de 0,1. Las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y se filtró. Se repitieron la unión por lotes y el análisis SDS-PAGE, según sea necesario, hasta que se confirmó la expresión del cultivo celular con agitación.

[0298] El medio acondicionado de las células transfectadas (0,5 a 3 L) se recogió mediante centrifugación para extraer las células y se filtró mediante filtros de 0,22 micras. Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las construcciones de proteínas se purificaron utilizando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añadió imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombeó en una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada en 20 mM de Hepes, pH 7,4, tampón que contenía 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min a 4°C. Después de la carga, la columna se lavó con tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluyó con tampón de equilibrio que contenía 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento que contenía 10 mM de Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se almacenó a -80°C.

[0299] Las construcciones de proteínas con inmunoadhesina (que contenían Fc) se purificaron del medio acondicionado tal y como se indica a continuación. El medio acondicionado se bombeó en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se había equilibrado en 20 mM de tampón fosfato sódico, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lavó extensamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutralizó inmediatamente mediante la recolección de fracciones de 1 ml en tubos que contenían 275 ml de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada se desaló posteriormente en un tampón de almacenamiento tal y como se ha descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad de las proteínas se verificó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PEG) SDS y la secuenciación de aminoácidos N-terminales mediante la degradación de Edman.

[0300] El PRO301, PRO362 y PRO245 también se expresaron en células High-5 infectadas de baculovirus utilizando un procedimiento análogo. Las células High-5 se desarrollaron hasta una confluencia del 50% a 27°C, sin

CO₂, sin penicilina ni estreptomycin. Para cada placa de 150 mm, se mezclaron 30 µg de vector basado en pIE que contenía PRO301, PRO362 o PRO245 con 1 ml de medio Ex-Cell (Medio: Ex-Cell 401, 1/100 L-Glu JRH Biosciences, # 14401-78P, nota: el medio es sensible a la luz), y en un tubo separado, 100 µl de Cellfectin™ (GibcoBRL # 10362-010) se mezclaron con 1 ml de medio Ec-Cell. Los vectores pIE1-1 y pIE1-2 se diseñan para la expresión constitutiva de proteínas recombinantes del promotor iel del baculovirus en las células de insectos transformadas de forma estable (Cartier J. L., *et al.*, *J. Virol.* **68**, 7728-7737) (1994). Los plásmidos sólo difieren en la orientación de los múltiples sitios de clonación y contienen todas las secuencias de promotor que se sabe que son importantes para la expresión génica mediada por ie1 en células de insectos no infectadas, así como el elemento potenciador hr5. pIE1-1 y pIE1-2 incluyen el sitio de iniciación de la traducción de ie1 y se pueden utilizar para producir proteínas de fusión.

[0301] Las dos soluciones se combinaron y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadieron 8 ml de medio Ex-Cell a los 2 ml de la mezcla ADN/Cellfectin™ y se puso en capas sobre las células High-5 lavadas previamente con medio Ex-Cell. La placa se incubó en la oscuridad durante 1 hora a temperatura ambiente. La mezcla ADN/Cellfectin™ se aspiró y las células se lavaron una vez con Ex-Cell para eliminar el exceso de Cellfectin™. Se añadió medio nuevo Ex-Cell (30 ml) y las células se incubaron durante 3 días a 28°C. El sobrenadante se recogió y se determinó la expresión de PRO301, PRO362 o PRO245 mediante unión por lotes de forma similar a la descrita para las células Sf9.

20 EJEMPLO 17

Preparación de anticuerpos que se unen a PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868

[0302] Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868.

[0303] Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en el sector y están descritas, por ejemplo, en Goding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen las proteínas de fusión PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868 purificadas que contienen PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868, y células que expresan PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868 recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse por el experto en la materia sin una gran experimentación.

[0303] Los ratones, tales como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868 emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1–100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se refuerzan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante varias semanas, los ratones también se pueden reforzar con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos de PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868.

[0305] Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales "positivos" para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de PRO301, PRO362, PRO245 y PRO1868. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

[0306] Las células de hibridomas se criban en un ELISA para la reactividad contra PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra PRO301, PRO362, PRO245 o PRO1868 está dentro de la técnica.

[0307] Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones singéneos Balb/c para producir ascites que contienen los anticuerpos monoclonales anti-PRO301, anti-PRO362, anti-PRO245 o anti-PRO1868. Alternativamente, las células de hibridoma pueden desarrollarse en matraces o botellas en rodillo de cultivos de tejidos. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en el fluido ascítico se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

[0308] Se aislaron ADNc de PRO245 y PRO1868 humano de una biblioteca de ADNc colónico humano mediante la hibridación de colonias. Las proteínas de fusión de Fc de IgG1 humana (inmuno adhesinas) de PRO245 (PRO245.Fc, también denominada JAM-IT.Fc o JAM2.Fc) y PRO1868 (PRO1868.Fc o JAM3.Fc) se prepararon tal como se describe en Ashkenazi et al. Curr. Opin. Immun. 9:195 (1997) y se purificaron sobre una columna de proteína A (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA). La identidad se verificó mediante análisis de secuencia N-terminal.

[0309] Se inmunizaron BALB/c hembras y se reforzaron con 10 µg de PRO245.Fc o PRO1868 etiquetado con 8XHis a través de la inyección de almohadillas de las bases de las patas. Se cribaron clones individuales contra PRO245.Fc o PRO1868 etiquetado con 8XHis. Se analizaron los clones seleccionados para la reactividad cruzada contra los miembros de la familia de A33/JAM y Fc de IgG humana. Los clones se valoraron para las densidades celulares individuales y se recibieron. Se descubrió que el clon 12D10.2F9 era reactivo de manera selectiva a JAM2 (PRO245) y no a JAM o JAM3. Se halló que el clon MaJIR1 era reactivo de manera selectiva a JAM3 y no a JAM o JAM2. Ambos clones se aislaron y se utilizaron para la generación de ascites. Los anticuerpos se purificaron sobre una columna de proteína G.

[0310] El anticuerpo anti-PRO245 12D10.2F9 era específico para la interacción con células CHO que expresan PRO245 y no interaccionaba con células CHO que expresan PRO301 (figura 58). Brevemente, el ADNc de PRO245 se amplificó por PCR a partir de una biblioteca de ADNc de colon humano (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) utilizando cebadores específicos para los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante. El fragmento se purificó y ligó en el vector de expresión pSD5, se transfectó en células de ovario de hámster chino (CHO) y se seleccionó tal como se describe en Lucas et al. Nuc. Acids Res. 24:1774 (1996). Los clones celulares estables se cribaron para la reactividad de anticuerpos. Tal como se puede observar en la figura 58, el anticuerpo anti-PRO245 (12D10.2F9) no se unió a CuL8r transfectante de CHO que expresan huJAM. CuL8r interacciona con el anticuerpo anti-huJAM 10A5.

EJEMPLO 18 (ANTECEDENTES)

Aislamiento de clones de ADN que codifica PRO1868 humano mediante la clonación de la expresión

[0311] La identificación de PRO1868 se realizó mediante la transfección transitoria de bibliotecas de ADNc agrupadas que codifican proteínas secretadas y transmembrana en células COS desarrolladas sobre portaobjetos de cámaras de vidrio. Veinticuatro horas después de la transfección, se añadieron PRO245 o fusiones de PRO245-Fc (0,5 µg/ml) y se incubaron durante 30 minutos. Se determinó la unión de PRO245/fusión PRO245-Fc (Klein et al., Nature, 387:717 y 392:210 (1998)). Los clones que eran positivos por la capacidad de unirse a PRO245/fusiones de PRO245-Fc se seleccionaron para una posterior caracterización.

EJEMPLO 19 (ANTECEDENTES)

Inducción de la rediferenciación de condrocitos

[0312] La capacidad de los polipéptidos de la presente invención de inducir la rediferenciación se analizó en condrocitos. Las proteínas con la capacidad de inducir la rediferenciación de condrocitos son útiles para el tratamiento de varios trastornos de huesos y/o cartílagos, tales como, por ejemplo, lesiones deportivas y artritis.

[0313] Se aislaron condrocitos porcinos mediante la digestión durante la noche con colagenasa de cartílago articular de articulaciones metacarpofalangeas de cerdos hembra de 4-6 meses de vida. A continuación, las células aisladas se sembraron a 25.000 células/cm² en Ham F-12 que contenía FBS al 10% y gentamicina 4 µg/ml. Se cambió el medio de cultivo cada tercer día y a continuación las células se sembraron en placas de 96 pocillos a 5.000 células/pocillo en 100 µl del mismo medio sin suero y se añadieron 100 µl del polipéptido PRO1868 de prueba, estaurosporina 5 nM (control positivo) o medio solo (control negativo) para producir un volumen final de 200 µl/pocillo. Después de 5 días de incubación a 37°C, se tomó una fotografía de cada pocillo y se determinó el estado de diferenciación de los condrocitos. Un resultado positivo en el ensayo resultaba cuando se determinaba que la diferenciación de los condrocitos era más similar al control positivo que al control negativo.

[0314] Los polipéptidos PRO1868 dieron positivo para la capacidad de inducir la rediferenciación de condrocitos.

EJEMPLO 20 (ANTECEDENTES)

Sobreexpresión de polipéptidos PRO1868 en tumores cancerosos

[0315] En el presente ejemplo, se examinó el nivel de expresión de polipéptidos PRO1868 en tejidos cancerosos.

Los polipéptidos que se sobreexpresan en tumores cancerosos pueden ser útiles no sólo como marcadores de diagnóstico para la presencia de uno o más tumores cancerosos, sino también pueden servir como dianas terapéuticas para el tratamiento de esos tumores.

5 **[0316]** Para la detección de la sobreexpresión de polipéptidos PRO1868, se utilizaron “microarrays” de ácidos nucleicos para identificar genes expresados diferencialmente en tejidos enfermos en comparación con sus homólogos normales. Utilizando microarrays de ácidos nucleicos, las muestras de ARNm de prueba y control de muestras de tejido de prueba y control se transcriben de manera inversa y se marcan para generar sondas de ADNc. Las sondas de ADNc se hibridan a continuación a un “array” de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. 10 El array se configura de manera que se conocen la secuencia y la posición de cada miembro del array. Por ejemplo, se pueden disponer en un soporte sólido una selección de genes conocidos por expresarse en ciertos estados patológicos. La hibridación de una sonda marcada con un miembro particular del array indica que la muestra de la que derivaba la sonda expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda de una muestra de prueba (tejido enfermo) es mayor que la señal de hibridación de una sonda de la muestra de control (tejido normal), se identifican el gen o genes sobreexpresados en el tejido enfermo. La implicación de este resultado es que una proteína sobreexpresada en un tejido enfermo es útil no sólo como marcador de diagnóstico para la presencia de la condición patológica, sino también como diana terapéutica para el tratamiento de la condición patológica. La metodología de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología microarray es conocida en la técnica.

20 **[0317]** En el presente ejemplo, se estudiaron tumores cancerosos derivados de varios tejidos humanos para la expresión de genes que codifican el polipéptido PRO1868 en relación con tejido humano no canceroso en un intento por identificar los polipéptidos PRO1868 que se sobreexpresan en tumores cancerosos. La preparación de ácidos nucleicos para la hibridación y sondas, portaobjetos y condiciones de hibridación se detallan todos en la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos de No. de Serie 60/193,767, solicitada el 31 de marzo de 2000 y disponible 25 como documento de prioridad de WO2001/74166. Se generaron dos grupos de datos experimentales. En un grupo, se obtuvieron tejido de tumor de colon humano canceroso y tejido de tumor de colon humano no canceroso emparejado del mismo paciente (“control de colon emparejado”) y se analizaron por la expresión de polipéptido PRO1868 utilizando la tecnología de microarray descrita anteriormente. En el segundo grupo de datos, se obtuvo tejido de tumor humano canceroso de una variedad de diferentes tumores humanos diferentes, incluyendo tumores 30 de pulmón y mama, y se comparó con una muestra de control epitelial “universal” que se preparó agrupando tejidos humanos no cancerosos de origen epitelial, incluyendo hígado, riñón y pulmón, el ARNm aislado de los tejidos agrupados representa una mezcla de productos génicos expresados de estos tejidos diferentes. Los experimentos de hibridación por microarray utilizando las muestras de control agrupadas generaron una representación lineal en un análisis de 2 colores. La pendiente de la línea generada en un análisis de 2 colores se utilizó a continuación para normalizar las proporciones de (detección prueba:control) en cada experimento. Las proporciones normalizadas de 35 varios experimentos se compararon a continuación y se utilizaron para identificar la agrupación de la expresión génica. De este modo, la muestra de “control universal” agrupada no sólo permitía determinaciones relativas efectivas de la expresión génica en una comparación simple de dos muestras, sino que también permitía comparaciones con múltiples muestras a lo largo de varios experimentos.

40 **[0318]** Se utilizaron sondas de ácidos nucleicos de las secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido PRO1868 descrito aquí en la creación del microarray y se utilizó ARN de los tejidos tumorales indicados anteriormente para la hibridación al mismo. Un valor basado en la proporción normalizada:proporción experimental se designó como “proporción de corte”. Sólo los valores que estaban por encima de esta proporción de corte se 45 determinaron como significativos. Los polipéptidos PRO1868 de la presente invención se sobreexpresan de manera significativa en varios tejidos de tumores humanos, por ejemplo, tumores de pulmón y mama, en comparación con control de tejido humano no canceroso.

50 **[0319]** Estos datos indican que los polipéptidos PRO de la presente invención son útiles como marcadores de diagnóstico y dianas terapéuticas para el tratamiento de tumores.

EJEMPLO 21 (ANTECEDENTES)

Inducción de la proliferación celular

55 A. Proliferación de células endoteliales

60 **[0320]** Se analizó la capacidad de polipéptidos de la invención para inducir la proliferación en células endoteliales en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC, Cell Systems). Los polipéptidos con la capacidad de inducir la proliferación de células endoteliales actúan como factores de crecimiento útiles.

[0321] En el día 0, se pusieron en placas de 96 pocillos células endoteliales de vena umbilical humana agrupadas (de líneas celulares, máximo de 12-14 pasajes) a 1000 células/pocillo por 100 microlitros y se incubaron durante la noche en medio completo [medio de crecimiento de células epiteliales (EGM, Clonetics), más suplementos: factor de crecimiento epitelial humano (hEGF), extracto de cerebro bovino (BBE), hidrocortisona, GA-1000; y suero bovino fetal (FBS, Clonetics)]. En el día 1, se sustituyó el medio completo por medio basal [EGM más FBS al 1%] y la adición de polipéptidos PRO1868 a 1%, 0,1% y 0,01%. En el día 7, se realizó una valoración de la proliferación celular mediante el ensayo de ALAMAR BLUE™ seguido de Violeta Cristal. Los resultados se expresaron como el % de crecimiento celular observado con tampón de control.

[0322] Los polipéptidos PRO1868 dieron positivo en este ensayo para la capacidad de inducir la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana agrupadas en cultivo, y como resultado, para actuar como factores de crecimiento útiles.

B. Proliferación de células de músculo liso de arteria coronaria humana

[0323] La capacidad de los polipéptidos de la invención de inducir la proliferación celular se analizó en células de músculo liso de arteria coronaria humana en cultivo. Los polipéptidos de la invención con la capacidad de inducir la proliferación celular son útiles como factores de crecimiento.

[0324] En el día 0, se pusieron en placas de 96 pocillos células de músculo liso de arteria coronaria humana (de líneas celulares, máximo de 12-14 pasajes) a 1000 células/pocillo por 100 microlitros y se incubaron durante la noche en medio completo [medio de crecimiento de músculo liso (SmGM, Clonetics), más suplementos: insulina, factor de crecimiento epitelial humano (hEGF), factores de crecimiento de fibroblastos humanos (hFGF), GA-1000; y suero bovino fetal (FBS, Clonetics)]. En el día 1, se sustituyó el medio completo por medio basal [SmGM más FBS al 1%] y la adición de polipéptidos PRO1868 a 1%, 0,1% y 0,01%. En el día 7, se realizó una valoración de la proliferación celular mediante el ensayo de ALAMAR BLUE™ seguido de Violeta Cristal. Los resultados se expresaron como el % de crecimiento celular observado con tampón de control.

[0325] Los polipéptidos PRO1868 dieron positivo en este ensayo para la capacidad de inducir la proliferación de células de músculo liso de arteria coronaria humana en cultivo y de actuar como factores de crecimiento útiles.

EJEMPLO 22

Expresión de ARNm y polipéptido PRO

A. Hibridación In Situ e inmunohistoquímica

[0326] Se evaluó la expresión de ARNm de PRO362, PRO245 y PRO1868 mediante hibridación in situ, inmunohistoquímica y RT-PCR en varios tipos de tejidos.

[0327] Para la hibridación in situ, se fijaron tejidos (formalina al 4%), se bañaron en parafina, se seccionaron (3-5 µm de grosor), se desparafinaron, se desproteinaron (20 µg/ml) con proteinasa K (15 minutos a 37°C), y se procesaron para la hibridación in situ. Las sondas para los polipéptidos de la invención se produjeron mediante PCR. Los cebadores incluían los sitios de iniciación de ARN polimerasa T7 o T3 para permitir la transcripción in vitro de sondas codificantes o no codificantes a partir de los productos amplificados. Se hibridaron sondas codificantes y no codificantes marcadas con ³³P-UTP durante la noche (55°C), se lavaron (0,1 X SSC durante 2 horas a 55°C), se sumergieron en emulsión nuclear track NBT2 (Eastman Kodak, Rochester, NY), se expusieron (4-6 semanas a 4°C), y se revelaron y contratiñeron con hematoxilina y eosina. Normalmente se muestran imágenes emparejadas representativas de campo brillante y oscuro.

[0328] Se realizó la tinción inmunohistoquímica en secciones congeladas de 5 mm de grosor utilizando un Autoteñidor DAKO. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena con una solución de bloqueo de Kirkegaard y Perry (1:10, 4 minutos a 20°C). Se utilizó NGS al 10% en TBS/Tween-20 al 0,05% (DAKO) para dilución y bloqueo. Se utilizó mAb 4F722.2 anti-STIgMA (anti-PRO362) o IgG de ratón a 0,13 mg/ml. Se utilizó la IgG anti-ratón de cabra biotilada (Vector Labs), Burlingame, CA) a 1:200 y se detectó con el kit Vector Labs Standard ABC Elite (Vector Labs, Burlingame, CA). Los portaobjetos se reveló utilizando diaminobencidina potenciada con metal Pierce (Pierce Chemicals, Rockford, IL). Se realizó una inmunohistoquímica dual para la expresión de PRO362 (STIgMA) y CD68 en secciones congeladas para demostrar la localización de la expresión de STIgMA en macrófagos. Se utilizaron mAb 4F7.22.2 anti-STIgMA y mAb anti-CD68 KP-1 de (DAKO) y se detectaron mediante ficoeritrina y marcadores FITC, respectivamente.

1. Tejidos examinados

[0329] Se examinó la expresión en una amplia variedad de tejidos y tipos de células de humanos y otros mamíferos.

5 a. Tejido normal

[0330] Los tejidos adultos humanos normales que se examinaron incluían amígdalas, nódulo linfático, bazo, riñón, vejiga urinaria, pulmón, corazón, aorta, arteria coronaria, hígado, vesícula biliar, próstata, estómago, intestino delgado, colon, páncreas; glándula toroidal, piel, glándula adrenal, placenta, útero, ovario, testículos, retina y cerebro (cerebelo, bulbo raquídeo, córtex cerebral). También se analizaron tejidos fetales humanos normales que incluían cerebro de E12-E16 de semanas vida, bazo, intestinos y tiroides. Además, se investigó la expresión en hígado murino.

15 b. Tejido inflamado

[0331] Los tejidos inflamados mediante hibridación in situ incluían tejidos con enfermedad inflamatoria crónica, tales como pulmones con asma crónica, bronconeumonía crónica, bronquitis crónica/enfermedad pulmonar obstructiva crónica, riñones con nefritis intersticial linfocítica crónica, e hígados con inflamación crónica y cirrosis debido a la infección por hepatitis C crónica, hepatitis autoinmune o cirrosis alcohólica.

20 c. Neoplasmas primarios

[0332] Los neoplasmas humanos primarios que se examinaron mediante hibridación in situ para la expresión de PRO362, PRO245 y PRO1868 incluían carcinoma de mama, carcinoma de célula escamosa pulmonar, adenocarcinoma pulmonar, adenocarcinoma prostático y adenocarcinoma colónico.

2. Resultados

30 a. Expresión de PR0362

[0333] Se observó que PRO362 se expresaba en secciones congeladas de hígado de ratón (figura 23), secciones congeladas de hígado humano (figura 24) y un conjunto de células similares a macrófagos tisulares, incluyendo macrófagos de colon (figura 25A), células Kupffer (figura 25B), macrófagos adrenales (figura 25C), células Hofbauer (figura 25D), células sinoviales (figura 26), macrófagos alveolares, macrófagos residentes en lamina propria intestinal y macrófagos intestinales en muchos tejidos. PRO362 también se expresó significativamente en microglia de cerebro. La expresión de PRO362 se incrementó significativamente en estos tejidos cuando se activó mediante la presencia de neoplasia o enfermedad inflamatoria, incluyendo artritis reumatoide (figura 27), enfermedad inflamatoria del intestino, hepatitis crónica (figura 28), neumonía, asma crónica (figura 29), glioma (figura 30) y bronquitis.

[0334] Para examinar adicionalmente la expresión de PRO362, se realizó una tinción inmunohistoquímica en varios tipos de tejido. Se realizó una tinción inmunohistoquímica dual para PRO362 y CD68 en macrófagos tisulares, incluyendo macrófagos de glándulas adrenales, células Kupffer de hígado, células microgliales de cerebro y células Hofbauer de placenta para determinar si PRO362 y CD68 se expresan en los mismos tejidos.

[0335] Se observó que PR0362 se coexpresaba con CD68 en macrófagos de glándulas adrenales (figura 35), células Kupffer de hígado (figura 36), células microgliales de cerebro (figura 37) y células Hofbauer de placenta (figura 38).

50 b. Expresión de PRO245

[0336] Se observó que PRO245 se localizaba significativamente en tejido epitelial y tejidos inflamatorios.

55 (i) Tejido normal

[0337] La expresión de ARNm de PRO245 en tejidos humanos adultos normales fue significativa en las vénulas del endotelio alto (HEV) en amígdalas y nódulos linfáticos (figura 31), las células espermatogénicas del epitelio en los túbulos seminíferos testiculares (figuras 32I y J) y los trofoblastos intermedios de la placenta.

[0338] La expresión de ARNm de PRO245 en tejidos fetales humanos normales fue significativa en células endoteliales, pero más específicamente, se observó en el endotelio vascular de vasos sanguíneos pequeños y

grandes (excluyendo capilares), en vasos mesentéricos, vasos murales de la pared intestinal y vasos pequeños de los nódulos linfáticos mesentéricos en desarrollo y la tiroides.

5 **[0339]** La expresión de PRO245 no fue significativa en el bazo, la piel normal o la frente, el pulmón normal, tiroides, intestinos normales, tejido cardiaco normal o glándulas adrenales.

(ii) Tejido inflamado

10 **[0340]** La expresión de PRO245 era más extensa en tejidos con enfermedades inflamatorias crónicas. En biopsias de pulmón con bronconeumonía crónica, el ARNm de PRO245 se expresó en el endotelio de arteriolas calibre pequeño (Figuras 32A y B), medianas (Figuras 32C y D), y grandes (Figuras 32E y F) presentes en los focos de inflamación linfocítica o inmediatamente adyacentes a los mismos. El ARNm de PRO245 no se observó en tejido de pulmón normal (Figuras 32G y H). Además, se observó que el PRO245 se expresaba de manera significativa en el
15 endotelio vascular en la inflamación activa o crónica en los siguientes: arteriolas, venas y capilares de tejidos asociados con neumonía intersticial crónica, vasos dérmicos superficiales de piel psoriática de tejidos asociados con psoriasis, arteriolas de tejidos asociados con nefritis esclerosante crónica, endotelio vascular y capilares en focos inflamados de tejidos asociados con apendicitis, endotelio de numerosos vasos, HEV, capilares, arteriolas pequeñas y venas de tejidos asociados con las amígdalas y senos perifoliculares, y capilares en tejidos intersticial periarterial en aorta y aorta asociada con aterosclerosis. El PRO245 no se expresó de manera significativa en íntima aórtica.

20 **[0341]** En biopsias de riñón con nefritis intersticial linfocítica crónica e hígado con hepatitis linfocítica crónica, la expresión de PRO245 fue significativa en el endotelio de arteriolas en sitios de inflamación linfocítica o adyacentes los mismos. La expresión de PRO245 no fue significativa en hígado inflamado crónicamente o cirrótico.

25 **[0342]** En biopsias de hígado con inflamación crónica y cirrosis, el PRO245 no se expresó de manera significativa.

[0343] La expresión de PRO245 no se expresó de manera significativa en intestino grueso inflamado o cerebro con meningitis.

30 (iii) Tejido neoplásico

[0344] La expresión de PRO245 se observó en el endotelio de arteriolas de calibre pequeño y mediano en un conjunto de neoplasmas primarios, incluyendo adenocarcinoma colónico, carcinoma testicular (figuras 33A y B), adenocarcinoma pulmonar (Figuras 33C y D), adenocarcinoma mamario (Figuras 33E y F) y de manera significativa
35 en adenocarcinoma prostático y adenocarcinoma colónico. El ARNm de PRO245 se observó que se expresaba en carcinoma de mama (figura 34). Sin embargo, el PRO245 no se expresaba de manera significativa en tejido de mama normal adyacente, tal como se muestra en las figuras 33G y H, donde en carcinoma de mama se indica con un asterisco y el tejido de mama normal con una flecha. La expresión de PRO245 se observa únicamente en vasos adyacentes al tumor (puntas de flecha), pero no en tejido normal.

40 **[0345]** La expresión de PRO245 se observó en el endotelio vascular de la epididimis y en áreas de inflamación linfocítica crónica en carcinomas testiculares o seminomas, en el endotelio vascular de focos tumorales en áreas de inflamación linfocítica crónica de adenocarcinoma de pulmón, en el endotelio vascular en focos tumorales en áreas de inflamación linfocítica crónica en carcinoma de células escamosas de pulmón, en el endotelio vascular adyacente
45 a focos tumorales y en áreas de inflamación linfocítica crónica de carcinomas de mama, y en áreas adyacentes a endotelio vascular en arteriolas, venas y capilares en condrosarcomas.

c. Expresión de PRO1868

50 **[0346]** Se encontró que PRO2868 se expresaba en células NK, células T CD8+ y células dendríticas.

B. Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR)

55 **[0347]** La Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Inversa (RT-PCR) es una técnica sensible para la detección de ARNm y la cuantificación que consiste en la síntesis de ADNc de ARN mediante transcripción inversa. Para detectar la expresión de PRO1868, se detectó la presencia de ARNm de PRO1868 mediante RT-PCR.

[0348] El ARNm de PRO1868 se detectó significativamente mediante PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR) en líneas celulares T, J45 y Molt5, pero no en líneas de células B, JY, RPMI8866 y RAMOS (Figura 39).

EJEMPLO 22 (ANTECEDENTES)Interacción de PRO245 con tipos de células específicas

5 **[0349]** Tal como se determina mediante citometría de flujo, las células de sangre periférica no expresan de manera significativa PRO245 (tabla 6, mitad superior). Para determinar si PRO245 interaccionaba con subgrupos discretos de células de sangre periférica, se realizaron un conjunto de ensayos con células de PRO245. Éstos incluían clasificación magnética o FACS de células que interaccionaban con PRO245. La sangre periférica se obtuvo para todos los experimentos tal como se describe a continuación.

10 A. Clasificación magnética y citometría de flujo

[0350] Para determinar si PRO245 interacciona con leucocitos de sangre periférica, se generó una proteína de fusión de PRO245-IgG humana biotinilada, tal como se describe a continuación. Se aislaron los leucocitos de sangre periférica que interaccionaban con PRO245 utilizando perlas magnéticas conjugadas a estreptavidina. A 15 continuación, se examinaron las células aisladas por la expresión de Ag CD de superficie. Los resultados obtenidos utilizando la fusión PRO-245 IGG humana biotinilada se compararon con los resultados utilizando IgG humana biotinilada.

20 **[0351]** Las proteínas de fusión PRO245-IgG humana o proteínas IgG1 humanas se incubaron durante 1 hora a 4°C con PBMC (10^7 $\mu\text{g}/10^7$) en tampón SerFr (FBS al 10% (v/v; Life Technologies) más NaN_3 al 0,1% (p/v; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) en HBSS sin rojo fenol o bicarbonato de sodio (HBSS+; Life Technologies) tamponado con HEPES 10 mM (Life Technologies), pH 7,4). Las células se lavaron en tampón SerF y se resuspendieron a $80 \mu\text{l}/10^7$ células. Se añadieron perlas magnéticas de estreptavidina (Miltenyi Biotec) a $20 \mu\text{l}/10^7$ células y se incubaron durante 15 minutos a 4°C, se lavaron con tampón SerF, se resuspendieron a $500 \text{ ml}/10^8$ células, y se pasaron sobre una 25 columna de MACS se selección positiva. Las células seleccionadas positivamente se eluyeron según las instrucciones del fabricante, se lavaron con tampón SerF, y se analizaron mediante citometría de flujo para Ags CD de superficie a 2×10^5 células según la condición. Los datos se presentan como el porcentaje positivo, representando las células teñidas positivamente en un total de 2×10^5 células recogidas según la condición de tinción para citometría de flujo.

30 1. Conjugación de proteínas

[0352] Se biotinilaron la fusión PRO245-IgG humana, IgG1 humana o la fusión PRO362-IgG humana con 200 μg de EZ-Link sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce) por 1 mg de proteína en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. La 35 biotinilación se detuvo con la adición de (concentración final) Tris 200 mM, pH 8, y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las proteínas biotiniladas se dializaron de manera extensa contra PBS y se concentraron hasta una concentración de 2 mg/ml con microconcentradores Centricon 10 (Millipore, Bedford, MA).

40 **[0353]** Se utilizó el kit de conjugación de proteínas Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR) según las instrucciones del fabricante para la conjugación de Alexa-488 sobre la fusión de PRO245-IgG humana o IgG1 humana.

2. Citometría de flujo

45 **[0354]** Las células para utilizar en análisis por citometría de flujo se bloquearon durante 30 minutos a 4°C con tampón SerF y se tiñeron con Abs para CD3, CD4, CD8, CD14, CD19 o CD56, conjugados a FITC, PE, o CyChrome (BD PharMingen, San Diego, CA).

3. Resultados

50 **[0355]** Se encontró que las siguientes cuatro poblaciones de leucocitos de sangre periférica interaccionaban con PRO245: células T (CD3+), células CD8+, células B (CD19+) y células NK (CD56+). El porcentaje de células que eran capaces de interaccionar con PRO245 en un único experimento fueron los siguientes: 20,99% para células CD3+, 6,68% para células CD8+, 9,66% para células CD19+, y 36,89% para células CD56+. El porcentaje de 55 células que eran capaces de interaccionar con el control de IgG humana fueron los siguientes: 2,39% para células CD3+, 1,78% para células CD8+, 4,42% para células CD19+, y 6,69% para células CD56+.

B. Clasificación FACS y citometría de flujo

60 **[0356]** Las células de sangre periférica que se unen a la proteína de fusión de PRO245-IgG humana se clasificaron

mediante clasificación FACS.

[0357] Para la clasificación FACS, las células se incubaron (30 minutos a 4°C) con IgG1 humana conjugada a Alexa-488 o proteína de fusión PRO245-IgG humana (10 µg/10⁶ células) en un tampón SerF modificada (tampón SerF con 5 µg/ml de Ab anti-CD16 3G8 (BD PharMingen) y 20 µg/ml de IgG1 humana (Calbiochem, San Diego, CA)), se lavaron y se clasificaron en una Elite ESP (Beckman Coulter, Miami, FL). En estas condiciones, PRO245 conjugado a Alexa-488 o IgG humana se utilizaron como base. Para los ensayos de competición, el competidor (20 µg/10⁶ células) se mezcló con las células durante 20 minutos a temperatura ambiente en tampón SerF antes de introducir la proteína de fusión PRO256-IgG humana conjugada a Alexa-488 o la IgG humana. A continuación, las células se lavaron y analizaron mediante citometría de flujo tal como se ha descrito anteriormente.

[0358] De las células que interaccionan con la proteína de fusión IgG humana-PRO245 (JAM-IT.Fc), el 12,5% eran células T CD3+, el 32,4% eran células T CD8+, y el 50,4% eran células NK CD56+. Las células B CD19+ no se detectaron en el ensayo de clasificación de FACS. De las células NK CD56+, el 22,4% expresaron CD3 y el 40,2% expresaron CD8. De las células T CD8+, el 23,5% expresaron CD3 y el 73,2% expresaron CD56 (figura 40).

Tabla 6. Expresión de PRO245 en células de sangre periférica y la unión de células de sangre periférica a PRO245

Tinción primaria	Tinción secundaria						
	CD3	CD4	CD8	CD14	CD19	CD56	PMN
anti-PRO245 positivo	0,2%	0,1%	0,1%	0,7%	0,1%	0,3%	0,9%
anti-PRO301 positivo	76,7%	73,9%	80,4%	99%	90%	85%	98,7%
IgG anti-ratón positivo	0,25%	0,1%	0,1%	0,7%	0,1%	0,3%	0,9%
Porcentaje total de células que se unen a PRO245	12,6%	1,1%	32,4%	0,3%	0,4%	50,4%	NA
Porcentaje de células positivas CD56 que se unen a PRO245	22,4%	0,2%	40,2%	0,5%	0,4%		NA
Porcentaje de células positivas CD8 que se unen a PRO245	23,5%	0,1%		0,6%	0,3%	73,2%	NA

C. Unión a células purificadas

[0359] Se analizaron células B purificadas, monocitos CD14+, células dendríticas de sangre periférica (PBDC) de Clonetics (San Diego, CA), células NK CD56+ de sangre periférica obtenidas mediante selección negativa, y J45, una línea de células T CD3+, por su capacidad de interaccionar con la proteína de fusión PRO245-IgG humana conjugada a Alexa-488 mediante citometría de flujo. La capacidad de interaccionar con proteína IgG1 humana conjugada con Alexa 488 se analizó a la vez como control.

[0360] Se obtuvo sangre de voluntarios adultos sanos mediante punción en vena y se separó utilizando Ficoll-Plaque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones del fabricante. Se obtuvieron PBMC de la interfase, se lavaron en PBS frío, se lisaron (con NaCl al 0,2% durante 30 segundos y se neutralizaron con NaCl al 1,6%) según fuera necesario, se contaron y se mantuvieron en hielo a 5x10⁷ células/ml hasta la utilización. Mediante análisis por citometría de flujo, no se observaron plaquetas contaminantes en las fracciones de PBMC purificadas. Se obtuvieron neutrófilos del pélet después de la lisis de RBC contaminantes. Los neutrófilos se lavaron en PBS frío, se contaron y se mantuvieron a 5x10⁷ células/ml hasta la utilización en hielo. Para subgrupos de sangre periférica aislada, se utilizaron kits MACS “no tocados” (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0361] Las células B purificadas, neutrófilos y monocitos CD14+ no interaccionaban con la proteína de fusión PRO245-IgG humana determinado mediante citometría de flujo. Sin embargo, se encontró que un conjunto de otros tipos de células interaccionaban con PRO245.Fc. La figura 41 muestra que PRO245.Fc interacciona con células NK CD56+. Esta interacción era específica, ya que era bloqueada por la adición de un anticuerpo anti-PRO245. Se encontró que PRO1868 (también denominado 77624, JAM3 y SHATr) bloqueaba la interacción de PRO245 y células

NK CD56+ (Figura 46, parte inferior y la Figura 53, parte inferior a la derecha). La adición de PRO1868 (JAM3) etiquetado con His no marcado bloqueaba el desplazamiento en la fluorescencia observada con la adición de PRO245.Fc. Por otro lado, tal como se puede ver en la figura 53, parte superior derecha, la adición de PRO301 no bloquea la interacción de PRO245 y células NK.

[0362] Las células dendríticas de sangre periférica (PBDC) también interaccionan con, pero no expresan PRO245 (figura 42). Las PBDC se obtuvieron de Clonetics. La figura 41I muestra que PRO245.Fc (línea continua) interacciona de manera intensa con las PBDC en comparación con la IgG1 humana (histograma sombreado). Sin embargo, no se observó que PBDC expresara PRO245 (Figura 41II; histograma relleno con IgG de ratón; anticuerpo anti-PRO245 12D10.2F9 – línea continua).

[0363] Además, se encontró que las células T J45, que no presentan una expresión de PRO245 en superficie detectable, interaccionaban con PRO245 (figuras 43 y 44). La interacción entre la proteína de fusión PRO245-Fc conjugada a Alexa-488 y las células J45 se detectó mediante el desplazamiento en el pico de fluorescencia cuando se comparó con la IgG1 humana conjugada (figura 44). El desplazamiento se bloqueó mediante la adición de anticuerpo anti-PRO245 (figura 44). La interacción entre la proteína de fusión PRO245-Fc conjugada a Alexa-488 y las células J45 también se inhibió por PRO1868 no marcado (proteína PRO1868-His) (figura 45). Además, se encontró que un anticuerpo anti-PRO1868 (MAJIR1) inhibía la adhesión de J45 dependiente de PRO245, mientras que la IgG de ratón no presentaba ningún efecto sobre la adhesión (figura 52).

[0364] Por consiguiente, los tipos de células que interaccionaban con PRO245 fueron: células CD56+, incluyendo células NK CD56+, células T/NK CD56+CD3+, células T citotóxicas CD56+CD3+CD8+, PBDC y células T J45. Además, el exceso de proteína 1868 inhibía la unión de PRO245 a células J45 y células NK CD56+, y los anticuerpos anti-PRO1868 inhibía la unión de PRO245 a células NK CD56+.

D. Ensayo de adhesión basado en placas

[0365] Para el análisis basado en placas de células que son capaces de interaccionar con PRO245, se recubrieron pocillos de microtitulación (placas de 96 pocillos NUNC Maxisor; VWR, Scientific Products, Brisbane, CA) con condiciones a 50 µl/pocillo (en HBSS+), 10 µl/ml durante 2 horas a temperatura ambiente, a menos que se indique lo contrario. Para ensayos de adhesión, se recubrieron primero 50 µl de 10 µg/ml de Ab específico de Fc de IgG1 anti-humana de cabra, por ejemplo, la proteína de fusión PRO245-IgG humana, y se bloquearon antes de la adición de condiciones en tampón de unión/bloqueo (BBB; HBSS+ que contenía FBS al 10% (v/v)) durante 1 hora a temperatura ambiente antes de la adición de la condición de recubrimiento. Las células (5×10^6 células/ml en BBB) se trataron (10 minutos a 37°C con CO₂ al 5%) con 5 mg/ml 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5 (y -6)-carboxifluoresceína, éster acetoximetílico (BCECF AM) (Molecular Probes), se lavaron, y se dejaron adherir a pocillos recubiertos (2×10^5 células/pocillo en BBB) durante 1 hora a 37°C/5% CO₂.

[0366] Las placas se leyeron en un lector de fluorescencia en placas SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) para el total de fluorescencia aplicada, se lavaron suavemente tres veces (mediante aspiración con una aguja de calibre 28) y se leyeron para el total de fluorescencia de adherente. Se calculó el porcentaje de adherencia utilizando la siguiente ecuación: ((fluorescencia total de adherente)/(fluorescencia total de aplicado)) X 100. Los pocillos de blanco consistían en pocillos recubiertos con BBB expuestos a células J45 marcadas con BCECF AM. Los valores obtenidos de los pocillos de blanco (porcentaje de adherencia) se restaron de todas las condiciones experimentales para derivar en un valor final.

[0367] Utilizando el ensayo de adhesión basado en placas, se observó que las células T J45 se adherían a pocillos recubiertos de la fusión PRO245-IgG humana (VJ2.Fc) (Figura 47). Los anticuerpos anti-PRO245, pero no la IgG de ratón, inhibían la adhesión de células J45 a la proteína de fusión de PRO245-IgG1 humana, indicando que la interacción es específica (figura 47).

EJEMPLO 23 (ANTECEDENTES)

Identificación de receptores para PRO245

[0368] Para identificar la proteína en células que interaccionan con PRO245 que es responsable de la interacción, se realizaron estudios de inmunoprecipitación.

A. Células NK CD56+ y células J45

[0369] Para aislar el receptor de la superficie celular en células J45 o NK para PRO245, las células que

interaccionan con PRO245 se biotinilaron y a continuación se lisaron. Los sobrenadantes de las células lisadas se sometieron a inmunoprecipitación con una matriz de proteína A con la fusión de IgG humana-PRO245 reticulada a Fc. Los precipitados se analizaron mediante transferencia Western.

5 1. Biotinilación

[0370] Para las condiciones de biotinilación, se lavaron primero las células en HBSS+ antes de ser biotiniladas ($200 \mu\text{g}/10^6$ células) con sulfo-NHS-LC-biotina durante 30 minutos a 4°C . Las células se lavaron con TBS durante 30 minutos a 4°C para detener la biotinilación.

10 2. Lisis

[0371] Las células se lisaron (10^8 células/ml) con tampón de lisis (HBSS+ que contiene Triton X-100 al 1% y 1 comprimido de inhibidor de proteasa libre de EDTA Mini-completo (Roche Biochemicals, Indianapolis, IN) por 7 ml de tampón de lisis) durante 30 minutos a 4°C . Los lisados se centrifugaron a $22,000 \times g$ durante 1 hora a 4°C y se filtraron a $0,2 \mu\text{m}$. Los lisados se prepurificaron durante 2 horas a 4°C con $5 \mu\text{l}/10^6$ células de perlas de proteína A recombinante (Amersham Pharmacia Biotech).

20 3. Inmunoprecipitación

[0372] Los lisados purificados se filtraron a $0,2 \mu\text{m}$ y se incubaron durante 2 horas a 4°C con $5 \mu\text{g}/10^6$ células de la proteína de fusión PRO245-IgG humana o IgG1 humana, conjugados a la matriz de proteína A utilizando el kit de Plus Orientation de IgG de Proteína A ImmunoPura (Pierce). Las perlas se agruparon y se lavaron con tampón de lisis y se desnaturalizaron mediante la adición de $15 \mu\text{l}/10^6$ células de tampón de muestra de SDS no reductor (tampón de muestra estándar con yodoacetamida 2 mM pero sin DTT o 2-mercaptoetanol) y se pusieron a ebullición durante 3 minutos a 100°C .

4. Transferencia Western

[0373] Se separaron las muestras a una concentración de $15 \mu\text{l}/\text{carril}$ en un Gel Listo de Tris-HCl Bio-Rad al 4-20% (Bio-Rad, Hercules, CA) y se transfirieron en una membrana de nitrocelulosa Protran $0,2 \mu\text{m}$ (Schleicher & Schuell, Keene, NH) a 100 mA durante 2 horas a 4°C . Las transferencias (blots) se bloquearon durante 1 hora en Blotto (TBS que contenía leche descremada al 5% y TWEENTM 20 al 0,05%; Bio-Rad. Para las muestras biotiniladas, se utilizó estreptavidina conjugada a HRP (Pierce) a $0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para muestras no biotiniladas, se utilizaron anticuerpos anti-PRO1868 (MaJIR1) a $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ en Blotto y se incubaron durante 1 hora a 25°C antes de la aplicación de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ de IgG anti-ratón de cabra conjugada a HRP (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) en Blotto durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las transferencias (blots) se lavaron con intensidad con TTBS (TBS que contenía Tween 20 al 0,05%) y se revelaron con el reactivo ECL Plus (Amersham Pharmacia Biotech) antes de la exposición sobre una película BioMax ML Kodak y el revelado con el Procesador de Películas M35A X-OMAT Kodak (Eastman Kodak).

5. Resultados

[0374] La inmunoprecipitación de muestras biotiniladas con una matriz de proteína A con la fusión de IgG humana-PRO245 reticulada con Fc y el análisis mediante transferencia Western permitieron la identificación de una única banda reactiva de estreptavidina de aproximadamente 40 kDa que interacciona con la fusión PRO245-IgG humana (figura 48). La banda de 40 kDa no estaba presente en inmunoprecipitaciones realizadas con una matriz de proteína A con IgG humana reticulada con Fc, ni en las inmunoprecipitaciones de PRO245 realizadas con una matriz de proteína A con IgG humana reticulada con Fc en la línea de células B Ramos/HH que no se une a PRO245.

[0375] Para determinar si la banda de 40 kDa representaba PRO1868, se realizó la inmunoprecipitación sobre muestras no biotiniladas de células Ramos/HH (que no interaccionan con PRO245), células MOLT4 (que se unen a PRO245) y PBMCs (que se unen a PRO245) con matrices de proteína A con la fusión de IgG humana-PRO245. Los precipitados se analizaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-PRO1868. La inmunotransferencia verificó que la banda que interacciona con PRO245 de 40 kDa representaba PRO1868 (figura 49).

6. Confirmación de la unión entre PRO245 y PRO1868 mediante ELISA

[0376] Utilizando anticuerpos anti-PRO1868, proteínas de fusión de PRO245 y PRO1868 purificadas, se confirmó la interacción entre PRO245 y PRO1868 en un ensayo basado en placas. Se expusieron la proteína de fusión

PRO2868-Fc (JAM3.Fc) unida a placas o una proteína de fusión PRO301-Fc humana de control (huJAM.Fc) a la proteína de fusión PRO245-Fc biotinilada en presencia de 0,25 µg/pocillo de IgG de ratón o un Ab anti-PRO1868 (figura 50). Se utilizó HRP con estreptavidina para detectar la unión entre los pocillos recubiertos de proteína de fusión PRO1868-Fc a PRO245-Fc con biotina. Alternativamente, la fusión de PRO245-Fc se capturó sobre una placa y se utilizó la fusión PRO1868-Fc biotinilada a concentraciones específicas para examinar la interacción PRO245-PRO1868 (figura 51). Además, la inhibición de dicha interacción basada en placas entre PRO245 y PRO1869 se analizó por los anticuerpos anti-PRO1868 y anticuerpos anti-PRO245

[0377] Para el ELISA, las placas se bloquearon después del recubrimiento en condición con BBB durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con las condiciones de unión durante 1 hora a temperatura ambiente. Para condiciones que requieren EDTA, se utilizó BBB modificado (HBSS sin EDTA que contiene calcio y magnesio en lugar de HBSS+ normal) a lo largo del experimento. Las placas se lavaron tres veces, se incubaron con 1 µg/ml de HRP con estreptavidina (Pierce) durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se evaluó mediante el revelado de color utilizando el sustrato de tetrametilbencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD) y se leyeron sobre el lector de Microplacas ThermoMax (Molecular Devices).

[0378] Se identificó la interacción entre PRO245 y PRO1868 a través de ensayos basados en placas (figuras 50 y 51). La figura 50 muestra que los pocillos recubiertos con PRO1868.Fc (JAM3.Fc) demostraron la unión a PRO245.Fc, mientras que los pocillos cubiertos con PRO301.Fc no lo hicieron. La IgG de ratón (MIgG) no presentaba efecto en la unión, mientras que el anticuerpo anti-PRO1868 (MaJIR1) inhibía la unión a PRO245. Cuando PRO245.Fc se unía a la placa (figura 51), se observaba de Nuevo la interacción de PRO245.Fc y PRO1868.Fc. Además, el anticuerpo anti-PRO1868 MaJIR1 era de nuevo capaz de inhibir la interacción, mientras que la IgG de ratón no presente el efecto.

B. Panel de potenciales receptores

[0379] El polipéptido PRO245 se incubó con un panel de potenciales moléculas receptoras con el objetivo de identificar la interacción del receptor/ligando. La identificación de un ligando para un receptor conocido, un receptor para un ligando conocido o una pareja nueva de receptor/ligando es útil para una variedad de indicaciones, incluyendo, por ejemplo, dirigir moléculas bioactivas (unidas al ligando o el receptor) a una célula conocida por expresar el receptor o ligando, utilizar el receptor o ligando como reactivo para detectar la presencia del ligando o receptor en una composición sospechosa de contener a los mismos, donde la composición puede comprender células sospechosas de expresar el ligando o el receptor, la modulación del crecimiento de u otra actividad biológica o inmunológica de una célula conocida por expresar o responder al receptor o ligando, la modulación de la respuesta inmune de células o hacia células que expresan el receptor o el ligando, permitir la preparación de agonistas, antagonistas y/o anticuerpos dirigidos contra el receptor o ligando que modularán el crecimiento de o una actividad biológica o inmunológica de una célula que expresa el receptor o ligando y varias otras indicaciones que serán evidentes para el experto en la materia.

[0380] Un polipéptido PRO245 de la presente invención sospechoso de ser un ligando para un receptor se expresa como una proteína de fusión que contiene el dominio de Fc de IgG humana (una inmunoadhesina). La unión de receptor-ligando se detecta permitiendo la interacción del polipéptido inmunoadhesina de PRO245 con células (por ejemplo, células COS) que expresan los receptores candidatos, incluyendo el receptor de polipéptido PRO1868, y la visualización de la inmunoadhesina unida con reactivos fluorescentes dirigidos hacia el dominio de fusión de Fc y el examen por microscopio. Las células que expresan receptores candidatos se producen mediante transfección transitoria, en paralelo, de subgrupos definidos de una biblioteca de vectores de expresión de ADNc, por ejemplo, que codifican polipéptidos PRO1868, que pueden actuar como moléculas receptoras. A continuación, las células se incuban durante 1 hora en presencia de la inmunoadhesina de polipéptido PRO245 bajo análisis para la posible unión a receptor. A continuación, las células se lavan y se fijan con paraformaldehído. A continuación, las células se incuban con anticuerpo conjugado a fluorescente dirigido contra la parte Fc de la inmunoadhesina de polipéptido PRO245 (por ejemplo, anticuerpos anti-Fc humano de cabra conjugado a FITC). A continuación, las células se lavan de nuevo y se examinan por microscopio. Una interacción positiva se dicta por la presencia de marcaje fluorescente de células transfectadas con ADNc que codifica un receptor o grupo de receptores de polipéptido PRO1868 particular y la ausencia de marcaje fluorescente similar de células preparadas de forma similar que han sido transfectadas con otros ADNc o grupos de ADNc. Si se dicta un grupo definido de vectores de expresión de ADNc como positivos para la interacción con una inmunoadhesina de polipéptido PRO245, la especie individual de ADNc que comprende el grupo se analiza individualmente (se "rompe" el grupo) para determinar el ADNc específico que codifica un receptor capaz de interactuar con la inmunoadhesina de polipéptido PRO245.

[0381] En otra realización de este ensayo, se deja que un potencial polipéptido PRO245 ligando etiquetado con epítopo (por ejemplo, 8 etiquetas de "His") interactúe con un panel de potenciales moléculas de polipéptido

receptoras que se han expresado como fusiones con el dominio Fc de IgG humana (inmunoadhesina). Después de una coincubación de 1 hora con el polipéptido PRO245 etiquetado con epítipo, los receptores candidatos se inmunoprecipitan cada uno con perlas de proteína A y las perlas se lavan. La interacción del potencial ligando se determina mediante análisis por transferencia western de los complejos inmunoprecipitados con anticuerpo dirigido hacia el epítipo etiqueta. Una interacción de indica que sucede si una banda del peso molecular anticipado de la proteína etiquetada con epítipo se observa en el análisis de transferencia western con un receptor candidato, pero no se observa que tenga lugar con los otros miembros del panel de potenciales receptores.

[0382] Utilizando estos ensayos, se han identificado aquí las siguientes interacciones receptor/ligando: PRO245 (DNA35638-1141) se une a PRO1868 (DNA77624-2515).

C. Proteínas de la familia de JAM

[0383] Se realizó un análisis por citometría de flujo para investigar adicionalmente las interacciones de miembros de la familia de proteínas JAM. Se expresó PRO245 en células CHO tal como se describe en el ejemplo 14. Las células CHO que expresan PRO245 se incubaron a continuación con proteínas JAM etiquetadas con His, incluyendo PRO245, PRO301, y PRO1868. La unión de proteínas PRO362, PRO1868 o PRO301 etiquetados con His a células CHO que expresan PRO245 se analizó mediante citometría de flujo.

[0384] Para la unión de PRO1868 a células CHO que expresan PRO245, se incubaron 5 µg/ml de proteína etiquetada con PRO1868-HIS (SHATr.His) con células CHO que expresan PRO245. PRO1868 (SHATr.His) era capaz de interactuar con células que expresan PRO245 (figura 54). Se examinaron varias proteínas competidoras por su capacidad de inhibir la unión de PRO1868 a PRO245. La proteína PRO1868 (SHATr.His) y el anticuerpo anti-PRO245 (12D10.2F9) eran capaces de competir con la proteína etiquetada con PRO1868-HIS para la unión de PRO245 en la superficie de células CHO (figura 54). En cambio, PRO301.Fc, PR0362.Fc, IgG de ratón y control de no eran capaces de inhibir la unión (figura 54).

[0385] En base a los resultados descritos anteriormente, PRO245 interactúa con PRO1868.

EJEMPLO 24

Implicación de STIgMA (PRO362) en la inflamación crónica

[0386] Se clonó el nuevo receptor asociado a macrófago con homología al antígeno A33 y JAM1 tal y como se describe en el Ejemplo 2 y más adelante, y se identificó como el miembro de la superfamilia de Ig un dominio transmembrana asociado a macrófago (STIgMA o PR0362 o JAM4).

[0387] Se expresa STIgMA como dos variantes empalmadas, una que contiene un dominio de tipo IgV N terminal y un dominio de tipo IgC2 C-terminal y una forma empalmada que carece del dominio C-terminal. Ambos receptores tienen un solo dominio transmembrana y un dominio citoplasmático que contiene residuos de tirosina que están constitutivamente fosforilados en macrófagos *in vitro*.

[0388] El presente estudio demuestra que STIgMA se expresa de modo selectivo en un subconjunto de macrófagos residentes en el tejido, y se asocia con la inflamación crónica.

Materiales y procedimientos

Células

[0389] Se obtuvo sangre de voluntarios adultos sanos mediante punción venosa y se separó utilizando Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech) según las instrucciones de los fabricantes. Se obtuvieron PBMC de la interfase, se lavaron en PBS frío, se lisaron con NaCl al 0,2% durante 30 s y se neutralizaron con NaCl al 1,6%. Se contaron las células y se guardaron en hielo hasta su uso. Para aislar subgrupos de sangre periférica aislada, se utilizaron los kits de MACS sin tocar (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Para cultivar macrófagos diferenciados, se transfirieron monocitos seleccionados negativamente a placas de cultivo de 6 pocillos en HGD MEM que contenía suero bovino fetal al 20% y suero humano al 10%. Se reemplazó el medio en el día 5. Para el análisis citométrico de flujo, se disociaron las células de la placa de cultivo utilizando solución de disociación celular enfriada en hielo (Sigma). Se prepararon los lisatos para el análisis de transferencia Western mediante la adición de 0,5 ml de tampón de lisis directamente a los pocillos. Se mezclaron los lisatos con tampón de muestra que contenía SDS y beta-mercaptoetanol, se desarrollaron en un gel de Tris-Glicina y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa.

Citometría de flujo.

5 **[0390]** Se bloquearon células para su uso en un análisis de citometría de flujo durante 30 min a 4°C con PBS que contenía suero bovino fetal al 2% e IgG humana 5 µg/ml (Calbiochem, San Diego, CA). A continuación, se incubaron células con 3C9, un anticuerpo monoclonal anti-STIgMA (anti-PRO362). Después del lavado en PBS, se tiñeron las células con anticuerpos conjugados a ficoeritrina (PE) para CD11b, CD14, CD163, CD 15, CD68 obtenidos de Pharmigen.

Estudios de adhesión célula-célula

10 **[0391]** Se expresó de forma estable un vector de expresión de pRK que contenía STIgMA de longitud completa en una línea de células T Jurkat utilizando selección de neomicina y clasificación de autoclones tal y como está descrito. Se precargaron células con el colorante fluorescente BCECF (Molecular Probes, Oregon) y se añadieron a una placa Maxisorb de 96 pocillos (CORNING™) cubierta con una monocapa de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) tratada con o sin TNFalfa 10 ng/ml. Se lavaron suavemente las células cargando los pocillos con tampón de incubación (HBSS contenía CaCl 10 mM, magnesio 10 mM y NaCl 1,5 mM) seguido de la inversión de la placa sobre un trozo de papel de transferencia. Después de 3 lavados, se contó la fluorescencia en un fluoroespectrómetro. La lectura fluorescente es representativa del número de células que permanecen adherentes a las células HUVEC.

Análisis de transferencia Northern

20 **[0392]** Se sondaron transferencias (*blots*) Northern de múltiples tejidos (CLONTECH) con una sonda marcada con ³²P de ADNc de STIgMA de longitud completa cebado aleatoriamente utilizando el kit Ambion según las recomendaciones de los fabricantes. Se expusieron las transferencias (*blots*) a un cribado por fosforimagen y se analizaron con un con un formador de fosforimágenes Storm.

Análisis R_tPCR de tiempo real

25 **[0393]** Para el análisis de PCR cuantitativa (TAQMAN™), se recomendó ARNm total de tejidos o células primarias humanas (100 ng) (PerkinElmer Life Sciences) con cebadores basados en la secuencia que codifica STIgMA.

Producción de proteína de fusión de Fc y His

30 **[0394]** Se clonó STIgMA humano en el vector de expresión de baculovirus pHIF (Pharmingen). La proteína de fusión de STIgMA etiquetada con HIS constaba del dominio extracelular de STIgMA fusionado a 8 histidinas. Se purificó la proteína de fusión etiquetada con His del sobrenadante de células de insecto infectadas con baculovirus desarrolladas en suspensión utilizando una resina de afinidad a níquel.

Producción de anticuerpos monoclonales y policlonales

35 **[0395]** Se inmunizaron BALBc hembras y se reforzaron con 10 µg de STIgMA-His8 a través de inyecciones en las almohadillas de las patas, tal y como se ha descrito anteriormente. Se cribaron clones individuales contra STIgMA (PRO362)-His mediante ELISA. Se analizaron clones seleccionados contra los miembros de la familia JAM y Fc de IgG humana. Se valoraron los clones para las densidades celulares individuales y se recibieron. Se observó que el clon 3C9 (IgG1) era selectivamente reactivo a STIgMA. Se utilizaron los clones para la generación de ascites y se purificaron sobre proteína G (Amersham Pharmacia Biotech); se determinó la concentración de proteína utilizando el reactivo BCA de Pierce (Pierce, Rockford, IL).

40 **[0396]** Se generaron anticuerpos policlonales mediante la inyección de 150 µg de STIgMA-His en conejos de Nueva Zelanda. Se determinaron los títulos de suero mediante ELISA. Se recogió el suero en los niveles máximos de IgG circulantes y se purificó sobre una columna de proteína A.

Hibridación In situ

45 **[0397]** Se diseñaron cebadores de PCR, (5'-TCTCTGTCTCCAAGCCCACAG superior (SEC ID N°: 35), y 5'-CTTTGAGGAGCTTTGACC inferior (SEC ID N°: 36) para amplificar un fragmento de 700 bp de huJAM4. Los cebadores incluyeron sitios de iniciación de la ARN polimerasa T7 o T3 para permitir la transcripción in vitro de sondas codificantes y no codificantes, respectivamente, a partir de los productos amplificados. Los tejidos humanos normales incluían amígdala, nódulo linfático, bazo, riñón, pulmón y corazón. Los tejidos con enfermedad inflamatoria crónica incluían pulmón con asma crónica, bronquitis crónica, hígados con inflamación crónica y cirrosis

debida a infección por hepatitis C crónica. Se fijaron los tejidos en formalina al 4%, se bañaron en parafina, se seccionaron (3-2 µm de grosor), se desparafinizaron, se desproteínan con proteinasa K 20 µg/ml (15 min a 37°C) y se procesaron para hibridación *in situ* tal y como se ha descrito.

5 *Immunohistoquímica*

[0398] Se realizó la tinción inmunohistoquímica en secciones congeladas de 5 µm utilizando un autotefñidor DAKO. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con solución de bloqueo de Kirkegaard y Perry (1:10, 4 min 20°C). Se utilizó suero de cabra normal (NGS) al 10% en TBS/Tween-20 al 0,05% para la dilución y el bloqueo. Se utilizó Mab 3C9 a 1 µg/ml. Se revelaron los portaobjetos utilizando diaminobenzidina potenciada con metal (Pierce Chemicals).

[0399] Para la tinción por inmunofluorescencia de las secciones, éstas se bloquearon con PBS/10%NGS y se incubaron con mAb 3C9 durante 1 h a 20°C: Se utilizó un anticuerpo secundario marcado con FITC de conejo anti-ratón conjugado con FITS como agente de detección. Para el procedimiento de doble tinción, se tiñeron las secciones posteriormente con un anticuerpo monoclonal conjugado a PE para CD68 humano.

Resultados

Clonación molecular de STIgMA humano

[0400] Se clonó el HuSTIgMA de una biblioteca de ADNc fetal humano utilizando cebadores de regeneración que reconocen dominios de Ig conservados de JAM1 humano. La secuenciación de diversos clones reveló un marco de lectura abierto de 400 aminoácidos. Las búsquedas con blast confirmaron la similitud con Z39Ig, una proteína transmembrana de tipo 1 (Langnaese et al., Biochim Biophys Acta 1492 (2000) 522-525. La región extracelular de STIgMA consistía en 2 dominios de tipo Ig, que comprenden un dominio V-set N-terminal y un dominio C2-set C-terminal. Utilizando cebadores 3' y 5', una variante de empalme de STIgMA, se clonó STIgMA corto que carecía del dominio IgC proximal de membrana y que es 50 aminoácidos más corto.

Clonación de STIgMA murino y comparación de secuencias con STIgMA humano

[0401] Se buscó en la base de datos de etiquetas de secuencia expresada (EST) de murino utilizando el marco de lectura abierto completo de huSTIgMA (PR0362) y el algoritmo de tblastn. La secuenciación de ADN de 3 clones dio lugar a los marcos de lectura abiertos completos idénticos de 280 aminoácidos. Se utilizaron cebadores a las regiones 3 prima para clonar un transcrito de longitud completa de una biblioteca de bazo de ratón. El clon de murino se parecía a la forma empalmada de huSTIgMA en que carecía del dominio de tipo Ig C-terminal. Se conservó bien el dominio IgV extracelular entre el receptor de humano y de murino con una identidad del 93%. Se conservó de manera escasa el dominio citoplasmático de murino siendo 20 aminoácidos más corto que su homólogo humano y fue un 40% idéntico.

[0402] *STIgMA se expresa en un subgrupo de macrófagos residentes en diversos tejidos y se incrementa su expresión en la inflamación*

[0402] El análisis de transferencia Northern de huSTIgMA mostró dos transcritos de 1,8 y 2,2 kb (Figura 57) con la mayor expresión en la glándula adrenal, el pulmón y la placenta y menor expresión en el corazón, la médula espinal, la glándula tiroidea, la glándula mamaria y el nódulo linfático. En todos los tejidos, el transcrito de 2,2 kb fue el transcrito expresado más abundantemente y presumiblemente, codifica la forma larga de STIgMA.

Análisis PCR a tiempo real de TAQMAN™

[0403] Para identificar líneas celulares específicas que expresan STIgMA, se utilizó PCR cuantitativa a tiempo real y cebadores/sondas específicas para el dominio de Ig N-terminal. Se observó una expresión de ARNm baja, pero detectable, en la línea celular mielóide HL-60 tratada con PMA y la línea celular monocítica THP-1. No se observó expresión en las líneas de célula B y T (Figura 58A).

[0404] *Expresión de STIgMA (FRO362) en monocitos diferenciados.*

[0404] Con el objetivo de establecer detalles de cuando se expresaba STIgMA en la diferenciación de monocitos/macrófagos, se determinaron los niveles de ARNm de STIgMA en monocitos no adherentes y en monocitos adherentes, inducidos para diferenciarse en presencia de suero autólogo humano. Se incrementaron gradualmente los niveles de ARNm de STIgMA a lo largo del tiempo y se alcanzaron niveles máximos a los 7 días

después del emplacado (Figura 58B). En este estadio de diferenciación, los niveles de ARNm fueron 100 veces mayores en comparación con los de monocitos sin diferenciar.

5 **[0405]** La transferencia western de lisatos de monocito/macrófago mostró un incremento en la expresión de proteína STIgMA (Figura 58C) en paralelo con el incremento en la expresión de ARNm de STIgMA, indicando que se expresó STIgMA cuando los monocitos se diferenciaron para formar macrófagos. Apareció en la transferencia (*blot*) una banda de 48 kDa y una banda de 40 kDa, que presumiblemente representan las formas larga y corta de STIgMA humano.

10 *Caracterización molecular de STIgMA (PRO362)*

15 **[0406]** STIgMa migró de forma similar bajo condiciones reducidas y no reducidas indicando que se expresaba como un monómero (Figura 59A). Sólo se observaron ligeros cambios en los patrones de migración cuando se desglucosiló STIgMA utilizando PNGasa F, indicando una N-glicosilación insignificante. Se fosforiló STIgMA cuando se trató las células que sobreexpresan STIgMA con pervanadato (Figura 59B). STIgMA fosforilado migró como una proteína con un PM ligeramente mayor (55 kDa). En células HEK 293 humanas, el dominio citoplasmático de STIgMA fosforilado con tirosina no recluta la Syk kinasa (resultados no mostrados).

20 *Análisis por citometría de flujo de la expresión de STIgMA en células mononucleares sanguíneas periféricas*

25 **[0407]** Con el objetivo de determinar el patrón de expresión de STIgMA en los leucocitos circulantes, se realizó un análisis citométrico de flujo en linfocitos aislados de sangre de un donante sano utilizando anticuerpo de STIgMA anti-humano monoclonal 3C9 conjugado directamente con ALEXA™ A488. Se realizó una contratación con anticuerpos conjugados con PE para diversos antígenos de superficie de células inmunes. No se observó STIgMA en la superficie de todos los leucocitos, incluyendo células NK, B, T, monocitos y granulocitos (Figura 60). No obstante, se expresó STIgMA en monocitos cultivados durante 7 días en un medio de diferenciación de macrófagos.

Regulación de la expresión de STIgMA en monocitos

30 **[0408]** Con el fin de estudiar la regulación de la expresión de STIgMA, se cultivaron macrófagos de 7 días en presencia de varias citoquinas pro- y anti-inflamatorias y se determinaron los niveles de expresión de STIgMA mediante PCR a tiempo real o análisis de flujo. Se incrementó la expresión de ARNm de STIgMA después del tratamiento de macrófagos durante 2 días con IL-10 y TGF- β y se reguló por disminución por IL-4, IL13 y LPS (Figura 61A). El tratamiento con dexametasona incrementó la expresión hasta 5 veces en comparación con los macrófagos de control no tratados. Con el objetivo de determinar la regulación de STIgMA expresado en la superficie celular, se realizó una citometría de flujo en monocitos de sangre periférica tratada con varias citoquinas y dexametasona durante 5 días. Se detectó STIgMA utilizando clon de anticuerpo monoclonal 3C9 conjugado con ALEXA™ A488. Se co-tiñeron las células con anticuerpos anti CD-14. Se observó una expresión en superficie incrementada de STIgMA después del tratamiento de monocitos con IL-10 y LPS durante 5 días (Figura 61B). Se observó un incremento espectacular en la expresión de STIgMA en superficie después del tratamiento con dexametasona.

Distribución subcelular de STIgMa

45 **[0409]** Con el fin de estudiar la distribución subcelular de STIgMA, se mantuvieron los MDM en cultivo durante 15 días, tras lo cual se fijaron y se tiñeron con un anticuerpo monoclonal (clon 3C9) o anticuerpo de conejo policlonal 4F7, seguido de anticuerpo secundario conjugado con FITC y un anticuerpo anti CD63 marcado con PE. El microscopio confocal mostró una expresión elevada de STIgMA en el citoplasma perinuclear, solapándose con la expresión de la proteína de membrana lisosomal CD63 (Figuras 62A,B). STIgMA también se expresó en los extremos delantero y trasero de los macrófagos donde su patrón de tinción no se solapaba con el de CD63.

Expresión de STIgMA en tejidos normales y enfermos

55 **[0410]** Se estudiaron la expresión de STIgMA en macrófagos residentes en tejidos y los cambios en su expresión en tejidos con patologías inflamatorias crónicas. Se determinó la expresión de ARNm de STIgMA, utilizando hibridación *in situ*, sobre paneles de tejidos humanos fijados en paraformaldehído. Se observaron niveles elevados de expresión en macrófagos alveolares obtenidos de una autopsia de pulmón de un paciente con neumonía o asma crónico (Figuras 63A-D). Se observó una expresión elevada de ARNm en células de Kupffer en el hígado de un paciente con hepatitis crónica (Figuras 63E, F).

[0411] En un estudio previo (Walker, Biochimica et Biophysica Acta 1574 (2002) 387-390), y en el cribado electrónico de bibliotecas, se observó una expresión elevada de ARNm de STIgMA en la sinovia de pacientes con artritis reumatoide. Por tanto, se estudió el patrón de expresión de STIgMA en sinovia obtenido de pacientes con artritis reumatoide, osteoartritis y enfermedad ósea degenerativa. Se observó una expresión elevada de ARNm de STIgMA en células sinoviales obtenidas de un paciente con osteoartritis (Figuras 64A-D). Las células sinoviales en las capas superficiales presentaban la expresión más elevada de STIgMA (Figura 64D). Además, se utilizó el anticuerpo policlonal 6F1 para estudiar la expresión de STIgMA en secciones congeladas de sinovia humana obtenida de un paciente con artritis reumatoide. Se expresó STIgMA en un subgrupo de células sinoviales (20-40%) y en macrófagos de tejidos en la sinovia (Figuras 65A-C). Esas células eran, muy probablemente, células sinoviales similares a macrófagos tipo A. No se observó tinción en la sinovia de control (Figura 65D).

[0412] Se observó expresión de proteína STIgMA en macrófagos en un conjunto de tejidos diferentes. Las secciones congeladas preparadas a partir de células CHO que expresaban STIgMA de manera estable muestran una localización en membrana de STIgMA (Figura 66A). Se observó la proteína STIgMA en macrófagos alveolares (Figura 66B), histiocitos en la lámina propia del intestino delgado (Figura 66C), células de Hofbauer en la placenta (Figura 66D), macrófagos en la glándula adrenal (Figura 66E) y células de Kupfer en el hígado (Figura 66F).

[0413] Las placas ateroscleróticas contenían una gran cantidad de macrófagos o macrófago-células espumosas que se adherían estrechamente a la pared luminal de la aorta. Considerando un papel para STIgMA en la adhesión macrófago-endotelio, se estudió la expresión de STIgMA en placas ateroscleróticas. Se tiñeron secciones alternas de placas con anti CD63 (Figuras 67A y B) o anti-STIgMA (Figuras 67C y D). Se observaron patrones de tinción solapantes de anti-CD3 y STIgMA en células espumosas que se alineaban con la pared de los vasos indicando un papel para STIgMA en la aterosclerosis.

[0414] Con el objetivo de determinar si STIgMA se expresó de forma selectiva en macrófagos, se realizó inmunofluorescencia de doble tinción en macrófagos intersticiales cardíacos (Figura 68). Tal y como se muestra en el revestimiento (Figura 68C), la mayoría de los macrófagos intersticiales positivos en STIgMA también fueron positivos en CD68. No todos los macrófagos positivos en CD68 fueron positivos para STIgMA, indicando que el segundo era específico para un subtipo de macrófagos residentes en tejido.

[0415] Con el objetivo de determinar cuantitativamente los niveles de expresión de ARNm en el síndrome de enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), se extrajo ARNm de tejido de colon obtenido de pacientes con colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o pacientes sin manifestaciones de IBD. Se realizó PCR a tiempo real utilizando cebadores específicos para STIgMA, para medir los niveles de expresión relativa. Los niveles de expresión fueron 16 veces mayores en un paciente con colitis ulcerosa y, 5 veces mayores en un paciente con enfermedad de Crohn, en comparación con el tejido de control (Figura 69A). De modo similar, se determinaron los equivalentes de ARN relativos en tejido pulmonar y se observó que eran los más elevados en tejido de un paciente con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD: 14 veces por encima del normal) y no fue significativamente diferente del normal en un paciente con asma (Figura 69B).

[0416] Se conocen bien las moléculas de la superfamilia de Ig para mediar en el reconocimiento de la superficie celular y la adhesión célula-célula. Dado que la expresión de STIgMA fue elevada en macrófagos intersticiales que se alinean con vasos sanguíneos, se estudió la implicación de STIgMA en la adhesión células endoteliales-macrófagos. Se cargó una línea celular Jurkat, transfectada de forma estable con STIgMA-larga de longitud completa (Figura 70A) con el colorante fluorescente BCECF y se añadió a los pocillos de una placa maxisorb de 96 pocillos en la que se había cultivado una monocapa de células HUVEC. Se midió la adhesión mediante la cantidad de fluorescencia retenida tras 3 lavados suaves. Las células Jurkat que expresan STIgMa fueron más adherentes a ambos, el control y endotelio estimulado con TNF α , en comparación con las células Jurkat transfectadas de modo estable con un plásmido de control (Figura 70B).

Discusión

[0417] Este estudio describió, por primera vez, la distribución en tejido, la regulación de la expresión y la caracterización molecular de un miembro nuevo de la superfamilia de Ig STIgMA/Z39Ig y confirmó su expresión selectiva en macrófagos residentes en tejidos.

[0418] Se observó la expresión de STIgMA en macrófagos residentes que tenían un fenotipo completamente diferenciado. Se incrementó su expresión en tejidos con inflamación crónica como la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal. El incremento de expresión de STIgMA en estas enfermedades, que se caracteriza frecuentemente como enfermedades de tipo Th2, puede estar en línea con la regulación de su expresión

por citoquinas Th2 *in vitro*. Aún debe determinarse si la expresión incrementada es debida a una presencia incrementada de macrófagos positivos en STIgMA o una expresión incrementada en los macrófagos inflamatorios.

5 [0419] STIgMA puede mediar una de las funciones efectoras de los macrófagos humanos, que incluye reconocimiento bacteriano, fagocitosis, presentación de antígenos y liberación de citoquinas. No obstante, por el momento, no se hallaron evidencias de su papel en ninguno de estos procesos. STIgMA contenía 3 residuos de tirosina en su dominio citoplasmático que puede fosforilarse mediante tirosina quinasas. Por tanto, STIgMA puede actuar como un receptor. De momento, no se ha encontrado ligando alguno para STIgMA.

10 [0420] Estos resultados indicaron un rol para STIgMA en la adhesión, y posiblemente la motilidad, de macrófagos hacia la pared de células endoteliales de los vasos.

15 [0421] Se incrementó la expresión de STIgMA en enfermedades inflamatorias no microbianas, como la colitis ulcerosa y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) pero se reguló por disminución en macrófagos aislados tras el tratamiento con LPS u otros componentes de pared celular bacteriana, como ácido lipoteicoico y lipoproteína bacteriana. El tratamiento a largo término, durante 2 días, con LPS causó un incremento en la expresión de STIgMA. Esto podría ser debido a un efecto autocrino de IL-10 secretado por macrófagos estimulados por LPS. Se observó una regulación por incremento destacada de STIgMA, tanto a nivel de ARNm como de proteína, tras el tratamiento de monocitos o macrófagos con dexametasona. Se ha observado que varios receptores de superficie de monocito/macrófago incrementan la expresión tras el tratamiento con dexametasona. Un ejemplo es CD163, pero su inducción por dexametasona es mucho menos espectacular. La regulación por incremento de STIgMA por citoquinas anti-inflamatorias IL10 y TGF β tuvo un interés considerable e indica que STIgMa puede mediar el papel anti-inflamatorio de los glucocorticosteroides.

25 [0422] Tal y como se describe en la presente invención, se expresó STIgMa en un subgrupo de macrófagos positivos en CD68 que pueden representar macrófagos activados. Utilizando anticuerpos de bloqueo y activación de STIgMA y la proteína de fusión STIgMA-Fc, se ha investigado su papel en la función efectora de macrófagos, la adhesión y la migración y su papel en las enfermedades inflamatorias crónicas, y se describe en el Ejemplo 25.

30 [0423] Sólo se expresaron específicamente varios marcadores de superficie celular en macrófagos diferenciados, tales como CD68 y CD163. Aunque CD68 se expresaba aparentemente en todas las poblaciones de macrófagos humanos, el antígeno también podía detectarse en otras células mieloides y también en ciertas células no mieloides. De ese modo, STIgMA representaba el primer antígeno de superficie celular expresado selectivamente en un subgrupo de macrófagos maduros intersticiales.

35

EJEMPLO 25

Proteínas de fusión de STIgMA en artritis inducida por colágeno (CIA) en ratones DBA-1J

40 [0424] Este experimento se dirigió a comparar las proteínas de fusión de STIgMA con la IgG murina de control en el desarrollo de la enfermedad y la progresión de CIA (artritis inducida por colágeno, un sistema de modelo animal experimental de artritis reumatoide).

45 [0425] Tal y como se describe en el Ejemplo 24, se expresa STIgMA de manera elevada y específica en un subgrupo de macrófagos y se eleva en tejidos con inflamación crónica. La STIgMA de murino se expresa de manera elevada en macrófagos y sinoviocitos en articulaciones inflamadas de ratones con artritis inducida por colágeno. Los estudios *in vitro* han demostrado que STIgMA está implicada en la adhesión de macrófagos al endotelio. La proteína de fusión de STIgMA-Fc influye en la evolución de una enfermedad autoinmune, en este caso artritis inducida por colágeno en ratones, ya sea mediante la influencia de las propiedades de los macrófagos de tejido o mediante la influencia de la respuesta inmune de otras células (por ejemplo, células T, células B, células epiteliales, células endoteliales). Esto puede dar lugar al alivio de la inflamación, la hinchazón y la erosión ósea a largo plazo en las articulaciones.

50

Especie de modelo animal: Ratón

55

[0426]

Cepa(s): DBA-1J

Proveedor(es): JACKSON

60

Intervalo de edad: 7 a 8 semanas

Categoría de dolor: 3-Estos procedimientos causan más que un dolor y/o angustia mínimos o transitorios, pero no pueden realizarse utilizando anestésicos, analgésicos o tranquilizantes sin afectar negativamente al estudio.

5 **[0427]** Se escogió al ratón como la especie para estudiar la CIA porque la CIA es una poliartritis inflamatoria con características clínicas y patológicas similares a la RA (artritis reumatoide) humana. Este modelo de animal ha sido utilizado por muchos laboratorios y la histopatología de CIA se parece a la observada en RA con proliferación sinovial que progresa hasta la formación de pannus, degeneración/destrucción de cartilago y erosiones de hueso marginales con deformidades articulares posteriores. Además, el ratón es el mamífero más bajo filogenéticamente.

10 **[0428]** Además, no hay un modelo *in vitro* disponible para imitar la patogénesis multifactorial compleja de RA (Artritis Reumatoide).

Diseño experimental

Grupos de tratamiento:

[0429]

20 1) Isotipo mlgG1 6 mg/kg en 200µl de solución salina subcutánea (SC) 3 veces/semana durante 7 semanas (n=8).
2) muSTIgMA (PRO367) 4 mg/kg en 100µl de solución salina SC 3 veces/semana durante 7 semanas (n=8).

25 **[0430]** Se inmunizaron los ratones interdérmicamente con bovino CII (100 µg, Sigma, St Louis) emulsionado en CFS (Difco). Se reestimularon los ratones con CII en IFA (Difco) 21 días después. Empezando en el día 24, se administraron 100 µg de Fc de muSTIgMA (PR0362) a un grupo de ratones (n =7) tres veces por semana durante 6 semanas, y el segundo grupo (n = 8) recibió 100 µg de IgG1 de murino, como control. Se examinaron los ratones diariamente en busca de signos de inflamación articular y se valoraron tal y como se indica a continuación: 0, normal; 1, eritema y ligera hinchazón confinada a la articulación del tobillo; 2, eritema y ligera hinchazón extendida desde la articulación del tobillo a la del metatarso y el metacarpo; 3, eritema e hinchazón moderada extendida desde la articulación del tobillo a la del metatarso o el metacarpo; 4, eritema e hinchazón severa extendida desde el tobillo a los dedos. La máxima puntuación artrítica por pata fue 4, y la puntuación máxima por ratón fue 16 (Fig. 71).

35 **[0431]** Se inmunizaron todos los ratones con 100 µg de colágeno bovino de tipo II en 100 µl de Adyuvante de Freund completo (CFA) en el día 0. Se inyectó intradérmicamente colágeno de tipo II en CFA en la base de la cola por el lado derecho. En el día 21, se suministró i.d. por el lado izquierdo una 2ª inmunización con 100 µg de colágeno bovino de tipo II en 100 µl de adyuvante de Freund incompleto. Los animales fueron explorados diariamente (M-F) por el personal investigador. Se utilizaron nestlets como dispositivo de enriquecimiento, y para proporcionar un relleno extra para los animales. En caso de que fuera necesario, se proporcionó comida humedecida en el fondo de las jaulas. Se sacrificaron los animales debilitados después de la consulta con el personal veterinario. Se tomaron Rayos X de faxitrón terminal y microCT al final del estudio y se evaluó la lesión/erosión de las articulaciones. Además, se pesaron los animales antes del tratamiento y a su término.

40 **[0432]** En el día 35 y en la terminación del estudio, se desangraron los ratones de los Grupos 1 a 8 para pK sérico y para determinar el título de anticuerpo de tipo II anti-colágeno (100 µl de sangrado orbital).

45 **[0433]** En el día 70 se desangraron terminalmente todos los ratones intracardialmente bajo isoflurano al 3% para un hemograma terminal, para un recuento diferencial de leucocitos y para la evaluación de pK sérico (G3).

50 **[0434]** Se aplicó eutanasia a los ratones en el día 70, tras la inducción de la artritis. Se recogieron las cuatro extremidades para radiografías, 5CT e histopatología.

Alojamiento y dieta para los animales

55 **[0435]** Se proporcionó una almohadillo de algodón y alimento humedecido en el suelo de la jaula para inducir el acceso a la comida y el confort.

Fármacos utilizados para restricción

[0436] Isoflurano – inhalación hasta efecto

60 **[0437]** *Procedimientos de eutanasia:* exsanguinación mediante punción cardíaca (percutánea) bajo anestesia

[0438] Isoflurano - inhalación hasta efecto

Resultados

5 **[0439]** La inyección sistemática de la proteína de fusión de STIgMA, muSTIgMA-Fc, en un ratón artrítico inducido por colágeno (modelo animal para artritis reumatoide) mostró una reducción significativa (véase la Figura 71: valor $p = 0,0004$) en la progresión de CIA en el grupo de análisis de ratones que recibieron la proteína de fusión de STIgMA (cuadrados) contra el grupo de ratones de control que recibió IgG1 (círculos).

10 Depósito de Material

[0440] Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC)::

Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
plásmido DNA40628-1216 basado en pRK5	209432	7 de noviembre de 1997
DNA45416-1251	209620	5 de febrero de 1998
DNA35638-1141	209265	16 de septiembre de 1997
DNA77624-2515	203553	22 de diciembre de 1998

15 **[0441]** Estos depósitos se realizaron según lo estipulado en el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes y el Reglamento bajo el mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha del depósito. El depósito estará disponible mediante la ATCC según los términos del Tratado de Budapest, y están sujetos a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricción de la progenie del cultivo del depósito al uso público tras la publicación de la respectiva patente estadounidense o tras ponerse abierta a la inspección pública de cualquier solicitud de patente estadounidense o extranjera, la que sea primera, y asegura la disponibilidad de la progenie para alguien determinado por la U.S. Commissioner of Patents and Trademarks para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas de la Commissioner según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

30 **[0442]** El cesionario de la presente solicitud ha acordado que si un cultivo de los materiales en el depósito muriera o se perdiera o se destruyera cuando se cultiva en las condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente reemplazados en una notificación por otros iguales. La disponibilidad del material depositado no se interpreta como una licencia para realizar la invención contraviniendo los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno de acuerdo con sus leyes de patente.

35 **[0443]** La memoria escrita anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada pretende ser una ilustración individual de ciertos aspectos de la presente invención y otras construcciones que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la presente invención. El depósito del material de la presente invención no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente invención sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el modo óptimo de la misma, ni se interpreta como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, las diversas modificaciones además de las mostradas y descritas en la presente invención serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y caen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0444]

5 <110> GENENTECH, INC.
 Ashknazi, Avi J.
 Fong, Sherman
 Goddard, Audrey
 Gurney, Austin L.
 10 Napier, Mary A.
 Tumas, Daniel
 Van Lookren, Menno
 wood, William I.

15 <120> Utilización de antígenos A33 y Jam-It
 <130> 39766-0100PCT
 <150> US 10/633,008 <151> 2003-07-31
 20 <150> US 10/265,542 <151> 2002-10-03
 <160> 36

25 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 299
 <212> PRT
 30 <213> homo sapien

<400> 1
 Met Gly Thr Lys Ala Gln Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe Ile
 1 5 10 15
 35 Leu Ala Ile Leu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His
 20 25 30
 Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu
 35 40 45
 Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe
 50 55 60
 40 Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe
 85 90 95
 45 Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser
 100 105 110
 Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val
 115 120 125
 50 Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr
 130 135 140
 Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro
 145 150 155 160
 Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn
 165 170 175
 55 Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro
 180 185 190
 Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly
 195 200 205
 60 Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser
 210 215 220
 Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val
 225 230 235 240

ES 2 373 981 T3

Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly
 Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly
 5 Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu
 Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val
 290 295

10 <210> 2
 <211> 321
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

15 <400> 2
 Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val Asp
 1 5 10
 Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro
 20 Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gln Gly
 35
 Tyr Thr Gln Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gln Arg Gly Ser Asp Pro
 50 55 60
 Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gln Gln Ala
 25 65 70 75 80
 Lys Tyr Gln Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
 85 90 95
 Ser Leu Gln Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr
 100 105 110
 30 Cys Glu Val Thr Trp Gln Thr Pro Asp Gly Asn Gln Val Val Arg Asp
 115 120 125
 Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gln Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro Thr
 130 135 140
 Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gln Gly Met Arg
 35 145 150 155 160
 Ile Ser Leu Gln Cys Gln Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr Ile
 165 170 175
 Trp Tyr Lys Gln Thr Asn Asn Gln Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr
 180 185 190
 40 Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser
 195 200 205
 Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gln Val Gly Ser Glu Gln His Ser Asp
 210 215 220
 Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys
 45 225 230 235 240
 Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr
 245 250 255
 Val Lys Gln Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu Gly
 260 265 270
 50 Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile Ile
 275 280 285
 Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr Ile
 290 295 300
 55 Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gln Gln Glu His Val Tyr Glu Ala Ala
 305 310 315 320
 Arg

60 <210> 3
 <211> 390
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 3

ES 2 373 981 T3

cttcttgcca actggtatca ccttcaagtc cgtgacacgg gaagacactg ggacatacac 60
 ttgtatggtc tctgaggaag gcggcaacag ctatggggag gtcaaggta agctcatcgt 120
 gcttgtgcct ccatccaagc ctacagttaa catccccctc tctgccacca ttgggaaccg 180
 ggcagtgtcg acatgctcag aacaagatgg tccccacct tctgaataca cctggttcaa 240
 5 agatgggata gtgatgccta cgaatcccaa aagcaccctg gccttcagca actcttcta 300
 tgtcctgaat cccacaacag gagagctggg ctttgcctcc ctgtcagcct ctgatactgg 360
 agaatacagc tgtgaggcac ggaatgggta

 <210> 4
 10 <211> 726
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

 <400> 4
 15 tctcagtdcc ctgctgtgag tgcgaggact gtgttctgtt tcccaggagt ccttcggcgg 60
 ctgtttgtgct caggtgagcc tgatcgcgat ggggacaaaag gcgcaagctc gagaggaaac 120
 tgttgtgcct ctccatattg gcatcctgt tgtgctccct ggcatgggc agtgttacag 180
 ttgcactctt ctgaacctga agtcagaatt cctgagaata atcctgtgaa gttgtcctgt 240
 gcctactcgg gcttttcttc tccccgtgtg gagtggaaagt ttgaccaagg agacaccacc 300
 20 agactcgttt gctataataa caagatcaca gcttcctatg aggaccgggt gaccttcttg 360
 ccaactggta tcacctcaa gtccgtgaca cgggaagaca ctgggacata cacttgtatg 420
 gtctctgagg aaggcggcaa cagctatggg gaggtaaagg tcaagctcat cgtgcttggt 480
 cctccatcca agcctacagt taacatcccc tctctgcca ccatgggaa ccgggcagtg 540
 ctgacatgct cagaacaaga tggttcccca ccttctgaat acacctggtt caaagatggg 600
 25 atagtgatgc ctacgaatcc caaaagcacc cgtgccttca gcaactctc ctatgtcctg 660
 aatcccacaa caggagagct ggtctttgat cccctgtcag cctctgatac tggagaatac 720
 agctgt 726

 <210> 5
 30 <211> 1503
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

 <400> 5
 35 gcaggcaaag taccagggcc gcctgcatgt gagccacaag gttccaggag atgtatccct 60
 ccaattgagc accctggaga tggatgaccg gagccactac acgtgtgaag tcacctggca 120
 gactcctgat ggcaaccaag tctgtagaga taagattact gagctccgtg tccagaaact 180
 ctctgtctcc aagcccacag tgacaactgg cagcggttat ggcttcacgg tgccccaggg 240
 aatgaggatt agccttcaat gccagggttc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggg 300
 40 ataagcaaca gactaataac caggaaccc atcaaagtag caaccctaag taccttactc 360
 ttcaagcctg cggatgatagc cgactcaggc tctatttct gcaactgcaa gggccagggt 420
 ggctctgagc agcacagcga cattgtgaag tttgtggtca aagactcctc aaagctactc 480
 aagaccaaga ctgaggcacc tacaacatg acataccctt tgaagcaac atctacagtg 540
 aagcagtcct gggactggac cactgacatg gatggctacc ttggagagac cagtgtggg 600
 45 ccaggaaaga gcctgcctgt ctttgccatc atcctcatca tctccttggt ctgtatggg 660
 gtttttacc aiggccttat catgctctgt cggaaagacat cccaacaaga gcatgtctac 720
 gaagcagcca gggcacatgc cagagaggcc aacgactctg gagaaacat gagggtggcc 780
 atcttcgcaa gtggctgctc cagtgatgag ccaacttccc agaactctgg gcaacaacta 840
 ctctgatgag ccttgcatag gacaggagta ccagatcatc gccagatca atggcaacta 900
 50 cgcccgcctg ctggacacag ttctcttggg ttatgagttt ctggcactg agggcaaaag 960
 tgtctgttaa aaatgcccc aatagccagg atctgctgac ataattgcct agtcagtctt 1020
 tgccttctg atggccttct tcccgtctac ctctcttctt gtagagcca aagtgtccgc 1080
 ctaccaacac tggagccgct gggagtcact ggctttgccc tggatttgc cagatgcatc 1140
 tcaagtaagc cagctgctgg atttggctct gggcccttct agtatctctg ccgggggctt 1200
 55 ctggtactcc tctctaaata ccagagggaa gatgcccata gcactaggac ttggatcatc 1260
 tgcctacaga cactattcaa ctttggcatc ttgccaccag aagaccggag gggaggctca 1320
 gctctgccag ctgagaggac cagctatata caggatcatt tctcttctt cagggccaga 1380
 cagcttttaa ttgaaattgt taattcacag gccagggttc agttctgctc ctccactata 1440
 agtctaattgt tctgactctc tcctgggtgct caataaataa ctaatcataa cagcaaaaaa 1500
 60 aaa 1503

 <210> 6

ES 2 373 981 T3

<211> 319
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

5 <400> 6
 Met Val Gly Lys Met Trp Pro Val Leu Trp Thr Leu Cys Ala Val Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr Pro Gln Asp Val Leu Arg
 20 25 30
 10 Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu Pro Cys Thr Tyr His Thr Ser
 35 40 45
 Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile Gln Trp Asp Lys Leu Leu Leu Thr
 50 55 60
 His Thr Glu Arg Val Val Ile Trp Pro Phe Ser Asn Lys Asn Tyr Ile
 65 70 75 80
 15 His Gly Glu Leu Tyr Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu
 85 90 95
 Gln Ser Asp Ala Ser Ile Thr Ile Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn
 100 105 110
 20 Gly Thr Tyr Glu Cys Ser Val Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn
 115 120 125
 Thr Lys Ser Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro
 130 135 140
 25 Glu Cys Gly Ile Glu Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu
 145 150 155 160
 Thr Cys Gln Ser Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys
 165 170 175
 Arg Tyr Asn Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala Ser
 180 185 190
 30 Gly Gln Pro Val Ser Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Thr Ser Gly Tyr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe Cys Asn Ile
 210 215 220
 35 Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala Leu Tyr Val Gly
 225 230 235 240
 Ile Ala Val Gly Val Val Ala Ala Leu Ile Ile Ile Gly Ile Ile Ile
 245 250 255
 Tyr Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp Asn Thr Glu Asp Lys Glu
 260 265 270
 40 Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Pro Pro Glu Gln Leu
 275 280 285
 Arg Glu Leu Ser Arg Glu Arg Glu Glu Glu Asp Asp Tyr Arg Gln Glu
 290 295 300
 45 Glu Gln Arg Ser Thr Gly Arg Glu Ser Pro Asp His Leu Asp Gln
 305 310 315

<210> 7
 <211> 2181
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 7
 cccacgcgtc cgcccacgcg tccgcccacg ggtccgccc cgcggtccggg ccaccagaag 60
 tttagacctc tttagtagca ggaggctgga agaaaggaca gaagtagctc tggctgtgat 120
 55 ggggatctta ctgggcctgc tactcctggg gcacctaaaca gtggacactt atggccgtcc 180
 catcctggaa gtgccagaga gtgtaacagg accttggaata ggggatgtga atcttccctg 240
 cacctatgac cccctgcaag gctacaccca agtcttgggtg aagtggtctg tacaacgtgg 300
 ctgagaccct gtcaccatct ttctacgtga ctctctgga gaccatatcc agcaggcaaa 360
 gtaccagggc cgctgcatg tgagccacaa ggttccagga gatgtatccc tccaattgag 420
 60 caccctggag atggaatgacc ggagccacta cacgtgtgaa gtcacctggc agactcctga 480
 tggcaaccaa gtcgtgagag ataagattac tgagctccgt gtccagaaac tctctgtctc 540
 caagcccaca gtgacaactg gcagcggtta tggcttcacg gtgcccagg gaatgaggat 600
 tagccttcaa tgccaggctc ggggttctcc tcccatcagt tatatttggg ataagcaaca 660

ES 2 373 981 T3

5 gactaataac caggaaccca tcaaagtagc aaccctaagt accttactct tcaagcctgc 720
 ggtgatagcc gactcaggct cctatitctg cactgccaaag ggccagggtg gctctgagca 780
 gcacagcgac attgtgaagt ttgtgggtaa agactcctca aagctactca agaccaagac 840
 tgaggcacct acaacatga catacccctt gaaagcaaca tctacagtga agcagtcctg 900
 ggactggacc actgacatgg atggctacct tggagagacc agtgctgggc caggaagag 960
 cctgcctgtc tttgccatca tcctcatcat ctcttctgtc tgtatgggtg tttttacat 1020
 ggcctatatac atgtctctgtc ggaagacatc ccaacaagag catgtctacg aagcagccag 1080
 gtaagaaaagt ctctcctctt ccatititga ccccgctccct gccctcaati ttgattactg 1140
 gcaggaaaatg tggaggaagg ggggtgtggc acagacccaa tcctaaggcc ggaggccttc 1200
 10 aggggtcagga catagctgcc ttccctctct caggcacctt ctgagggtgt tttggccctc 1260
 tgaacacaaa ggataatita gatccatctg ccttctgctt ccagaatccc tgggtggtag 1320
 gatcctgata attaattggc aagaattgag gcagaagggg gggaaaccag gaccacagcc 1380
 ccaagtcctt tcttatgggt ggtgggctct tgggcatag ggccatgccc agagaggcca 1440
 acgactctgg agaaccatg aggggtggcca tcttcgcaag tggctgctcc agtgatgagc 1500
 15 caacttccca gaatctgggc aacaactact ctgatgagcc ctgcatagga caggagtacc 1560
 agatcatcgc ccagatcaat ggcaactacg cccgcctgct ggacacagtt cctctggatt 1620
 atgagtttct ggccactgag ggcaaaaagtg tctgttaaaa atgcccatt aggccaggat 1680
 ctgctgacat aattgcctag tcagtccitg ccttctgcat ggcttcttc cctgctacct 1740
 ctcttctctg atagcccaaa ggtgccgctt accaacactg gagccgctgg gactcacttg 1800
 20 ctttggccctg gaatttgcca gatgcatctc aagtaagcca gctgctggat ttggctctgg 1860
 gcccttctag tatctctgcc gggggcttct ggtactcctc tctaaatacc agaggggaaga 1920
 tgcccatagc actaggactt ggtcatcatg cctacagaca ctattcaact ttggcatctt 1980
 gccaccagaa gaccggaggg aggtcagct ctgccagctc agaggaccag ctatatccag 2040
 gatcatttct ctttcttcag ggccagacag cttttaattg aatgtttat ttcacaggcc 2100
 25 agggttcagt tctgctcctc cactataagt ctaatgttct gactctctcc tgggtctcaa 2160
 taaatatcta atcataacag c 2181

<210> 8
 <211> 1295
 30 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 8
 35 cccagaagtt caagggcccc cggcctcctg cgctcctgcc gccgggaccc tcgacctcct 60
 cagagcagcc ggctgccgcc ccgggaagat ggcgaggagg agccgccacc gcctcctcct 120
 gctgctgctg cgctacctgg tggctgccct gggctatcat aaggcctatg ggttttctgc 180
 cccaaaagac caacaagtag tcacagcagt agagtaccaa gaggctatit tagcctgcaa 240
 aaccccaag aagactgttt cctccagatt agagtggaag aaactgggtc ggagtgtctc 300
 40 ttttctctac tatcaacaga ctcttcaagg tgattttaaa aatcgagctg agatgataga 360
 tttcaatatac cggatcaaaa atgtgacaag aagtgatgag gggaaatatac gttgtgaagt 420
 tagtgcccca tctgagcaag gccaaaacct ggaagaggat acagtcactc tgggaagatt 480
 agtggtcca gcagttccat catgtgaagt accctcttct gctctgagt gaaactgtgg 540
 agagctacga tgtcaagaca aagaagggaa tccagctcct gaatacacat ggtttaagga 600
 tggcatccgt ttgctagaaa atcccagact tggctcccaa agcaccaaca gctcatacac 660
 45 aatgaataca aaaactggaa ctctgcaatt taatactgtt tccaaactgg aactggaga 720
 atattcctgt gaagcccgca attctgttgg atatcgcagg tgtcctggga aacgaatgca 780
 agtagatgat ctcaacataa gtggcatcat agcagccgta gtagttgtgg ccttagtgat 840
 ttccgtttgt ggccttgggtg tafgctatgc tcagaggaaa ggctactit caaaagaaac 900
 ctcttccag aagagtaatt cttcatctaa agccacgaca atgagtgaat atgtgcagt 960
 50 gctcacgctt gtaatcccag cactttggaa ggccgcgcg ggcgatcac gaggtcagga 1020
 gttctagacc agtctggcca atatggfgaa accccatctc tactaaaata caaaaattag 1080
 ctgggcatgg tggcatgtgc ctgcaagtcc agctgcttgg gagacaggag aatcacttga 1140
 accggggagg cggaggttgc agtgagctga gatcacgcca ctgcaagtcca gcctgggtaa 1200
 cagagcaaga ttccatctca aaaaataaaa faaataaata aataaatact ggttitacc 1260
 55 tgtagaattc ttacaataaa tatagcttga tattc 1295

<210> 9
 <211> 312
 <212> PRT
 60 <213> Homo Sapiens

<400> 9
 Met Al a Arg Arg Ser Arg Hi s Arg Leu Leu Leu Leu Leu Leu Arg Tyr

ES 2 373 981 T3

1 Leu Val Val Ala 5 Leu Gly Tyr His Lys 10 Ala Tyr Gly Phe Ser 15 Pro
 20 Lys Asp Gln Gln Val Val Thr Ala Val Glu Tyr Gln Glu Ala Ile Leu
 5 Ala Cys Lys Thr Pro Lys Lys Thr Val Ser Ser Arg Leu Glu Trp Lys
 50 Lys Leu Gly Arg Ser Val 70 Ser Phe Val Tyr Tyr 75 Gln Gln Thr Leu Gln
 65 Gly Asp Phe Lys Asn Arg Ala Glu Met Ile Asp Phe Asn Ile Arg Ile
 10 Lys Asn Val Thr Arg Ser Asp Ala Gly Lys Tyr Arg Cys Glu Val Ser
 105 Ala Pro Ser Glu Gln Gly Gln Asn 120 Leu Glu Glu Asp Thr Val Thr Leu
 15 Glu Val Leu Val Ala Pro Ala Val Pro Ser Cys Glu Val Pro Ser Ser
 130 Ala Leu Ser Gly Thr Val Val Glu Leu Arg Cys Gln Asp Lys Glu Gly
 145 Asn Pro Ala Pro Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Arg Leu Leu
 20 Glu Asn Pro Arg Leu Gly Ser Gln Ser Thr Asn Ser Ser Tyr Thr Met
 180 Asn Thr Lys Thr Gly Thr Leu Gln Phe Asn Thr Val Ser Lys Leu Asp
 25 Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg Asn Ser Val Gly Tyr Arg Arg
 210 Cys Pro Gly Lys Arg Met Gln Val Asp Asp Leu Asn Ile Ser Gly Ile
 225 Ile Ala Ala Val Val Val Val Ala Leu Val Ile Ser Val Cys Gly Leu
 30 Gly Val Cys Tyr Ala Gln Arg Lys Gly Tyr Phe Ser Lys Glu Thr Ser
 260 Phe Gln Lys Ser Asn Ser Ser Ser Lys Ala Thr Thr Met Ser Glu Asn
 35 Val Gln Trp Leu Thr Pro Val Ile Pro Ala Leu Trp Lys Ala Ala Ala
 290 Gly Gly Ser Arg Gly Gln Glu Phe
 305
 40 <210> 10
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 45 <400> 10
 Met Gly Thr Glu Gly Lys Ala Gly Arg Lys Leu Leu Phe Leu Phe Thr
 1 5 10 15
 50 Ser Met Ile Leu Gly Ser Leu Val Gln Gly Lys Gly Ser Val Tyr Thr
 20 25 30
 Ala Gln Ser Asp Val Gln Val Pro Glu Asn Glu Ser Ile Lys Leu Thr
 35 Cys Thr Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Val
 50 55 Gln Gly Ser Thr Thr Ala Leu Val Cys Tyr Asn Ser Gln Ile Thr Ala
 65 Pro Tyr Ala Asp Arg Val Thr Phe Ser Ser Gly Ile Thr Phe Ser
 85 90 95
 60 Ser Val Thr Arg Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu
 100 105 110
 Glu Gly Gly Gln Asn Tyr Gly Glu Val Ser Ile His Leu Thr Val Leu
 115 120 125
 Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Ile Ser Val Pro Ser Ser Val Thr Ile

ES 2 373 981 T3

130 135 140
 Gly Asn Arg Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu His Asp Gly Ser Pro Pro
 145 150 155 160
 Ser Glu Tyr Ser Trp Phe Lys Asp Gly Ile Ser Met Leu Thr Ala Asp
 5 Ala Lys Lys Thr Arg Ala Phe Met Asn Ser Ser Phe Thr Ile Asp Pro
 180 185 190
 Lys Ser Gly Asp Leu Ile Phe Asp Pro Val Thr Ala Phe Asp Ser Gly
 195 200 205
 10 Glu Tyr Tyr Cys Gl n Ala Gl n Asn Gly Tyr Gly Thr Ala Met Arg Ser
 210 215 220
 Glu Ala Ala His Met Asp Ala Val Glu Leu Asn Val Gly Gly Ile Val
 225 230 235 240
 15 Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Leu Leu Ile Phe Gly
 245 250 255
 Val Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly Tyr Phe Glu Thr Thr Lys Lys Gly
 260 265 270
 Thr Ala Pro Gly Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gl n Pro Ser Thr Arg Ser
 275 280 285
 20 Glu Gly Glu Phe Lys Gl n Thr Ser Ser Phe Leu Val
 290 295 300

<210> 11
 <211> 1842
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

<400> 11
 30 gtctgtttccc aggagtcctt cggcggctgt tgtgtcggga gcctgatcgc gatggggaca 60
 aaggcgcaag tcgagaggaa actgttgtgc ctcitcatat tggcgatcct gttgtgctcc 120
 ctggcattgg gcagtggttac agtgcactct tctgaacctg aagtcagaat tcctgagaat 180
 aatcctgtga agttgtcctg tgcctactcg ggcttttctt ctccccgtgt ggagtggag 240
 35 tttgaccaag gagacaccac cagactcgtt tgcataata acaagatcac agcttcctat 300
 gaggaccggg tgaccttctt gccaactggt atcaccttca agtccgtgac acgggaagac 360
 actgggacat acacttgtat ggtctctgag gaaggcggca acagctatgg ggaggtcaag 420
 gtcaagctca tctgtcttgt gcctccatcc aagcctacag ttaacatccc ctcctctgcc 480
 accattggga accgggcagt gctgacatgc tcagaacaag atggttcccc accttctgaa 540
 tacacctggt tcaaagatgg gatagtgatg cctacgaatc ccaaaagcac ccgtgccctc 600
 40 gcctctgata ctggagaata gagctgtgag gcacggaatg ggtatgggac acctatgact 720
 tcaaagtctg tgcgcatgga agctgtggag cggaatgtgg gggatcctgt ggcagccgtc 780
 cttgtaacct tgattctcct gggaatcttg gttttggca tctggtttgc ctatagccga 840
 ggccactttg acagaacaaa gaaagggact tcgagtaaga aggtgattta cagccagcct 900
 agtgcccgaa gtgaaggaga attcaaacag acctcgtcat tcctgggtgt agcctggctg 960
 45 gctcaccgcc tatcatctgc atttgcctta ctcagtgct actggactct ggcccctgat 1020
 gtctgtagtt tcacaggatg ccttatttgt cttctacacc ccacagggcc ccctacttct 1080
 tgggatgtgt ttttaataat gtcagctatg tgccccatcc tccttcatgc cctcccctcc 1140
 tttcctacca ctgctgagtg gcctggaact tgtttaaagt gtttattccc catttctttg 1200
 agggatcagg aaggaatcct gggatgcca ttgacttccc ttctaagtag acagcaaaaa 1260
 50 tggcgggggt cgcaggaatc tgcactcaac tgcccacctg gctggcaggg atctttgat 1320
 aggtatcttg agcttggttc tgggctcttt ccttgtgtac tgacgaccag ggccagctgt 1380
 tctagagtgg gaattagagg ctagagcggc tgaaatggtt gtttggatgat gacctgggg 1440
 tccttccatc tctggggccc actctcttct gtcttcccat gggagtgcc actgggatcc 1500
 ctctgccctg tcctcctgaa tacaagctga ctgacattga ctgtgtctgt ggaaaatggg 1560
 55 agctcttgtt gtggagagca tagtaaattt tcagagaact tgaagcgaaa aggattttaa 1620
 accgctgtct taaagaaaag aaaactggag gctgggcgca gtggctcacg cctgtaatcc 1680
 cagaggctga ggcaggcgga tcacctgagg tctgggagttc gggatcagcc tgaccaatcc 1740
 ggagaaacca tgctggaat acagagttag ccaggcatgg tggatgatgc ctgtagtccc 1800
 60 agctgctcag gagcctggca acaagagcaa aactccagct ca 1842

<210> 12
 <211> 24
 <212> ADN

	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 12	
	tgcgagct gtgttctggt tccc	24
10	<210> 13	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 13	
	tgatcgcgat ggggacaaag gcgcaagctc gagaggaaac tgttgtgcct	50
20	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
25	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 14	
30	acacctgggtt caaagatggg	20
	<210> 15	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 15	
40	taggaagagt tgctgaaggc acgg	24
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 16	
50	ttgccttact caggtgctac	20
	<210> 17	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
60	<400> 17	

	actcagcagt ggtaggaaag	20
	<210> 18	
	<211> 24	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
10	<400> 18	
	tatccctcca attgagcacc ctgg	24
	<210> 19	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 19	
	gtcggagac atcccaaca g	21
25	<210> 20	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 20	
35	cttcacaatg tcgctgtgct gctc	24
	<210> 21	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
40	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 21	
45	agccaaatcc agcagctggc ttac	24
	<210> 22	
	<211> 50	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética	
	<400> 22	
55	tggatgaccg gagccactac acgtgtgaag tcacctggca gactcctgat	50
	<210> 23	
	<211> 260	
60	<212> PRT	
	<213> Homo Sapiens	

ES 2 373 981 T3

<400> 23
 1 Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg
 5 Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe
 Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg
 Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val
 10 Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp
 65 Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu Glu Gly Gly Asn Ser Tyr
 Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro
 15 Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val Leu
 Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe
 20 Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr Arg Ala Phe
 Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe
 Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Cys Glu Ala Arg
 25 Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu Ala
 Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala Ala Val Leu Val Thr Leu
 30 Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg
 225 Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile
 Tyr Ser Gln Pro
 35 260

<210> 24
 <211> 268
 <212> PRT
 40 <213> Homo Sapiens

<400> 24
 45 Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr Pro Gln Asp Val Leu Arg
 Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu Pro Cys Thr Tyr His Thr Ser
 Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile Gln Trp Asp Lys Leu Leu Leu Thr
 His Thr Glu Arg Val Val Ile Trp Pro Phe Ser Asn Lys Asn Tyr Ile
 50 His Gly Glu Leu Tyr Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu
 65 Gln Ser Asp Ala Ser Ile Thr Ile Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn
 Gly Thr Tyr Glu Cys Ser Val Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn
 55 Thr Lys Ser Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro
 Glu Cys Gly Ile Glu Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu
 60 Thr Cys Gln Ser Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys
 Arg Tyr Asn Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala Ser

ES 2 373 981 T3

5 Gly Gln Pro Val 165 Ser Leu Lys Asn Ile 170 Thr Asp Thr Ser 175 Gly Tyr
 Tyr Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe Cys Asn Ile
 Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala Leu Tyr Val Gly
 Ile Ala Val Gly Val Val 230 Ala Ala Leu Ile Ile 235 Ile Gly Ile Ile Ile
 10 Tyr Cys Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp Asn Thr Glu Asp Lys Glu
 Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Pro 265

15 <210> 25
 <211> 263
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

20 <400> 25
 Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr Val His Ser Ser Glu Pro
 1 Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr
 25 Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val Glu Trp Lys Phe Asp Gln Gly Asp
 Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr Ala Ser Tyr Glu
 30 Asp Arg Val Thr Phe Leu Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser Val Thr
 65 Arg Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu Glu Gly Gly
 85 Asn Ser Tyr Gly Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val Leu Val Pro Pro
 100 Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg
 115 Ala Val Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr
 130 Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr
 40 145 Arg Ala Phe Ser Asn Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu
 165 Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr Ser Cys
 180 Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg
 195 Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val Ala Ala Val Leu
 210 Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala
 50 225 Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys Lys Gly Thr Ser Ser Lys
 245 Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro 260

55 <210> 26
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

60 <400> 26
 Leu Cys Ala Val Arg Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr Pro
 1 5 10 15

ES 2 373 981 T3

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

35 <210> 27
 <211> 413
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

40 <400> 27
 ctcgagccgc tcgagccgtg cggggaata tcgttgtagaa gtagtgccc catctgagca 60
 aggccaaaac ctggaagagg atacagtcac tctggaagta ttagtggctc cagcagttcc 120
 atcatgtgaa gtaccctctt ctgctctgag tggaactgtg gtagagctac gatgtcaaga 180
 45 caaagaagg aatccagctc ctgaatacac atggtttaag gatggcatcc gttgctaga 240
 aatcccaga cttggctccc aaagcaccaa cagctcatal acaatgaata caaaaactgg 300
 aactctgcaa tttataactg tttcctaaact ggacactgga gaataitcct gtgaagcccg 360
 caattctgtt ggatatcgca ggtgtcctgg ggaaacgaat gcaagtagat gat 413

50 <210> 28
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética

60 <400> 28
 atcgttgtga agttagtgcc cc

22

<210> 29
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 5 <223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética

<400> 29
 acctgcgata tccaacagaa ttg 23

10 <210> 30
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética

<400> 30
 20 ggaagaggat acagtcactc tgaagatt agtggctcca gcagttcc 48

<210> 31
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

25 <400> 31
 Met Ala Leu Arg Arg Pro Pro Arg Leu Arg Leu Cys Ala Arg Leu Pro
 1 5 10 15
 30 Asp Phe Phe Leu Leu Leu Phe Arg Gly Cys Leu Ile Gly Ala Val
 20 25 30
 Asn Leu Lys Ser Ser Asn Arg Thr Pro Val Val Gln Glu Phe Glu Ser
 35 35 40 45
 Val Glu Leu Ser Cys Ile Ile Thr Asp Ser Gln Thr Ser Asp Pro Arg
 50 55 60
 35 Ile Glu Trp Lys Lys Ile Gln Asp Glu Gln Thr Thr Tyr Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Asp Asn Lys Ile Gln Gly Asp Leu Ala Gly Arg Ala Glu Ile Leu Gly
 85 90 95
 40 Lys Thr Ser Leu Lys Ile Trp Asn Val Thr Arg Arg Asp Ser Ala Leu
 100 105 110
 Tyr Arg Cys Glu Val Val Ala Arg Asn Asp Arg Lys Glu Ile Asp Glu
 115 120 125
 Ile Val Ile Glu Leu Thr Val Gln Val Lys Pro Val Thr Pro Val Cys
 130 135 140
 45 Arg Val Pro Lys Ala Val Pro Val Gly Lys Met Ala Thr Leu His Cys
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Glu Gly His Pro Arg Pro His Tyr Ser Trp Tyr Arg Asn
 165 170 175
 50 Asp Val Pro Leu Pro Thr Asp Ser Arg Ala Asn Pro Arg Phe Arg Asn
 180 185 190
 Ser Ser Phe His Leu Asn Ser Glu Thr Gly Thr Leu Val Phe Thr Ala
 195 200 205
 Val His Lys Asp Asp Ser Gly Gln Tyr Tyr Cys Ile Ala Ser Asn Asp
 210 215 220
 55 Ala Gly Ser Ala Arg Cys Glu Glu Gln Glu Met Glu Val Tyr Asp Leu
 225 230 235 240
 Asn Ile Gly Gly Ile Ile Gly Gly Val Leu Val Val Leu Ala Val Leu
 245 250 255
 60 Ala Leu Ile Thr Leu Gly Ile Cys Cys Ala Tyr Arg Arg Gly Tyr Phe
 260 265 270
 Ile Asn Asn Lys Gln Asp Gly Glu Ser Tyr Lys Asn Pro Gly Lys Pro
 275 280 285

ES 2 373 981 T3

Asp Gly Val Asn Tyr Ile Arg Thr Asp Glu Glu Gly Asp Phe Arg His
 290 Ser Ser Phe Val Ile 295 300
 Lys 305
 5
 <210> 32
 <211> 399
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 32
 Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val Asp
 1 5 10
 Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro
 15 20
 Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gl n Gly
 35
 Tyr Thr Gl n Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gl n Arg Gly Ser Asp Pro
 50 60
 Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gl n Gl n Ala
 65 70 80
 Lys Tyr Gl n Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
 85 90 95
 Ser Leu Gl n Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr
 100 110
 Cys Glu Val Thr Trp Gl n Thr Pro Asp Gly Asn Gl n Val Val Arg Asp
 115 125
 Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gl n Lys Leu Ser Val Ser Lys Pro Thr
 130 140
 Val Thr Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Phe Thr Val Pro Gl n Gly Met Arg
 145 150 160
 Ile Ser Leu Gl n Cys Gl n Ala Arg Gly Ser Pro Pro Ile Ser Tyr Ile
 165 170 175
 Trp Tyr Lys Gl n Gl n Thr Asn Asn Gl n Glu Pro Ile Lys Val Ala Thr
 180 185 190
 Leu Ser Thr Leu Leu Phe Lys Pro Ala Val Ile Ala Asp Ser Gly Ser
 195 200 205
 Tyr Phe Cys Thr Ala Lys Gly Gl n Val Gly Ser Glu Gl n His Ser Asp
 210 215 220
 Ile Val Lys Phe Val Val Lys Asp Ser Ser Lys Leu Leu Lys Thr Lys
 225 230 235 240
 Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr Ser Thr
 245 250 255
 Val Lys Gl n Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr Leu Gly
 260 265 270
 Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala Ile Ile
 275 280 285 290 300
 Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala Tyr Ile
 295 310
 50 Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gl n Gl n Glu His Val Tyr Glu Ala Ala
 305 315 320
 Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met Arg Val
 325 330 335
 Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser Gl n Asn
 340 345 350
 55 Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gl n Glu Tyr Gl n
 355 360 365
 Ile Ile Ala Gl n Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp Thr Val
 370 375 380
 60 Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val Cys
 385 390 395

<210> 33

ES 2 373 981 T3

<211> 305
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 33
 Met Gly Ile Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Gly His Leu Thr Val Asp
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Arg Pro Ile Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Gly Pro
 20
 10 Trp Lys Gly Asp Val Asn Leu Pro Cys Thr Tyr Asp Pro Leu Gl n Gly
 35 40 45
 Tyr Thr Gl n Val Leu Val Lys Trp Leu Val Gl n Arg Gly Ser Asp Pro
 50 55 60
 Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Ser Gly Asp His Ile Gl n Gl n Ala
 65 70 75 80
 15 Lys Tyr Gl n Gly Arg Leu His Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
 85 90 95
 Ser Leu Gl n Leu Ser Thr Leu Glu Met Asp Asp Arg Ser His Tyr Thr
 100 105 110
 20 Cys Glu Val Thr Trp Gl n Thr Pro Asp Gly Asn Gl n Val Arg Asp
 115 120 125
 Lys Ile Thr Glu Leu Arg Val Gl n Lys His Ser Ser Lys Leu Leu Lys
 130 135 140
 Thr Lys Thr Glu Ala Pro Thr Thr Met Thr Tyr Pro Leu Lys Ala Thr
 145 150 155 160
 25 Ser Thr Val Lys Gl n Ser Trp Asp Trp Thr Thr Asp Met Asp Gly Tyr
 165 170 175
 Leu Gly Glu Thr Ser Ala Gly Pro Gly Lys Ser Leu Pro Val Phe Ala
 180 185 190
 30 Ile Ile Leu Ile Ile Ser Leu Cys Cys Met Val Val Phe Thr Met Ala
 195 200 205
 Tyr Ile Met Leu Cys Arg Lys Thr Ser Gl n Gl n Glu His Val Tyr Glu
 210 215 220
 35 Ala Ala Arg Ala His Ala Arg Glu Ala Asn Asp Ser Gly Glu Thr Met
 225 230 235 240
 Arg Val Ala Ile Phe Ala Ser Gly Cys Ser Ser Asp Glu Pro Thr Ser
 245 250 255
 Gl n Asn Leu Gly Asn Asn Tyr Ser Asp Glu Pro Cys Ile Gly Gl n Glu
 260 265 270
 40 Tyr Gl n Ile Ile Ala Gl n Ile Asn Gly Asn Tyr Ala Arg Leu Leu Asp
 275 280 285
 Thr Val Pro Leu Asp Tyr Glu Phe Leu Ala Thr Glu Gly Lys Ser Val
 290 295 300
 Cys
 45 305

<210> 34
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

50 <400> 34
 Met Glu Ile Ser Ser Gly Leu Leu Phe Leu Gly His Leu Ile Val Leu
 1 5 10 15
 55 Thr Tyr Gly His Pro Thr Leu Lys Thr Pro Glu Ser Val Thr Gly Thr
 20 25 30
 Trp Lys Gly Asp Val Lys Ile Gl n Cys Ile Tyr Asp Pro Leu Arg Gly
 35 40 45
 Tyr Arg Gl n Val Leu Val Lys Trp Leu Val Arg His Gly Ser Asp Ser
 50 55 60
 60 Val Thr Ile Phe Leu Arg Asp Ser Thr Gly Asp His Ile Gl n Gl n Ala
 65 70 75 80
 Lys Tyr Arg Gly Arg Leu Lys Val Ser His Lys Val Pro Gly Asp Val
 84

ES 2 373 981 T3

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

30 <210> 35
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética

35 <400> 35
 tctctgtctc caagcccaca g 21

40 <210> 36
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sonda de Oligonucleótidos Sintética

45 <400> 36
 ctttgaggag tctttgacc 19

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA, en el que el polipéptido comprende la secuencia del dominio extracelular (ECD) de un polipéptido STIgMA fusionado a una secuencia de región constante de inmunoglobulina, en el que el polipéptido STIgMA tiene por lo menos un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 32, 33 y 34, con o sin la secuencia señal nativa, con o sin la metionina de iniciación, con o sin toda o parte del dominio transmembrana potencial y con o sin el dominio intracelular.
- 10 2. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido STIgMA tiene por lo menos un 85% ó 90% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NOs: 32, 33 ó 34.
- 15 3. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según la reivindicación 2, en el que dicho polipéptido STIgMA tiene por lo menos un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NOs: 32, 33 ó 34.
- 20 4. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según la reivindicación 3, que comprende la secuencia del dominio extracelular (ECD) de un polipéptido STIgMA seleccionado del grupo que consiste en las SEC ID NOs: 32, 33 y 34, fusionada a una secuencia de región constante de inmunoglobulina.
- 25 5. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la secuencia ECD está esencialmente libre del dominio transmembrana y el dominio citoplasmático de dicho polipéptido STIgMA.
- 30 6. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según la reivindicación 5, en el que la secuencia ECD comprende los residuos de aminoácidos:
1 o aproximadamente 21 a X de SEC ID NO:32, donde X es cualquier aminoácido desde aproximadamente 271 a 281;
1 o aproximadamente 21 a X de SEC ID NO:33, donde X es cualquier aminoácido desde aproximadamente 178 a 186; o
35 1 o aproximadamente 21 a X de SEC ID NO:34, donde X es cualquier aminoácido desde aproximadamente 176 a 184.
- 40 7. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la inmunoglobulina es una IgG.
- 45 8. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según la reivindicación 7, en el que la inmunoglobulina es una IgG1 o IgG3.
- 50 9. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria crónica.
- 55 10. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la enfermedad inflamatoria es una enfermedad inflamatoria del tipo Th2.
- 60 11. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la enfermedad inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide; enfermedad inflamatoria del intestino; hepatitis crónica; neumonía; asma crónica y bronquitis.
12. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para utilizar en el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
13. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para utilizar en el tratamiento de la artritis reumatoide.

14. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según la reivindicación 13, para utilizar en el alivio de la inflamación, hinchamiento y/o erosión ósea a largo plazo en las articulaciones.
- 5 15. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, para utilizar en el tratamiento de aterosclerosis.
16. Polipéptido para utilizar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la enfermedad inflamatoria no es microbiana.
- 10 17. Utilización de un polipéptido tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria asociada con la sobreexpresión de STIgMA.
- 15 18. Utilización según la reivindicación 17, en el que la enfermedad inflamatoria es tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16.

Figura 1B

```

A33      186  - - - P L A Q P A S G Q P V S L K N I S T D T S G Y Y I C T S S N E E G - - - - - T Q F C N I T V
40628    184  S N S S Y V L N P T T G E L V F D P L S A S D T G E Y S C E A R N G Y G - - - - - T P M T S N A V
45416    188  - - - - I K V A T L S T L L F K P A V I A D S G S Y P F C T A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D
35638    186  T N S S Y T M N T K T G T L Q F N T V S K L D T G E Y S C E A R N S V G - - - - - Y R R C P G K R
JAM      184  M N S S F T I D P K S G D L I F D P V T A F D S G E Y Y C Q A Q N G Y G - - - - - T A M R S E A A

A33      227  A V R S P S M N V A L Y V G I A V G V V A A L I I G I I Y C C C C R G K D D N I E D K E D A - -
40628    228  R M E A V E R N V G V I V A A V L V T L I L L G I L V F G I W F A Y S R G H F D R T K K G T S - - -
45416    233  S S K L L K T K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G K S L
35638    230  - M Q V D D L N I S G I I A A V V V A L V I S V C G L G V C Y A Q R K G Y F S K E T S F Q K S - -
JAM      228  H M D A V B L N V G G I V A A V L V T L I L L G L L I F G V W F A Y S R G Y F E T T K K G T A P - -

A33      275  - R P N R E A Y E E P P E Q L R E L S R E R E E E D D Y R Q E E Q R S T G R E S P D H L D Q
40628    275  - - - - - S K K V I Y S Q P S A R S E G E F K Q T S S F L V - - - - -
45416    283  P V F A I I L I S L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q E H V Y E A A R - - - - -
35638    277  - N S S K A T T M - S E N V Q W L T P V I P A L W K A A G G S R G Q E F - - - - -
JAM      276  - - - - - G K K V I Y S Q P S T R S E G E F K Q T S S F L V - - - - -
    
```

Figura 2

SEQ ID NO: 1
 Met Gly Thr Lys Ala Gly Val Glu Arg Lys Leu Leu Cys Leu Phe Ile Leu Ala Ile Leu Leu Cys Ser Leu Ala Leu Gly Ser Val Thr 30
 5 10 15 20 25 30
 Val His Ser Ser Glu Pro Glu Val Arg Ile Pro Glu Asn Asn Pro Val Lys Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Gly Phe Ser Ser Pro Arg Val 60
 35 40 45 50 55 60
 Glu Trp Lys Phe Asp Gln Gly Asp Thr Thr Arg Leu Val Cys Tyr Asn Asn Lys Ile Thr Ala Ser Tyr Glu Asp Arg Val Thr Phe Leu 90
 65 70 75 80 85 90
 Pro Thr Gly Ile Thr Phe Lys Ser Val Thr Arg Glu Asp Thr Thr Tyr Thr Cys Met Val Ser Glu Gly Glu Asn Ser Tyr Gly 120
 95 100 105 110 115 120
 Glu Val Lys Val Lys Leu Ile Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Thr Val Asn Ile Pro Ser Ser Ala Thr Ile Gly Asn Arg Ala Val 150
 125 130 135 140 145 150
 Leu Thr Cys Ser Glu Gln Asp Gly Ser Pro Pro Ser Glu Tyr Thr Trp Phe Lys Asp Gly Ile Val Met Pro Thr Asn Pro Lys Ser Thr 180
 155 160 165 170 175 180
 Arg Ala Phe Ser Ser Ser Tyr Val Leu Asn Pro Thr Thr Gly Glu Leu Val Phe Asp Pro Leu Ser Ala Ser Asp Thr Gly Glu Tyr 210
 185 190 195 200 205 210
 Ser Cys Glu Ala Arg Asn Gly Tyr Gly Thr Pro Met Thr Ser Asn Ala Val Arg Met Glu Ala Val Glu Arg Asn Val Gly Val Ile Val 240
 215 220 225 230 235 240
 Ala Ala Val Leu Val Thr Leu Ile Leu Leu Gly Ile Leu Val Phe Gly Ile Trp Phe Ala Tyr Ser Arg Gly His Phe Asp Arg Thr Lys 270
 245 250 255 260 265 270
 Lys Gly Thr Ser Ser Lys Lys Val Ile Tyr Ser Gln Pro Ser Ala Arg Ser Glu Gly Glu Phe Lys Gln Thr Ser Ser Phe Leu Val 299
 275 280 285 290 295 299

Figura 3

SEQ ID NO: 2

1 MGILLGLLL GHLTVDYGR PILEVPESVT GPWKGDVNP CTDPLQGYT QVLVKWLVQR GSDPVTIFLR DSSGDHIQQA KYQGRLHVSH KVPGDVSLQL

101 STLEMDDRRH YTCEVTWQTP GDNQVVRDKI TELRVQKLSV SKPTVTTGSG YGFTVPQGMR ISLQCCARGS PPISTIWKYQ QTNNQEPKIV ATLLTLLFKP

201 AVIADSGSYF CTAKGQVGE QHSDIVKFFV KDSSKLLKTK TEAFTTMTYP LKATSTVKQS WDWTTDMDGY LGETSAGFGK SLPVFAIILI ISLCCMVVET

301 MAYIMLCRKT SQQEHYYEAA R

^Glycosaminoglycan attachment site

Dominio transmembrana

FIGURA 8

SEQ ID NO: 3

DNA35936

CTTCTTGCCA ACTGGTATCA CCTTCAAGTC CGTGACACGG GAAGACACTG 50
 GGACATACAC TTGTATGGTC TCTGAGGAAG GCGGCAACAG CTATGGGGAG 100
 GTCAAGGTCA AGCTCATCGT GCTTGTGCCT CCATCCAAGC CTACAGTTAA 150
 CATCCCCTCC TCTGCCACCA TTGGGAACCG GGCAGTGCTG ACATGCTCAG 200
 AACAAAGATGG TTCCCCACCT TCTGAATACA CCTGGTTCAA AGATGGGATA 250
 GTGATGCCTA CGAATCCCAA AAGCACCCGT GCCTTCAGCA ACTCTTCCTA 300
 TGTCTGAAT CCCACAACAG GAGAGCTGGT CTTTGATCCC CTGTCAGCCT 350
 CTGATACTGG AGAATACAGC TGTGAGGCAC GGAATGGGTA 390

FIGURA 4A

SEQ ID NO: 4

consen01

TCTCAGTCCC CTCGCTGTAG TCGCGGAGCT GTGTTCTGTT TCCCAGGAGG 50
 CCTTCGGCGG CTGTTGTGCT CAGGTGCGCC TGATCGCGAT GGGGACAAAG 100
 GCGCAAGCTC GAGAGGAAAC TGTGTGTGCCT CTTCATATTG GCGATCCTGT 150
 TGTGCTCCCT GGCATTGGGC AGTGTTACAG TTGCACTCTT CTGAACCTGA 200
 AGTCAGAATT CCTGAGAATA ATCCTGTGAA GTTGTCTGT GCCTACTCGG 250
 GCTTTTCTTC TCCCCGTGTG GAGTGGAAGT TTGACCAAGG AGACACCACC 300
 AGACTCGTTT GCTATAATAA CAAGATCACA GCTTCCTATG AGGACCGGGT 350
 GACCTTCTTG CCAACTGGTA TCACCTTCAA GTCCGTGACA CGGGAAGACA 400
 CTGGGACATA CACTTGTATG GTCTCTGAGG AAGGCGGCAA CAGCTATGGG 450
 GAGGTCAAGG TCAAGCTCAT CGTGCTTGTG CCTCCATCCA AGCCTACAGT 500
 TAACATCCCC TCCTCTGCCA CCATTGGGAA CCGGCAGTG CTGACATGCT 550
 CAGAACAAGA TGGTTCCCCA CCTTCTGAAT ACACCTGGTT CAAAGATGGG 600
 ATAGTGATGC CTACGAATCC CAAAAGCACC CGTGCCTTCA GCAACTCTTC 650
 CTATGTCCTG AATCCCACAA CAGGAGAGCT GGTCTTTGAT CCCCTGTCAG 700
 CCTCTGATAC TGGAGAATAC AGCTGT 726

FIGURA 4B

Figura 4C

SEQ ID NO: 5

consen02

GCAGGCAAAG TACCAGGGCC GCCTGCATGT GAGCCACAAG GTTCCAGGAG 50
 ATGTATCCCT CCAATTGAGC ACCCTGGAGA TGGATGACCG GAGCCACTAC 100
 ACGTGTGAAG TCACCTGGCA GACTCCTGAT GGCAACCAAG TCGTGAGAGA 150
 TAAGATTACT GAGCTCCGTG TCCAGAAACT CTCTGTCTCC AAGCCCACAG 200
 TGACAACTGG CAGCGGTTAT GGCTTCACGG TGCCCCAGGG AATGAGGATT 250
 AGCCTTCAAT GCCAGGGTTC GGGGTTCTCC TCCCATCAGT TATATTTGGT 300
 ATAAGCAACA GACTAATAAC CAGGGAACCC ATCAAAGTAG CAACCCTAAG 350
 TACCTTACTC TTCAAGCCTG CGGTGATAGC CGACTCAGGC TCCTATTTCT 400
 GCACTGCCAA GGGCCAGGTT GGCTCTGAGC AGCACAGCGA CATTGTGAAG 450
 TTTGTGGTCA AAGACTCCTC AAAGCTACTC AAGACCAAGA CTGAGGCACC 500
 TACAACCATG ACATACCCCT TGAAAGCAAC ATCTACAGTG AAGCAGTCCT 550
 GGGACTGGAC CACTGACATG GATGGCTACC TTGGAGAGAC CAGTGCTGGG 600
 CCAGGAAAGA GCCTGCCTGT CTTTGCCATC ATCCTCATCA TCTCCTTGTG 650
 CTGTATGGTG GTTTTTACCA TGGCCTATAT CATGCTCTGT CGGAAGACAT 700
 CCCAACAAGA GCATGTCTAC GAAGCAGCCA GGGCACATGC CAGAGAGGCC 750
 AACGACTCTG GAGAAACCAT GAGGGTGGCC ATCTTCGCAA GTGGCTGCTC 800
 CAGTGATGAG CCAACTTCCC AGAATCTGGG GCAACAATA CTCTGATGAG 850
 CCCTGCATAG GACAGGAGTA CCAGATCATC GCCCAGATCA ATGGCAACTA 900
 CGCCCGCCTG CTGGACACAG TTCCTCTGGA TTATGAGTTT CTGGCCACTG 950
 AGGGCAAAG TGTCTGTTAA AAATGCCCA TTAGGCCAGG ATCTGCTGAC 1000
 ATAATTGCCT AGTCAGTCCT TGCCTTCTGC ATGGCCTTCT TCCCTGCTAC 1050
 CTCTCTTCTT GGATAGCCCA AAGTGTCCGC CTACCAACAC TGGAGCCGCT 1100
 GGGAGTCACT GGCTTTGCC TGAATTTGC CAGATGCATC TCAAGTAAGC 1150
 CAGCTGCTGG ATTTGGCTCT GGGCCCTTCT AGTATCTCTG CCGGGGGCTT 1200
 CTGGTACTCC TCTCTAAATA CCAGAGGGAA GATGCCATA GCACTAGGAC 1250
 TTGGTCATCA TGCCTACAGA CACTATTCAA CTTTGGCATC TTGCCACCAG 1300
 AAGACCCGAG GGGAGGCTCA GCTCTGCCAG CTCAGAGGAC CAGCTATATC 1350
 CAGGATCATT TCTCTTTCTT CAGGGCCAGA CAGCTTTTAA TTGAAATTGT 1400
 TATTTACAG GCCAGGGTTC AGTTCTGCTC CTCCACTATA AGTCTAATGT 1450
 TCTGACTCTC TCCTGGTGCT CAATAAATAT CTAATCATAA CAGCAAAAAA 1500
 AAA 1500

Figura 5

SEQ ID NO: 11

GTCTGTTCC AGGAGTCCCTT CGGGCGCTGT TGTGTCACTG GCCTGATCCG GATGGGACA AAGGGCAAG TCGAGAGGAA ACTGTGTGTC CTCTTCATAT 100
 TGGGATCCT GTTGTGCTCC CTGGCAITGG GCAGTGTAC AGTCACTCT TCTGAACCTG AAGTCAGAAT TCCTGAGAAT AATCTGTGA AGTTGTCCCTG 200
 TGCCTACTCG GGCCTTTCTT CTCCCGTGT GAGTGGGAG TTTGACCAAG GAGACACCAC CAGACTCGTT TGCCTATAATA ACAAGATCAC AGCTTCCTAT 300
 GAGGACCGG TGACCTTCTT GCCAACTGGT ATCACCITCA AGTCCTGAC ACGGGAAGAC ACTGGGACAT ACACCTGTAT GGTCTCTGAG GAAGGGCGCA 400
 ACAGCTATGG GGAGGTCAAG GTCAAGCTCA TCGTGTCTGT GCCTCCATCC AAGCCTACAG TTAACATCCC CTCTCTGCC ACCATTGGGA ACGGGCAGT 500
 G CTGACATGC TCAGAACAMG ATGGTTCCCC ACCTTCTGAA TACACCTGGT TCAAAGATGG GATAGTATG CCTACGAATC CCAAAGCAC CCGTGCCTTC 600
 AGCAACTCTT CCTATGTCT GAAATCCACA ACAGGAGAGC TGGTCTTGA TCCCTGTCA GGCCTGTGATA CTGGAGAATA CAGCTGTGAG GCACGGGAATG 700
 GTATGGGAC ACCCATGACT TCAAATGCTG TCGCATGGA AGCTGTGGAG CGGAATGTGG GGTTCATGCT CTTGTAAACC TGAATTCCTCT 800
 GGGATCTTG GTTTTTGGCA TCTGTTTTC CTATAGCCGA GGCCACTTTG ACAGAACAAA GAAAGGACT TCGAGTAAGA AGGTGATTTA CAGCCAGCCT 900
 A GTGCCGAA GTGAAGGAGA ATTCAAACAG ACCTGTCTAT TCCTGGTGTG AGCCTGGTGG GCTCACCCGC TATCATCTGC ATTTGCCCTA CTCAGGTGCT 1000
 A CCGGACTCT GGGCCCTGAT GTCTGTAGTT TCACAGGATG CCTTATTTGT CTCTACACC CCACAGGCC CCTTACTTCT TCGGATGTGT TTTTAAATAAT 1100
 G TCAGCTATG TGCCCATCC TCCTTCATGC CCTCCCTCCC TTTCTACCA CTGCTGATG GCCTGGAAT TGTTTAAAGT GTTTATTOCC CAITTCCTTG 1200
 A GGGATCAGG AAGGAATCCT GGGTATGCCA TTGACTTCCC TTCTAAGTAG ACAGCAAAA TGCCGGGGGT CGCAGGAATC TGCCTCAAC TGCCACCTG 1300
 G CTGGCAGG ATCTTTGAAT AGGTATCTTG AGCTTGGTTC TGGGCTCTT CCTTGTGTAC TGACGACCAG GGCAGGCTGT TCTAGAGGG GAAITTAGAGG 1400
 CTAGAGCCG TGAATGGTT GTTTGGTCAAT GACTGTGGG TCCTTCCATC TCTGGGCCC ACTCTCTTCT GTCTCCCAT GGGAAAGTCC ACTGGATCC 1500
 CTCTGCCCTG TCCTCTGAA TACAAGCTGA CTGTCTGTGT GGAAATGGG AGCTCTTGTG GTGGAGGCA TAGTAAATTT TCAGAGAACT 1600
 TGAAGCCAA AGGATTTAAA ACCGCTGCTC TAAAGAAAAG AAAACTGGAG GCTGGGCCA GTGGCTCAG CCTGTAAATCC CABAGGCTGA GGCAGGGCGA 1700
 TCAACTGAG TGGGAGTTC GGGATCAGCC TGACCAACAT GGAGAAACC TACTGGAAT ACAAGTTAG CCAGGCATGG TGGTGCATGC CTGTAGTCCC 1800
 AGCTGCTCAG GAGCCTGGCA ACAAGAGCAA AACTCCAGCT CA 1842

TTT 2

Figura 6A

SEQ ID NO:7

1 CCCACGGTC GCGCCAGCG TCGCCCCAGG GGTCCGCCCA CCGGTCCGGG CCACGAGAAG TTTGAGGCTC TTGGGTAGCA GGAGGTGGA AGAAGGACA
GGGTGGCAG GCGGTGGC AGCGGGTGC CCAGGGGGT GGCAGGCC CCAGGCTTC AAACCTGGAG AAACCATCGT CCTCCGACCT TCTTCCCTGT

01 GAAGTAGTC TGGGTGTGAT GGGGATCTTA CTGGSCCTGC TACTCTCTGG GCACCTAACA GTGGACACTT ATGGCCGTCC CATCTGGAA GTGCCAGAGA
CTTCATCGAG ACCGACACTA CCCCTAGAAAT GACCCGGACG ATGAGGACCC CGTGGATTGT CACCTGTGAA TACCGGCAGG GTAGGACCTT CACGGTCTCT

1 SEQ ID NO:2 M G I L L G L L L L G H L T V D T Y G R P I L E V P E S
^MET

01 GTGTAACAGG ACCTTGGAAA GGGGATGTGA ATCTTCCCTG CACCTATGAC CCCCTGCAAG GCTACACCCA AGTCTTGGTG AAGTGGCTGG TACAACGGTG
CACATTTGCC TGGAACCTTT CCCCTAGACT TAGAAGGGAC GTGGATACTG GGGGACGTTT CGATGTGGT TCAGAACCAC TTCACCGACC ATGTTGCACC

29 V T G P W K G D V N L P C T Y D P L Q G Y T Q V L V K W L V Q R G

01 CTCAGACCT GTACACATCT TTCTACGTGA CTCTTCTGGA GACCATATCC AGCAGGCAAA GTACCAGGGC CCGCTGCATG TGAGCCACAA GGTTCACAGGA
GAGTCTGGGA CAGTGGTAGA AAGATGCACT GAGAAGACCT CTGGTATAGG TCCTCCGTTT CATEGTCCC GCGGACGTAC ACTCGGTGTT CCAAGGTCTT

62 S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q A K Y Q G R L H V S H K V P G

01 GATGTATCCC TCCAATTGAG CACCTGGAG ATGGATGACC GGAGCCACTA CAGGTGTGAA GTCACTGGC AGACTCTGA TGGCAACCAA GTCGTGAGAG
CTACATAGG AGGTTAATC GTGGGACCTC TACCTACTGG CCTCGGTGAT GTGCACACTT CAGTGGACCG TCTGAGACT ACCGTTGGTT CAGCACCTC

95 D V S L Q L S T L E M D D R S H Y T C E V T W Q T P D G N Q V V R D

01 ATAAGATTAC TGAGCTCCGT GTCCAGAAAC TCTCTGTCTC CAAGCCACA GTGACAACCTG GCACCGGTTA TGGCTTCAGG GTGCCCCAGG GAATGAGGAT
TATTTCTAATG ACTCGAGGCA CAGGTCTTTG AGAGACAGAG GTTCGGGTGT CACTGTTGAC CGTCGCCAAT ACCGAAAGTGC CACGGGTTC CTTACTCCTA

29 K I T E L R V Q K L S V S K P T V T T G S G Y G F T V P Q G M R I

01 TAGCTTCAA TGGCAGGCTC GGGGTTCTCC TCCCATCAGT TATATTTGGT ATAAGCAACA GACTAATAAC CAGGAACCCA TCAAAGTAGC AACCTAAGT
ATCGGAAGTT ACGGTCCGAG CCCCAAGAGG AGGTAGTCA ATATAACCA TATTCGTTGT CTGATTTATG GTCCITGGGT AGTTTCATCG TTGGGATTC

62 S L Q C Q A R G S P P I S Y I W Y K Q Q T N N Q E P I K V A T L S

01 ACCTTACTCT TCAAGCCTGC GGTGATAGCC GACTCAGGCT CCTATTTCTG CACTGCCAAG GGCAGGTTG GCTCTAGCA GCACAGGCAC ATTGTGAAGT
TGGAAATGAGA AGTTCGGACG CCACTATCGG CTGAGTCCGA GGATAAGAC GTGACGGTTC CCGTCCCAAC CGAGACTCGT CGTGTCCGTG TAACACTTCA

95 T L L F K P A V I A D S G S Y F C T A K G Q V G S E Q H S D I V K F

01 TTGTGGTCAA AGACTCCTCA AAGCTACTCA AGACCAAGAC TGAGGCACCT ACAACATGA CATACCCTT GAAAGCAACA TCTACAGTGA AGCAGTCTCTG
AACACCAGTT TCTGAGGAGT TTGATGAGT TCTGGTTCTG ACTCCGGTGA TGTTGGTACT GTATGGGAA CTTTCTGTTG AGATGTCACT TCGTCAGGAC

29 V V K D S S K L L K T K T E A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W

Figura 6B

SEQ ID NO: 7 901 GGACTGGACC ACTGACATGG ATGGCTACCT TGGAGAGACC AGTGTGGGG CAGGAAAGAG CCTGGCCGTGCT TTGGCATCA TCCTCATCAT CTCCTTGTGC
 CCTGACCCTGG TCACTGTACC TACCGATGGA ACCCTCTGG TCAGACCCG GTCCCTTCTC GGAGGACAG AAGCGTAGT AGGAGTAGTA GAGGAACAG
 SEQ ID NO: 2 262 D W T T D M D G Y L G E T T S A G P G K S L P V F A I L I L I S L C
 1001 TGTATGGTGG TTTTACCAT GGCCTATATC ATGCTCTGTC GGAAGATC CCACAGAG CATGTCTAOC AAGCAGCCAG GTAAGAAAGT CTCCTCCTTT
 ACATACCACC AAAAATGGTA CCGGATATAG TACGAGACAG CTTCTGTAG GGTGTCTC GTACAGATOC TTGTGGTTC CATTCTTTCA GAGAGGAA
 295 C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q E H V Y E A A R O
 1101 CCÁTTTTTGA CCGCGTCCCT GCCCTCAATT TTGATTACTG GCAGGAAATG TGGAGGAAAG GGGGTGTGGC ACACACCCAA TCCTAAGGCC EGAGGCTTC
 GGTAAAACCT GGGGCAGGGA CCGGAGTTAA AACTAATGAC CGTCCCTTAC ACCTCCCTOC CCCCACACCG TGTCTGGGT AGGATTCOCG CCTCCGGAAAG
 1201 AGGGTCAGGA CATAGCTGCC TTCCCTCTCT CAGGCACCTT CTGAGGTGTG TTTGGCCCTC TGAACACAAA GCATAAATTTA GATCCATCTG CCTTCTGCTT
 TCCCACTCCT GTATCGAOCG AIGGGAGAGA GTCCGTGAA GACTCCAACA AAACCGGAG ACTTGTGTTT CCTATTAAAT CTAGGTAGAC GGAAGACGAA
 1301 CCAGAAATCC TGGGTGGTAG GATCCGATA ATTAATTGCG AGAATTTGAG GCAGAAAGGT GGGAAACCAG GACCACGCC CCAAGTCCCT TCTTATGGGT
 GGTCTTAGGG ACCCACCATC CTAGGACTAT TAAITTAACG TTCTTAACTC GGTCTTCCA CCGTTTGGTC CTGGTGTCCG GGTTCAGGGA AGAATACCCA
 1401 GGTGGGCTCT TGGCCATAG GGCACATGCC AGAGAGGCCA ACGACTCTGG AGAAACCATG AGGTTGCCA TCTTGGCAAG TGGCTGCTCC AGTCATGAGC
 GCACCCGAGA ACCCGTATC CCGTGTACG TCTCTCCGGT TGTCTGAGCC TCTTTGGTAC TCCCACCGGT AGAAGGGTTC ACCGACGAGG TCACCTACTG
 1501 CAACTTCCA GAATCTGGGC AACAACTACT CTGATAGCC CTGCATAGGA CAGGATGAC AGATCATGCG CCAGATCAAT GGCACACTAG CCGCGCTGCT
 GTTGAAGGCT CTTAGACCCG TTGTTGATGA GACTACTCCG GACTATCTCT GTCTCATGCG TCTAGTAGCG GGTCTAGTTA CCGTTGATGC GGGCGGACGA
 1601 GGACACAGTT CCTCTGGATT ATGAGTTTCT GGGCACTGAG GGCAAAAGTG TCTGTTAAA ATGCCCATT AGGCCAGAT CTGCTGACAT AATTGCCCTAG
 CCTGTGTCAA GGAGACCTAA TACTCAAAGA CCGGTGACTC CCGTTTTCAC AGACAATTTT TACGGGTTAA TCCGTCCTA GACGACTGTA TTAACGGATC
 1101 TCAGTCCITG CCTTCTGCAT GGCCTTCTTC CCTGCTACT CTCTCCCTGG ATAGCCCAA GTGTCCGCT ACCAACACTG GAGCCCTGG GAGTGCATCG
 AGTCAGGAAC GGAAGACGTA CCGGAAGAAG GGACGATGGA GAGAGGACC TATCGGGTTT CACAGGGGGA TGGTGTGAC CTCGGGACCC CTCAGTGAAC
 1801 CTTTGGCCCTG GAATTTGCCA GATGCATCTC AAGTAAGCCA GCTGCTGGAT TTGGCTCTG GCGCTTCTAG TATCTCTGCC GGGGGCTTCT GGTACTCCTC
 GAAAACGGAC CTTAAAACCGT CTACGTAGAG TTCAITTCGTT CAGCCACTA AACCGAGACC CCGGAAGATC ATAGAGACGG CCCCCGAAAG CCAITGAGGAG
 1901 TCTAAATACC AGAGGGAAGA TGGCCATAGC ACTAGGACTT GGTCAATCATG CCTACAGACA CTATTCAACT TTGGCATCTT GCCACCAGAA GACCCGAGGG
 AGATTTATGG TCTCCCTTCT ACGGGTATCG TGTACTGAA CCAGTAGTAC GATGTCTGT GATAAGTTGA AACCGTAGAA CCGTGGTCTT CTGGGCTCC
 2001 AGGCTCAGCT CTGCCAGCTT AGAGGACCAG CTATATCCAG GATCAATTTCT CTTTCTCAG GCGCAGACAG CTTTAAATGG AAATGTTAT TTCACAGGCC
 TCCGAGTCCA GACCGTCCAG TCTCCTGGTC GATATAGTC CTAGTAAAGA GAAAGAATC CCGGTCTGTC GAAAATTAAC TTTAACAAATA AAGTGTCCGG
 2101 AGGGTTCACT TCTCCTCCTC CACTATAAGT CTAATGTTCT GACTCTCC TGTTGCTCAA TAAATATCTA ATCATAACAG C
 TCCCAAGTCA AGACGAGGAG GTGATATCCA GATTACAGA CTGAGAGAG ACCACGAGTT AITTTATAGAT TAGTATTGTC G

Figura 7

SEQ ID NO: 8

CCCAGAAGTTCAAGGGCCCCCGGCCTCCTGCGCTCCTGCCGCCGGGACCCTCGACCTCCT
CAGAGCAGCCGGCTGCCGCCCGGGAAGATGGCGAGCAGGAGCCGCCACCGCCTCCTCCT
GCTGCTGCTGCGCTACCTGGTGGTGCCTGGGCTATCATAAGGCCTATGGGTTTTCTGC
CCAAAAGACCAACAAGTAGTCACAGCAGTAGAGTACCAAGAGGCTATTTTAGCCTGCAA
AACCCCAAAGAAGACTGTTTCCTCCAGATTAGAGTGGAAGAACTGGGTCGGAGTGTCTC
CTTTGTCTACTATCAACAGACTCTTCAAGGTGATTTTAAAAATCGAGCTGAGATGATAGA
TTTCAATATCCGGATCAAAAATGTGACAAGAAGTGATGCGGGGAAATATCGTTGTGAAGT
TAGTGCCCCATCTGAGCAAGGCCAAAACCTGGAAGAGGATACAGTCACTCTGGAAGTATT
AGTGGCTCCAGCAGTTCATCATGTGAAGTACCCTCTTCTGCTCTGAGTGGAAGTGTGGT
AGAGCTACGATGTCAAGACAAAGAAGGGAATCCAGCTCCTGAATACACATGGTTTAAGGA
TGGCATCCGTTTGCTAGAAAATCCCAGACTTGGCTCCCAAAGCACCAACAGCTCATAAC
AATGAATACAAAACCTGGAAGTCTGCAATTTAATACTGTTTCCAAACTGGACACTGGAGA
ATATTCCTGTGAAGCCCGCAATTCTGTTGGATATCGCAGGTGTCCTGGGAAACGAATGCA
AGTAGATGATCTCAACATAAGTGGCATCATAGCATCCGTAGTAGTTGTGGCCTTAGTGAT
TTCCGTTTGTGGCCTTGGTGTATGCTATGCTCAGAGGAAAGGCTACTTTTCAAAGAAAC
CTCCTTCCAGAAGAGTAATTCTTCATCTAAAGCCACGACAATGAGTGAAAATGTGCAGTG
GCTCACGCCTGTAATCCCAGCACTTTGGAAGGCCGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGA
GTTCTAGACCAGTCTGGCCAATATGGTGAAACCCCATCTCTACTAAAATACAAAATTAG
CTGGGCATGGTGGCATGTGCCTGCAGTTCAGCTGCTTGGGAGACAGGAGAATCACTTGA
ACCCGGGAGGCGGAGGTTCAGTGAGCTGAGATCACGCCACTGCAGTCCAGCCTGGGTAA
CAGAGCAAGATTCCATCTCAAAAATAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAAATAA
TGTAAGAATTCTTACAATAAATATAGCTTGATATTC

Figura 8

OLI2162 (35936.f1)
SEQ ID NO: 12

TCGCGGAGCTGTGTTCTGTTTCCC

OLI2163 (35936.p1)
SEQ ID NO: 13

TGATCGCGATGGGGACAAAGGCGCAAGCTCGAGAGGAAACTGTTGTGCCT

OLI2164 (35936.f2)
SEQ ID NO: 14

ACACCTGGTTCAAAGATGGG

OLI2165 (35936.r1)
SEQ ID NO: 15

TAGGAAGAGTTGCTGAAGGCACGG

OLI2166 (35936.f3)
SEQ ID NO: 16

TTGCCTTACTCAGGTGCTAC

OLI2167 (35936.f2)
SEQ ID NO: 17

ACTCAGCAGTGGTAGGAAAG

Figura 9A

SEQ ID NO:5
 1 GCAGGCAAG TACGAGGCC GCCTGCATGT GAGCCACAG CTTCCAGGAG ATGTAACCT CCAATGAGC ACCTCGGAGA TGGATGACCG GAGCCACTAC
 CGTCCCTTTC ATGCTCCCGG CGGACGTACA CTCGGTGTTC CAAGTCCTC TACATAGGA GGTACTCTCG TGGACCTCT ACCTACTGGC CTCGGTGATG
 ^42257.f1 SEQ ID NO:18
 101 AGGTGTGAG TCACCTGGCA GACTCCCTGAT GGCACCCAG TCGTAGAGA TAAGATACT GAGTCCGTG TCCAGAAACT CTCGTCTCC AAGCCACAG
 TGCACACTTC AGTGGACCGT CTGAGGACTA CCCTTGGTTC AGCACTCCT ATCTAATAA CTCAGGCAC AGGTCTTTGA GAGACAGAG TTCCGGGTGC
 201 TGACAACTGG CAGCGGTTAT GGCTTCAGG TGCCCCAGG AATGAGGAT AGCTTCAAT GCCAGGGTTC GGGGTCTCC TCCCATCAGT TATATTGGT
 ACTGTTGACC CTCGCCAATA CCGAATGCC ACGGGTCCC TTACTCTAA TCGGAAGTTA CGGTCCCAAG CCCCAGAGG AGGGTAGTCA ATATAAACCA
 301 ATATGCAACA GACTAATAAC CAGCGAACCC ATCAAGTAG CAACCCTAAG TACCTTACTC TTCAGCCTG CGGTGATAG CGACTCAGGC TCCATTCTT
 TATTCGTTGT CTGATTATTG GTCCTTGGG TAGTTTCACT GTTGGATTC ATGGAATGAG AAGTCCGAC GCCACTATCG GCTGATCCG AGGATTAAGA
 401 GCACCTGCCAA GGGCCAGTT GGCTCTGAG AGCACAGGA CATTGTGAAG TTTGTGCTA AAGACTCCTC AAAGCTACTC AAGACCAAGA CTCGAGGCACC
 CGTGACGGTT CCGGTCCAA CCGAGACTCG TCGTGTGCT GATACACTTC ^42257.f1 SEQ ID NO:20
 501 TACAACCATG ACATACCCCT TGAAGCAAC ATCTACAGTG AAGCAGTCT GGGACTGAC CACTGACATG GATGGCTACC TTGGAGAGAC CAGTGTGGG
 ATGTTGGTAC TGTATGGGA ACTTTGTTG TAGATCTCAC TTCTCAGGA CCTGACCTG GTGACTGTAC CTACCGATGG AACCTCTCG CTCACGACCC
 601 CCAGGAAGA CCTGCCTGT CTTTGCCTC ATCTCATCA TCTCCTTGTG CTGTATGTTG GTTTTACCA TGGCTATAT CATGCTCTGT CGGAAGACAT
 GGTCTTCTT CCGACGGACA GAAACGGTAG TAGGATGATG AGAGGAACAC GACATACCAC CAAAATGTT ACCGGATATA GTACGAGACA GCCTTCTGTA
 ^42257.f2 SEQ ID NO:19
 701 CCCAACAGA GCATGCTAC GAAGCAGCA GGGCACATGC CAGAGAGCC AAGACTCTG GAGAAACCAT GAGGGTGGCC ATCTTCGCAA GTGGCTGCTC
 GGTGTGTTCT CGTACAGATG CTTCTCTGTT CCGGTGTACG GTCTCTCGG TTGCTGAGAC CTCTTTGGTA CTCGCCCGG TAGAAGCCTT CACCGACGAG
 801 CAGTGTGAG CCAACTTCC AGATCTGGG GCAACAATA CTCGTATGAG CCTGTGATAG GAGAGGATA CCAGATATC GCCAGATCA ATGGCAACTA
 GTCACTACT GGTTCAGGG TCTTAGACC CTTTGTGAT GAGACTC GGGACCTATC CTCTCTCAT GGTCTAGTAG CGGTCTAGT TACCGTTGAT
 901 CGCCCGCTG CTGACACAG TCTCTTGA TATGATTTT TGGCCACTG AAGGCAAAAG TGTCTGTAA AATGCCCA TTAGGCCAGG ATCTGCTGAC
 GCGGGCGGAC GACTGTCTC AAGAGACTT AATACTCAA GACCGTGAC TCCCGTTTC ACAGACAAT TTTACGGGGT AATCCGGTCC TAGAGACTG
 1001 ATAAATGCTT AGTCACTCT TGCCTTCTG ATGGCTTCT TCCCTGTAC CTCTCTTCT GGATAGCCA AAGTGTCCG CTACCAACAC TGGAGCCCT
 TATTAAGGA TCAGTCAGA ACGGAGAGG TACCGAAGA AGGGACGATG GAGAGAAGA CCTATCCGCT TTCACAGGC GATGGTTGTG ACCTCGGCGA

Figura 9B

SEQ ID NO: 5
 101 GGGAGTCACT GGCTTTGCC TGGAAATTTGC CAGATGCATC TCAAGTAAGC CAGCTGCTGG ATTTGGCTCT GGGCCCTTCT AGTATCTCTG CCGGGGGCTT
 CCTCAGTGA CCGAAACGGG ACCTTAAACG GTCTACGTAG AGTTCAJTGG GTGACGAGCC TAAACCGAG CCCGGGAAGA TCATAGAGAC GGCCCCCGAA
 ~42257.2 SEQ ID NO: 21
 201 CTGGTACTCC TCTCTAAATA CCAGAGGGAA GATGCCCATG GCACTAGGAC TTGGTCATCA TGCCTACAGA CACTATTCAA CTTTGGCATC TTGCCACCAG
 GACCATGAGG AGAGATTTAT GGTCTCCCTT CTACGGGTAT CGTGATCCTG AACCCAGTAGT ACGGATGCTCT GTGATAAGTT GAAACCCGTAG AACGGTGGTC
 301 AAGACCCGAG GGGAGGCTCA GCTCTGCCAG CTCAGAGGAC CAGCTATATC CAGGATCATT TCTCTTCTTT CAGGGCCAGA CAGCTTTTAA TTGAAATTGT
 TTCTGGGCTC CCCTCCGAGT CGAGACGGTC GAGTCTCCTG GTCGATATAG GTCCTAGTAA AGAGAAAAGAA GTCGCCGCTCT GTCGAAAATT AACCTTTAACA
 401 TATTTACAG GCCAGGGTTC AGTTGTGCTC CTCCACTATA AGTCTAATGT TCTGACTCTC TCCTGGTGTCT CAATAAATAT CTAATCATAA CAGCAAAAAA
 ATAAAGTGTG CCGTCCCAAG TCAAGACGAG GAGGTGATAT TCAGATTACA AGACTGAGAG AGGACCAGGA GTTATTATATA GATTAGTATT GTCGTTTTTT
 501 AAA
 TTT

Figura 10B

Valoración = 245 (86,2 bits), Esperado = 3,6e-19, P = 3,6e-19
 Identidades = 83/273 (30%), Positivos = 131/273 (47%) a 112, 12, Marco = +1

```

DNA40628      112  LCSL--ALGSVTVHSSEPEVRI PENNPVKLS CAYSGFSSPR--VEW-KFDQGDITRLVC
SEQ ID NO: 25
A33_human    12   LCAVRTVDAISVETPQDVLRASQKSVTL PCTYHTS TS SRGLIQWDKLLLTHTERVVI
SEQ ID NO: 24

DNA40628      274  --YNNK--ITAS-YEDRVTFLL-----PTGITFKSVTREDITGTYTCMVSEEGGNSYGEVK
A33_human    72   WPF SNKNIYIHGELYKNRYSI SNNAEQSDASITIDQLTMADNGTYECSVSLMS-DLEGNTK

DNA40628      421  --VKLIVLVPPSKPTVNI PSSATIGNRAVLTCSEQDGSPPSEYTWFKDGI VMPTNPKSTR
A33_human    131  SRVRLVLVPPSKPEGIEGETIIGNNIQLTCQSKEGSP TPQYSWKRYNILNQEQP-----

DNA40628      595  AFSNSSYVLNPTTGELV-FDPLSASDTGEYSCEARNGYGT PMTSNAVRMEAVERNVGV--
A33_human    187  -----LAQPASGQPVSLKNI STDTSGYYICTS SNEEGTQFCNITVAVRSPSMVALYV

DNA40628      766  -IVAAVLVTLILLGILVPGIWFAYSRGHFDRT--KKGTSSKKVIYSQP
A33_human    240  GIAVGVAALIIIGIIY---CCCCRGKDDNTEDKEDARPNREAYEEP
    
```

Figura 11

·SEQ ID NO: 9
MARRSRHRLLLLRYL VVALGYHKA YGFSAPKDQQVVTA VEYQBA I LACKTPKKTVSSR
LEWKKLGRSVSFVYYQQLQGDFKNRAEMIDFNIRIKNVTRSDAGKYRCEVSAPSEQGQN
LEEDTVTLEVLVAPAVPSCPSSALS GTVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGI RLLLENPR
LGSQSTNSSYTMNTKTGTLQFNTVSKLDTGEYSCEARN SVGYRRC PGKRMQVDDLNI SGI
IAAVVVVALVISVCGLGVCYAQRKGYFSKETS FQKSNSSSKAT TMSENVQWLT PVI PALW
KAAAGGSRGQEF

Figura 12

```

SEQ ID NO: 6  A33_hum  1  - - - - - M V G K M W P V L W T L C A V R V T V D A I S V E T P Q D V L R A S Q G K S V T L
SEQ ID NO: 1  40628  1  M G T K A Q V E R K L L C L F I A I L L C S - - L A L G S V T V H S S E P E V R I P E N N P V K L

A33_hum  42  P C T Y H T S T S S R E G L I Q W D K L L L T H T E R V V I W P F S N K N Y I H G E L Y K N R V S I
40628  49  S C A Y S G F S S P R - - - V E W - K F D Q Q G D T T R L V C - - Y N N K - - I T A S - Y E D R Y T F

A33_hum  92  S N N A E Q S D A S I T I D Q L T M A D N G T Y E C S V S L M S D L E G N T K S R V R L L V L V P P
40628  90  - - - - - L P T G I T F K S V T R E D T G T Y T C M V S E E G G - N S Y G E V K V K L I V L V P P

A33_hum  142  S K P E C G I E G E T I I G N N I Q L T C Q S K E G S P T P Q Y S W K R Y N I L N Q E Q P - - - - -
40628  133  S K P T V N I P S S A T I G N R A V L T C S E Q D G S P P S E Y T W F K D G I V M P T N P K S T R A

A33_hum  187  - - - - - L A Q P A S G Q P V S L K N I S T D T S G Y Y I C T S S N E E G T Q F C N I T V A V R S
40628  183  P S N S S Y V L N P T T G E - L V F D P L S A S D T G E Y S C E A R N G Y G T P M T S N A V R M E A

A33_hum  231  P S M N V A L Y V G I A V G V V A A L I I G I I Y C C - C C R G K D D N T E D K E D A R P N R E
40628  232  V E R N V G V - - - I V A A V L V T L I L L G I L V F G I W F A Y S R G H F D R T K K G T S S K K V

A33_hum  280  A Y E E P P E Q L R E L S R E R E E E D D Y R Q E E Q R S T G R E S P D H L D Q
40628  279  I Y S Q P S A R S E G E F K Q T S S F L V
    
```

Figura 13

```

SEQ ID NO: 6 A33_hum 1 M V G K M W P V L W T L C A V R V T V D A I S V E T P Q D V L R A S Q G K S V T L P C T Y H T S T S
SEQ ID NO: 2 45416 1 - M G I L L G L L L G H L T V D I Y G R P I L E V P E S V T G P W K G - D V N L P C T Y D P L Q G

A33_hum 51 S R E G L I Q W D K L L L T H T E R V V I W - P F S N K N Y I H G E L Y K N R V S I S N N A E Q S D
45416 49 Y T Q V L V K W - - L V Q R G S D P V T I F L R D S S G D H I Q Q A K Y Q G R L H V S H K V - P G D

A33_hum 100 A S I T I D Q L T M A D N G T Y E C S V S - L M S D L E G N T K S R V - - - - - R L L V L V P P S
45416 96 V S L Q L S T L E M D D R S H Y T C E V T W Q T P D G N Q V V R D K I T E L R V Q K L S V S K P T V

A33_hum 143 K P E C G I E G E T I I G N N I Q L T C Q S K E G S P T P Q Y S W K R Y N I L N Q E Q P L A Q P A S
45416 146 T T G S G Y G F T V P Q G M R I S L Q C Q A R - G S P P I S Y I W - - Y K Q Q T N N Q E P I K V A T

A33_hum 193 G Q P V S L K N I S T D T S G Y Y I C T S S N E E G T - Q F C N I - T V A V R S P S M N V A L Y V G
45416 193 L S T L L F K P A V I A D S G S Y F C T A K G Q V G S E Q H S D I V K F V V K D S S K L L K T K T E

A33_hum 241 I A V G V V A A L I I G I I Y C C C C R G K D D N T E D K E D A R P N R E A Y E E P P E Q L R E
45416 243 A P T T M T Y P L K A T S T V K Q S W D W T T D M D G Y L G E T S A G P G K S L P V F A I I I S

A33_hum 291 L S R E R E E E D D Y R Q E E Q R S T G R E S P D H L D Q
45416 293 L C C M V V F T M A Y I M L C R K T S Q Q E H V Y E A A R
    
```

Figura 14

```

SEQ ID NO: 6 A33_hum 1 - - MVGKMWPV L W T L C A V R V T V D - - - - A I S V E T P Q D V L R A S Q G K S V T L P C
SEQ ID NO: 9 35638 1 M A R R S R H R L L L L R Y L V V A L G Y H K A Y G F S A P K D Q Q V V T A V E Y Q E A I L A C

A33_hum 44 T Y H T S T S S R E G L I Q W K L L L T H T E R V I W P P S N K N Y I H G E L Y K N R V S I S N
35638 51 - - K T P K K T V S R L E W K K L - - - - - G R S V S F V Y Y Q Q T - L Q G D - F K N R - - - - -

A33_hum 94 N A E Q S D A S I T I D Q L T M A D N G T Y E C S V S L M S D L E G N - T K S R V R L L V L V P P S
35638 87 - A E M I D F N I R I K N V T R S D A C K Y R C E V S A P S E Q G Q N L E E D T V T L E V L V A P A

A33_hum 143 K P E C G I E G E T I I G N N I Q L T C Q S K E G S P T P Q Y S W K R Y N I L N Q E Q P L A Q P A S
35638 136 V P S C E V P S S A L S G T V V E L R C O D K E G N P A P E Y T W F K D G I R L L E N P R L G S Q S

A33_hum 193 G Q P V S L K N I S T D T S G Y Y I C T S S N E E G T Q F C N I T V A V - - R S P S M N V A L Y
35638 185 T N S S Y T M N T K I G T L Q F N T - V S K L D T G E Y S C E A R N S V G Y R R C P G K R M Q V D D

A33_hum 240 G I A V G V V A A L I I G I I I Y C C - - - C C R G K D D N T E D K E D A R P N R E A Y E E P P E
35638 235 L N I S G I I A A V V V V A L V I S V C G L G V C Y A Q R K G Y F S K E T S F Q K S N S S K A T T

A33_hum 287 Q L R E L S R - E R E E D D Y R Q E E Q R S T G R E S P D H L D Q
35638 285 M S E N V Q W L T P V I P A L W K A A A G G S R G Q E F
    
```

Figura 15

SEQ ID NO: 10 jam
 SEQ ID NO: 1 40628
 1 MGT E G K A G R K L L F L F T - S M I L G S L V Q G K G S V Y T A Q S D V Q V P E N E S I K L L T C
 1 M G T K A Q V E R K L L C L F I L A I L C S L A L G S V T V H S S E P E V R I P E N N P V K L S C

50 T Y S G F S S P R V E W K F V Q G S T T A L V C Y N S Q I T A P Y A D R V T F S S G I T F S S V T
 51 A Y S G F S S P R V E W K F D Q G D T T R L V C Y N N K I T A S Y E D R V T F L P T G I T F K S V T

94 R K D N G E Y T C M V S E E G G Q N Y G E V S I H L T V L V P P S K P T I S V P S S V T I G N R A V
 87 R E D T G T Y T C M V S E E G G N S Y G E V K V K L I V L V P P S K P T V N I P S S A T I G N R A V

150 L T C S E H D G S P P S B Y S W F K D G I S M L T A D A K K T R A F M N S S F T I D P K S G D L I F
 151 L T C S E Q D G S P P S B Y T W F K D G I - V M P T N P K S T R A F S N S S Y V L N P T T G E L V F

200 D P V T A F D S G E Y Y C Q A Q N G Y G T A M R S E A A H M D A V E L N V G I V A A V L V T L I L
 200 D P L S A S D T G E Y S C E A R N G Y G T P M T S N A V R M B A V E R N V G V I V A A V L V T L I L

250 L G L L I F G M W F A Y S R G Y F E T T K K G T A P G K K V I Y S Q P S T R S E G E F K Q T S S F L
 250 L G I L V F G I W F A Y S R G H F D R T K K G T - S S K K V I Y S Q P S A R S E G E F K Q T S S F L

300 V
 40628 299 V

Figura 16

```

SEQ ID NO: 10 jam
1 MGTEGKAGRKLFLFTSMILGSLVQKKG-SVYTAQSDVQVPENESIKLIT
1 .....MGILLGLLLGHLTVDTYGRPILEVPESTGPKWGDVNLIP

49 CTYS---GFSSPRVEWKFVQGSTTALV----CYNSQL-TAPYADRVRTFS-
41 CTYDPLQGYTQVLVKWLVQRGSDPVTIFLRDSSGDHIIQQAKEYQGRHLHVS
H

90 ....SSGITFSSVTRKDNGETCMV---SEGGQNYGEVSIHLTML-VPP
91 KVPGDVSLQLSTLEMDRSHYICEVETWQTPDGNQVVRDKITELRVMQKLSV

132 SKPTISVPS....SVTIGNRAVLTCEHDSGSPPEYSWFKDGISMLTADA
141 SKPTVTTGSGYGFVPPQGMRI SLQCQAR-GSPPI SYIHWYKQQTN--NQEP

178 KKTRAFMNSSFTIDPKSGDLIFDPVTAFDSGEYCYQAQNGYGTAMRSEAA
188 IKVATL.....STLLFKPAVIADSGSYFCTAKGQVGSBQHSDIV

228 H--MDAVEINVGGIVAVLVTLILLGLLIFG--VWFAYSRYGFETTKK
227 KPVVKDSSKLLKTKTEAPTMTYPLKATSTVKQSWDWTDMDGYLGETSA

272 GAPGKKVIYSQPSTRSEGEFKQTS SFLV
277 GPKSLPVFAIILIIISLCCMVVFTMAYIMLCRKTSQQEHVYEAA

```

Figura 17

SEQ ID NO: 10 jam 1 MGTEGKAGRKLLFLFTSMILGSLVQKGSVYTAQSDVQV--PENESIKL
 SEQ ID NO: 29 35638 1 --MARRSRNRLLLLLRYLVVALGYHKA YGFSAPKDKQVVTA VEYQEA IL

jam 48 TC-TYSGFSSPRVEWKFVQGSTTALVCYNSQITAPYADRVTFSSSGITFS
 35638 49 ACKTPKKTVSSRLEWKKL-GRSVSFVYQQTLQGDFKNRAEMIDFNJRIK

jam 97 SVTRKDNGBEYTCMVS--EBGGQNYGEVSIHLTVLVPSPKPTISVPSSVTI
 35638 98 NVTRS DAGKYRCEVSA PSEQQNLEEDTVL EVLVA PA VPSCEVPSSALS

jam 145 GNRAVLTCSBHDGSPSEYSWFKDGISMLTADAKKTRAFMNSSFTIDPKS
 35638 148 GKVVELRCQDKEGNPAPEYTWFKDGIRLL-ENPRLGQSSTNSYIMNTKT

jam 195 GDLIIFDPPVTAFDSGEYQCQNGYGTAMRSEAAHMDAVELVNCGI VAAVL
 35638 197 GTLQENTVSKLDTGEYSCEARN SVG-YRRC PGKRMQVDDLNI SGI IAAV V

jam 245 VTLLLLGLLIPGVWFAYSRGYFETTKKGTAPGKKVIYSQPS TRSEGEFKQ
 35638 246 VVALVISVCGLGVCYVQRKGYF---SKETSFKS NS SSKATMSEN VQWL

jam 295 TSSFLV
 35638 293 TPVIPALWKAAAGGSRQGEF

Figura 18

SEQ ID NO: 6 A33_hum 1 - - - - - M V G K M W P V L M T - L C A V R V T V D A I S V E T P Q D V L R A S Q G K S V T L P C T
 SEQ ID NO: 10 jam 1 M G T E G K A G R K L L F L F T S M I L G S L V Q G K G S V Y T A Q S D V Q V P E N E S I K L T C T

A33_hum 45 Y H T S T S S R R E G L I Q W D K L L L T H T E R V V I W P F S N K N Y I H G E L Y K N R V S I S N N
 jam 51 Y S G F S S P R - - - - - V E W - K F V Q G S T T A L V C - - Y N S Q - - I T A P - Y A D R V T F S S -

A33_hum 95 A E Q S D A S I T I D Q L T M A D N G T Y E C S V S L M S D L E G N T K S R V R L L V L V P P S K P
 jam 91 - - - - - S G I T F S S V I R K D N G E Y T C M V S E E G G - Q N Y G E V S I H L T V L V P P S K P

A33_hum 145 E C G I E G E T I I G N N I Q L T C Q S K E G S P T P Q Y S W K R Y N I L N Q E Q P L A Q P A S G Q
 jam 135 T I S V P S S V T I G N R A V L T C S E H D G S P P S E Y S W F K D G L S M L T A D A K K T R A F M

A33_hum 195 P V S L K N I S T D T S G Y I C T S S N E E G T Q F C N - - - - - I T V A V R S P S M N - - - - - V A I L
 jam 185 N S S F T I D P K S G D L I F D P V T A F D S G E Y Y C Q A Q N G Y G T A M R S E A A H M D A V E L

A33_hum 238 Y V - G I A V G V V A A L I I I G I I I Y C - - - - - C C C R G K D D N T E D K E D A R P N R E A Y E E
 jam 235 N V G G I V A A V L V T L I L L G L L I F G V W F A Y S R G Y F E - I T K K G T A P G K K V I Y S Q

A33_hum 284 P P E Q L R E L S R E R E E E D D Y R Q E E Q R S T O R E S P D H L D Q
 jam 284 P S T R S E G E F K Q T S S F L V

FIGURA 19

<u>TEJIDO</u>	<u>EXPRESIÓN</u>	<u>TEJIDO</u>	<u>EXPRESIÓN</u>	<u>TEJIDO</u>	<u>EXPRESIÓN</u>
CEREBRO COMPLETO	+	CORAZÓN	++	RIÑÓN	+++
AMÍGDALA NÚCLEO CAUDATO	+	AORTA	+	HÍGADO	++
CEREBELO	-	MÚSCULO ESQUELÉTICO	+	INTESTINO DELGADO	++
CORTEZA CEREBRAL	+	COLON	+++	BAZO	++
LÓBULO FRONTAL	+	VEJIGA	++	TIMO	++
HIPOCAMPO	+	ÚTERO	+	LEUCOCITO PERIFÉRICO	+
BULBO RAQUÍDEO	+	PRÓSTATA	+++	NÓDULO LINFÁTICO	+
LÓBULO OCCIPITAL	+	ESTÓMAGO	+++	MÉDULA ÓSEA	+
PUTAMEN	+	TESTÍCULOS	++		
SUSTANCIA NEGRA	+	OVARIO	+++	APÉNDICE	+
LÓBULO TEMPORAL	+	PÁNCREAS	++	PULMÓN	++++
TÁLAMO	+	GLÁNDULA PITUITARIA	++	TRÁQUEA	++++
NÚCLEO ACCUMBEUS	+	GLÁNDULA ADRENAL	++	PLACENTA	++++
MÉDULA ESPINAL	-	GLÁNDULA TIROIDES	++		
		GLÁNDULA SALIVAR	+++	CEREBRO FETAL	+
		GLÁNDULA MAMARIA	++	CORAZÓN FETAL	+
				RIÑÓN FETAL	++
				HÍGADO FETAL	+++
				BAZO FETAL	+
				PULMÓN FETAL	++++

Figura 20

ARNm elevado para JAM murino en ratones colíticos CRF2-4-/- en comparación con ratones de tipo salvaje

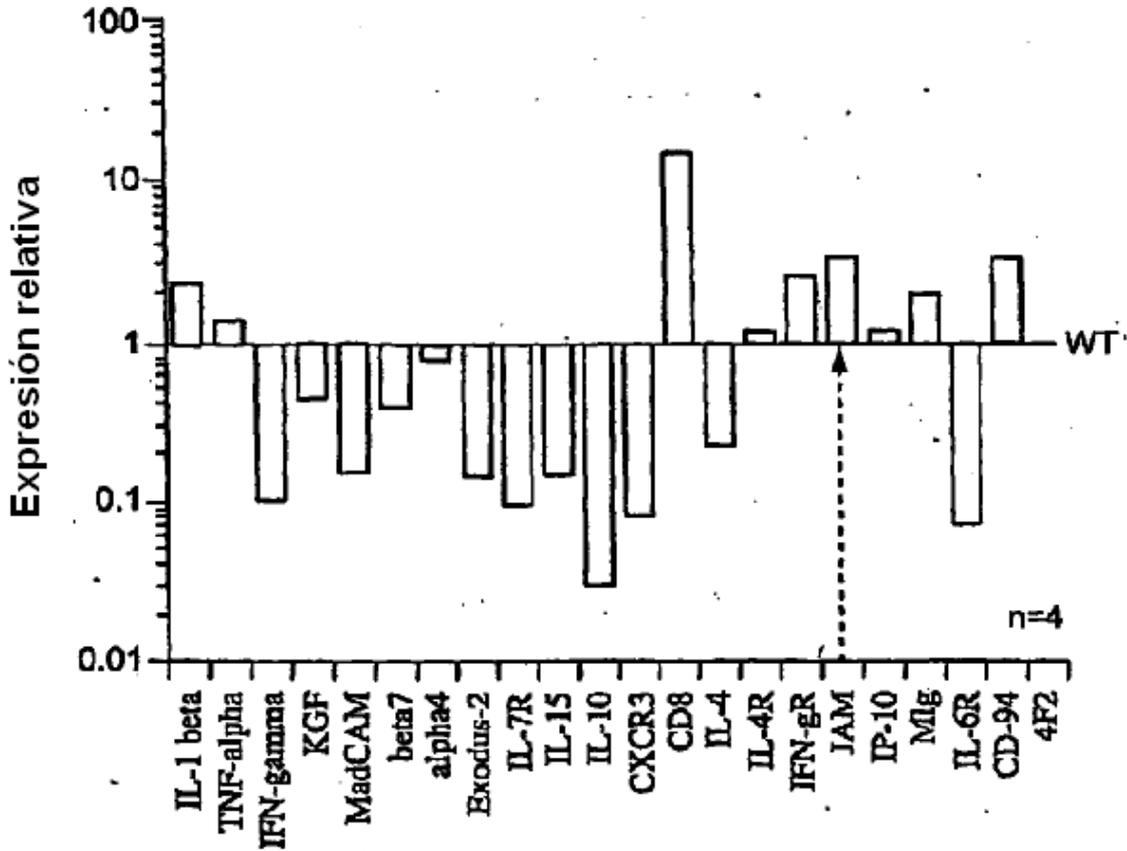


Figura 21

PIN370 se une a la superficie celular de neutrófilos humanos

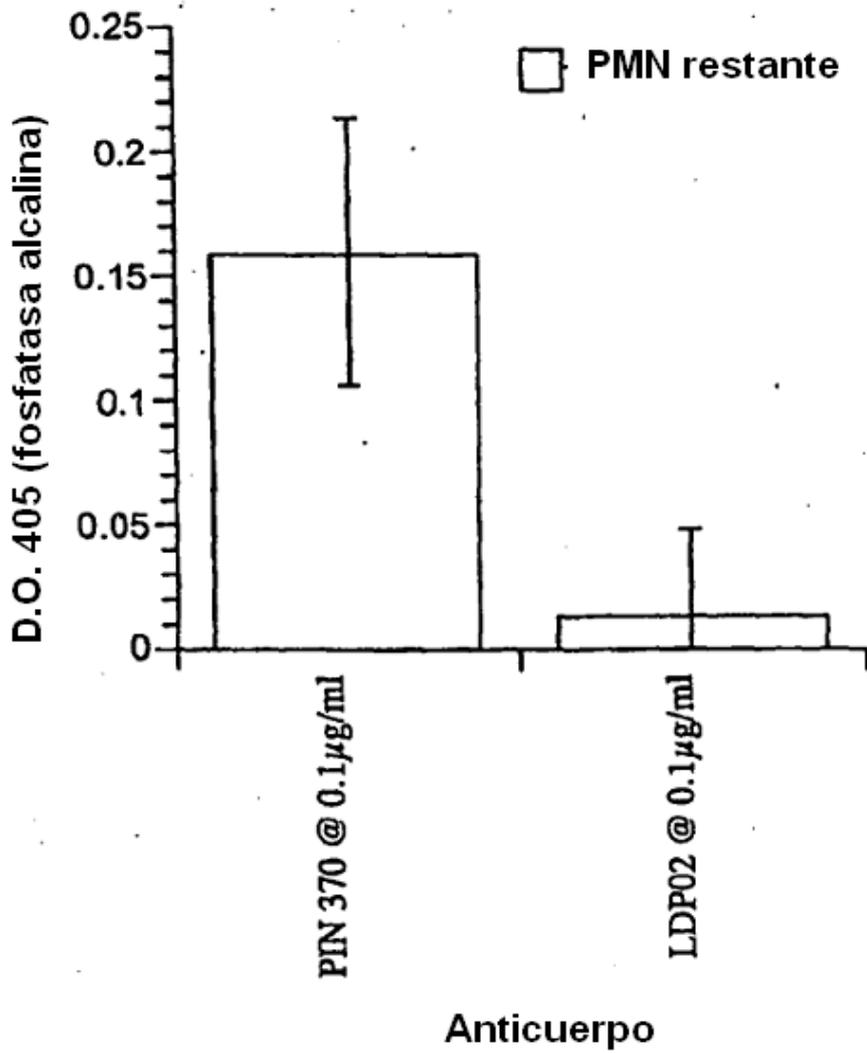


Figura 22

5

1 MALRRPRLRLCARLPDFFLLFRGCLIGAVNLKSSNRTPVVQEFESVELSCIITDSQT
 61 SDPRI EWKKIQDEQTTYVFEDNKIQGDLAGRAEILGKTSLKIVVNVTRRDSALYRCEWAR
 121 NDRKEIDEI VI ELTVQVKPVTVCVRPKAVPVGKMATLHCQESBGHPRPHYSWYRNDVPL
 181 PTDSRANPRFRNSSFHLNSETGTLVFTAVHKDDSGQYYCIA S NDAGSARCEEQEME VYDL
 241 NIGGI IGGVLVVLAVLALITLGI CCAYRRGYFINNKQDGESYKNPGKPDGVNYIRTDEEG
 301 DFRHKSSFVI

Figura 23

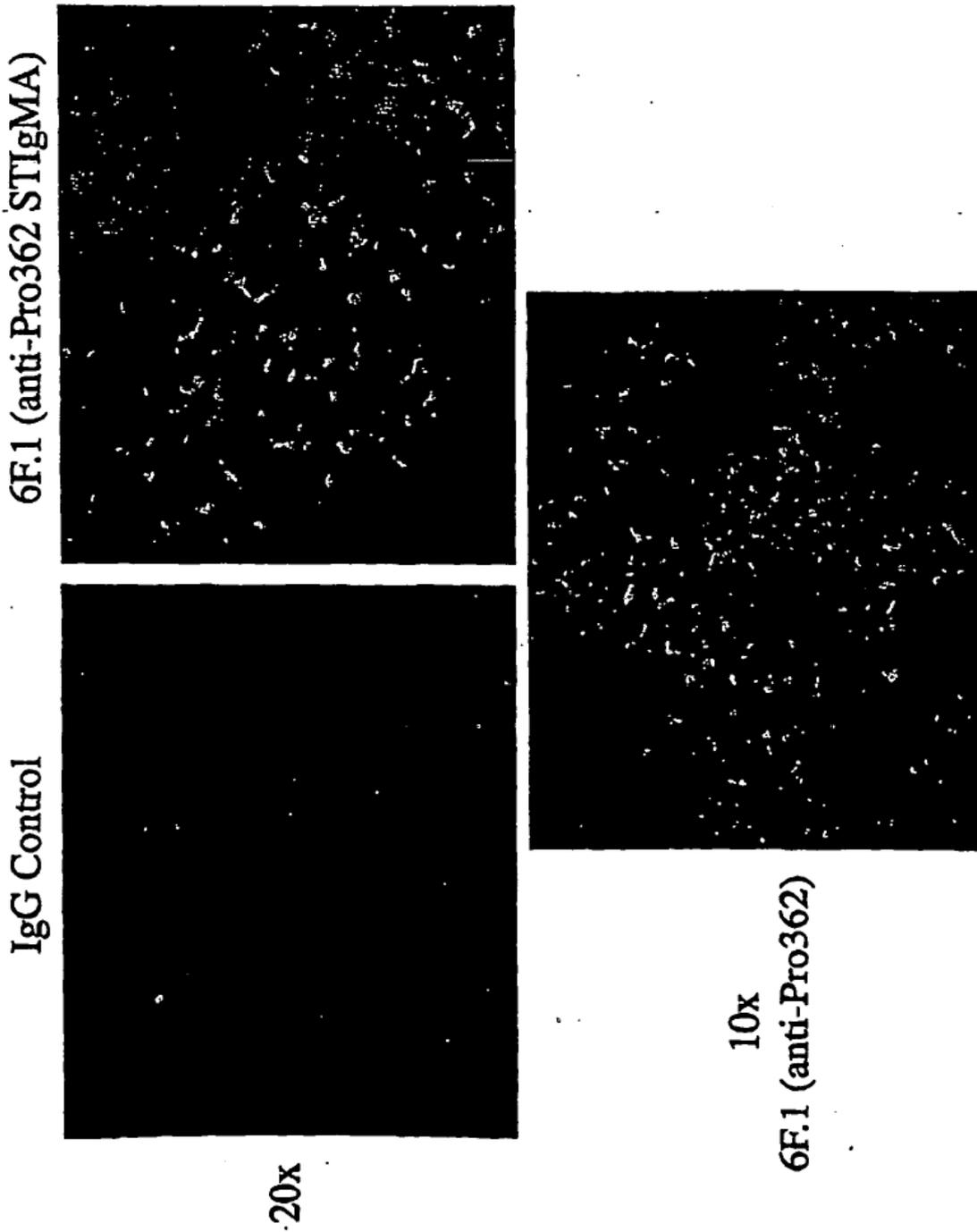


Figura 24

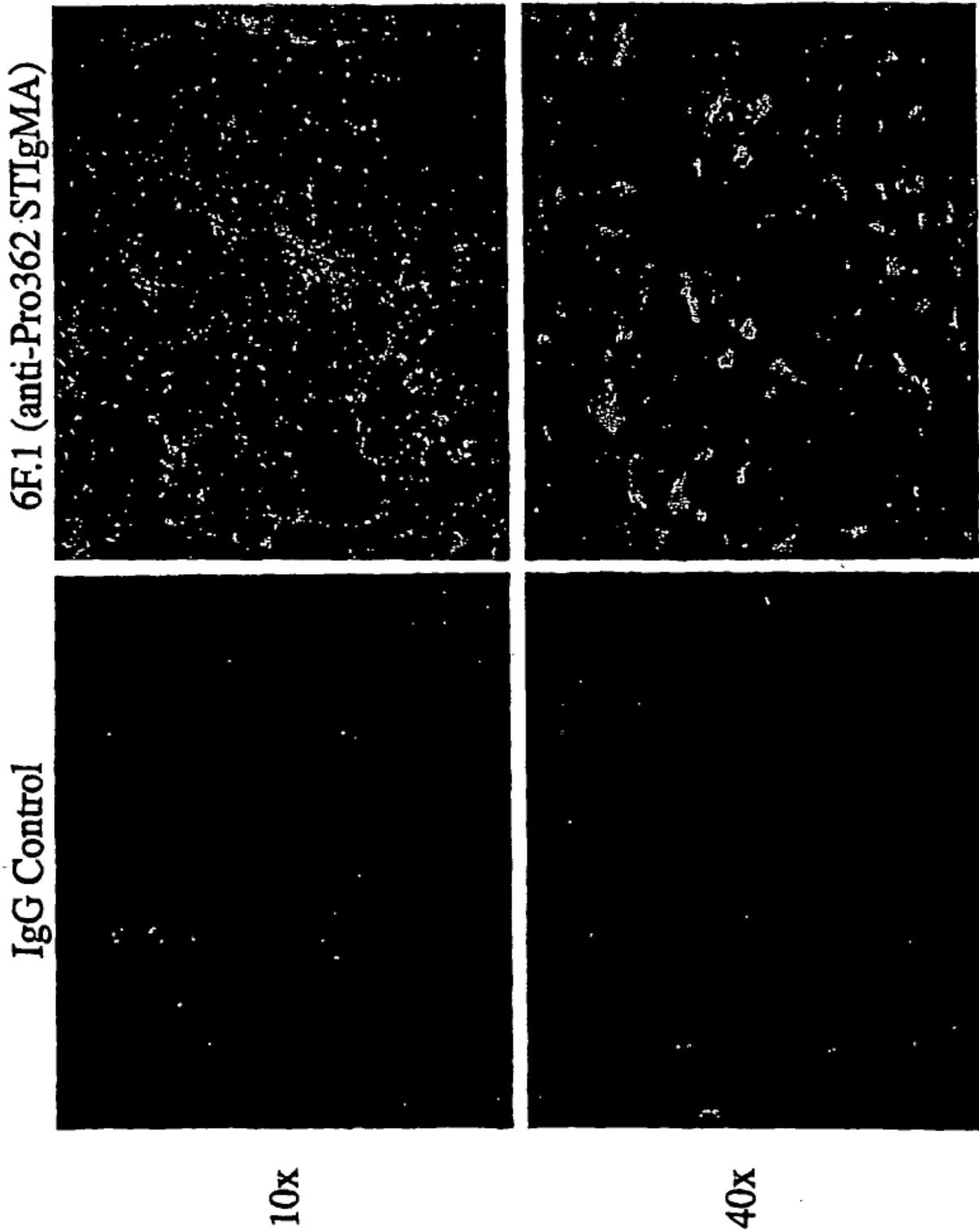


Figura 25

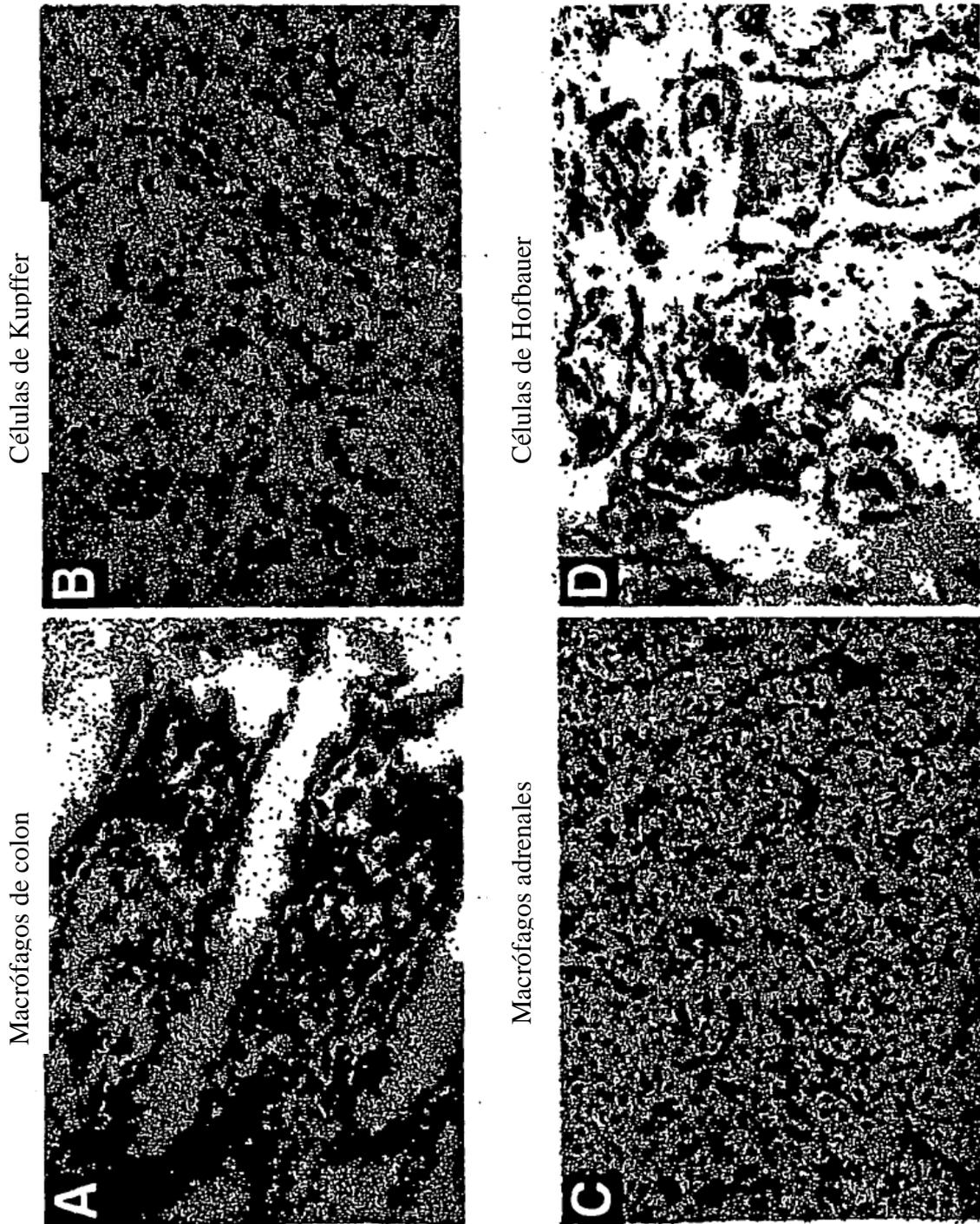


Figura 26

5

Células sinoviales

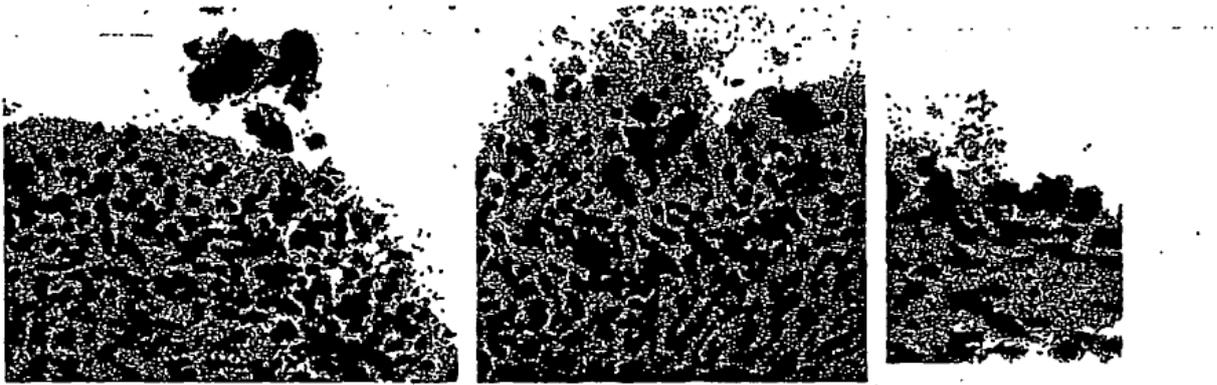


Figura 27

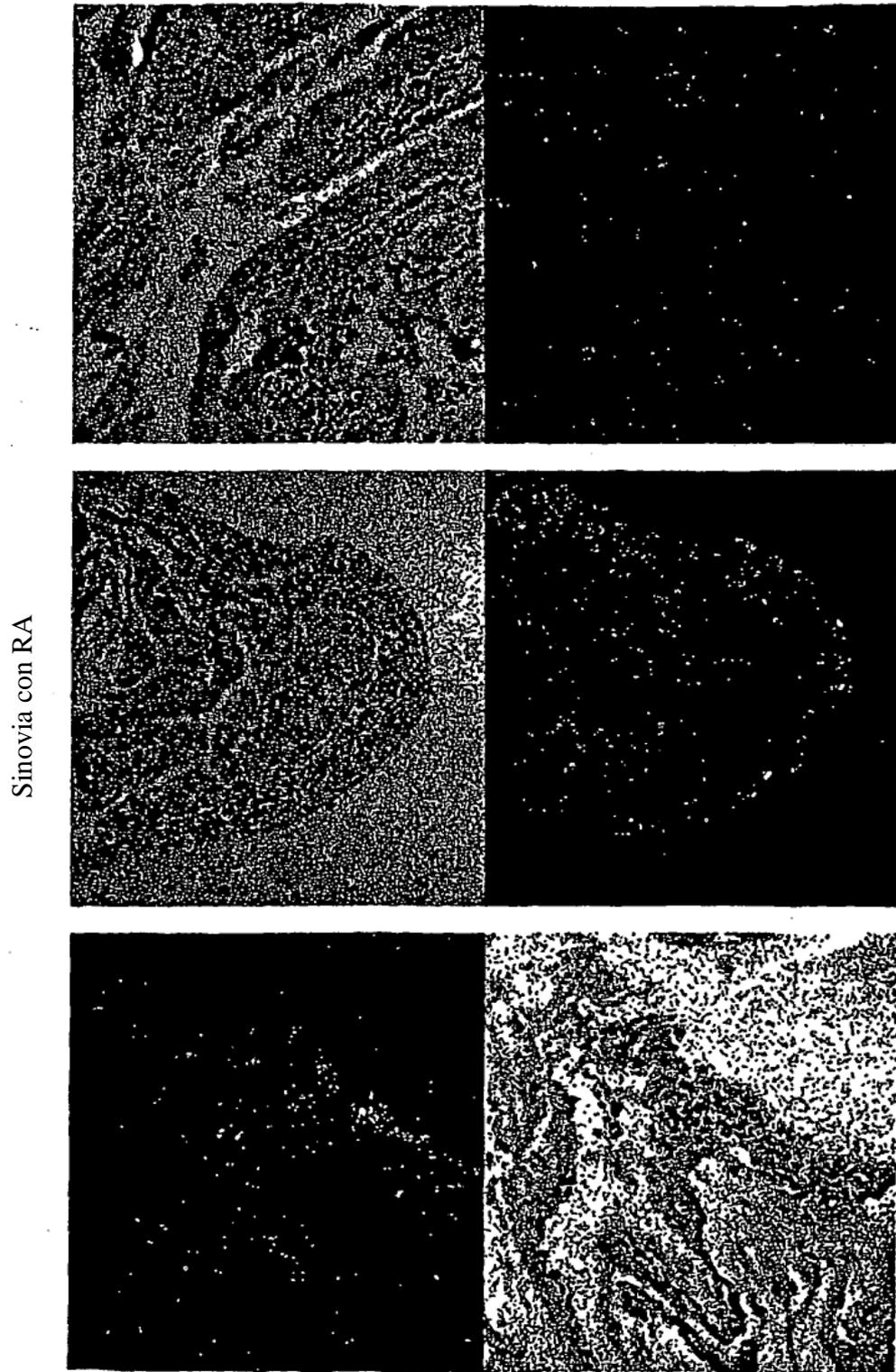


Figura 28

Microglia de cerebro

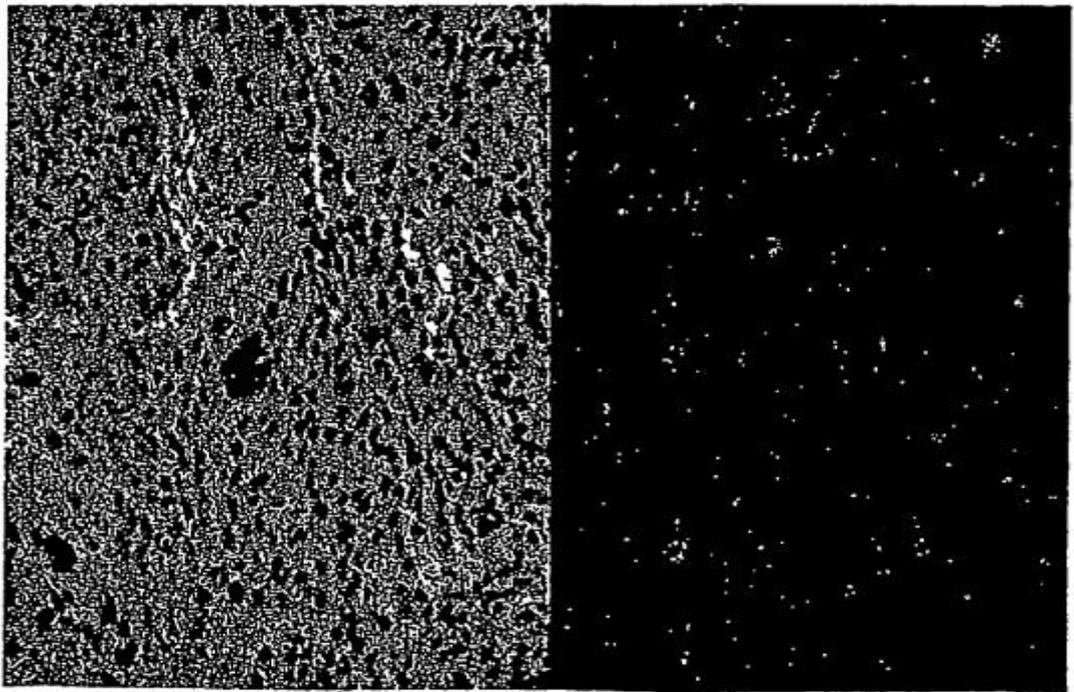
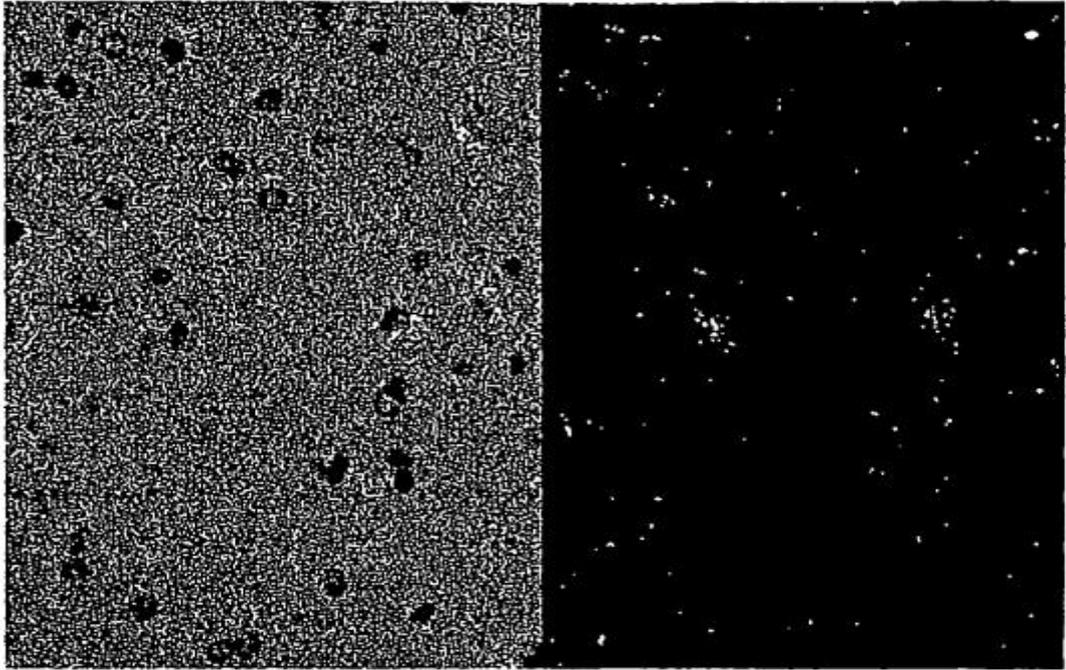


Figura 29
Macrófagos
alveolares

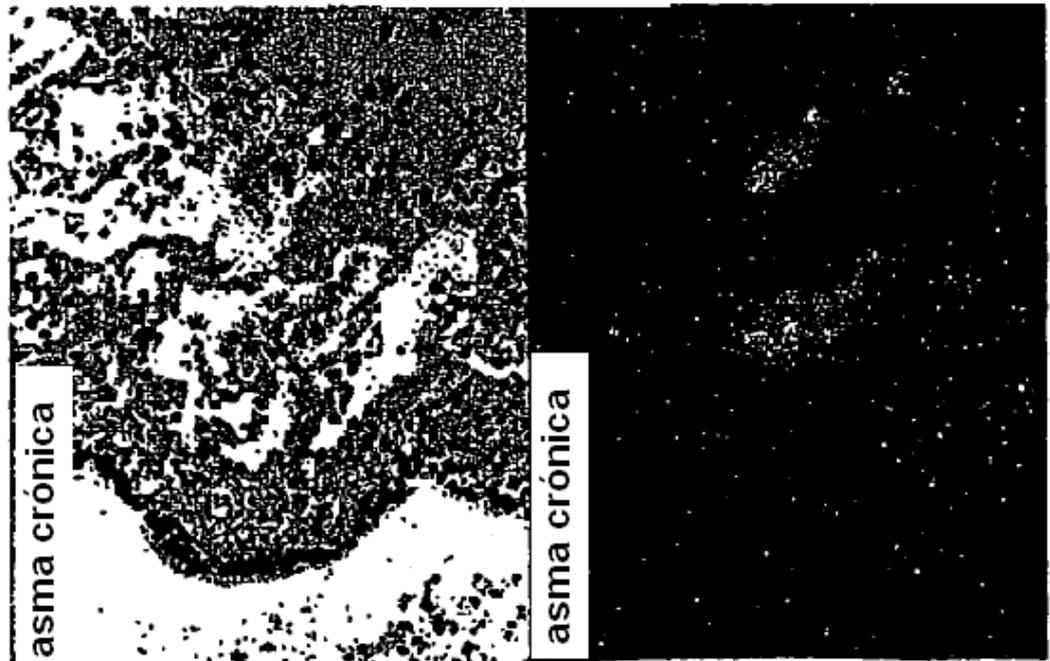


Figura 30

células de Kupffer de hígado

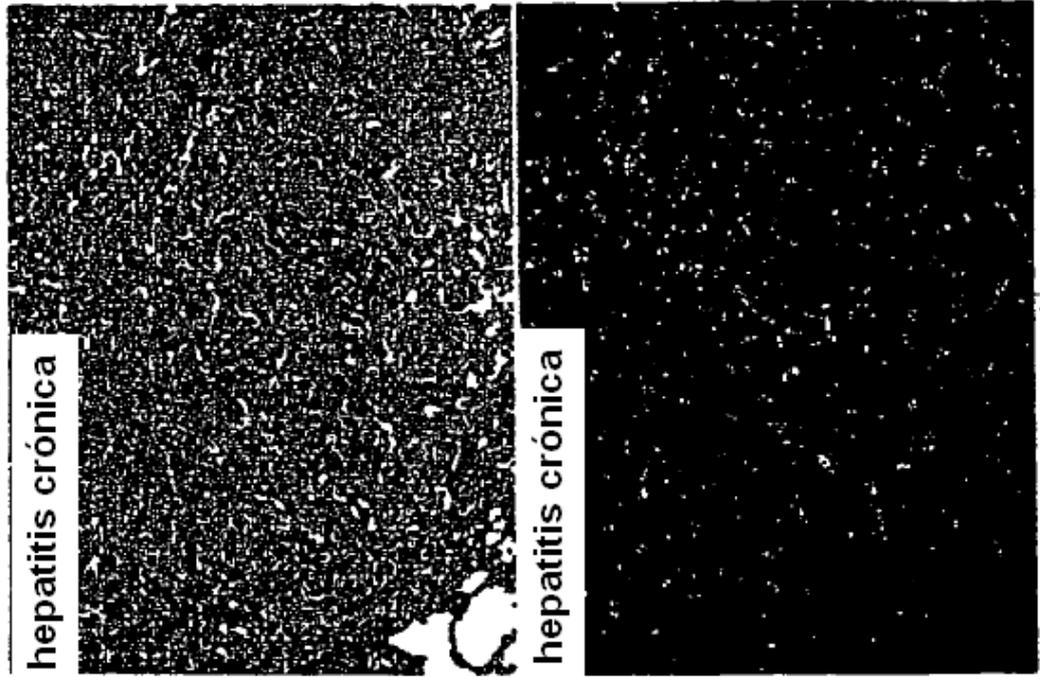


Figura 31

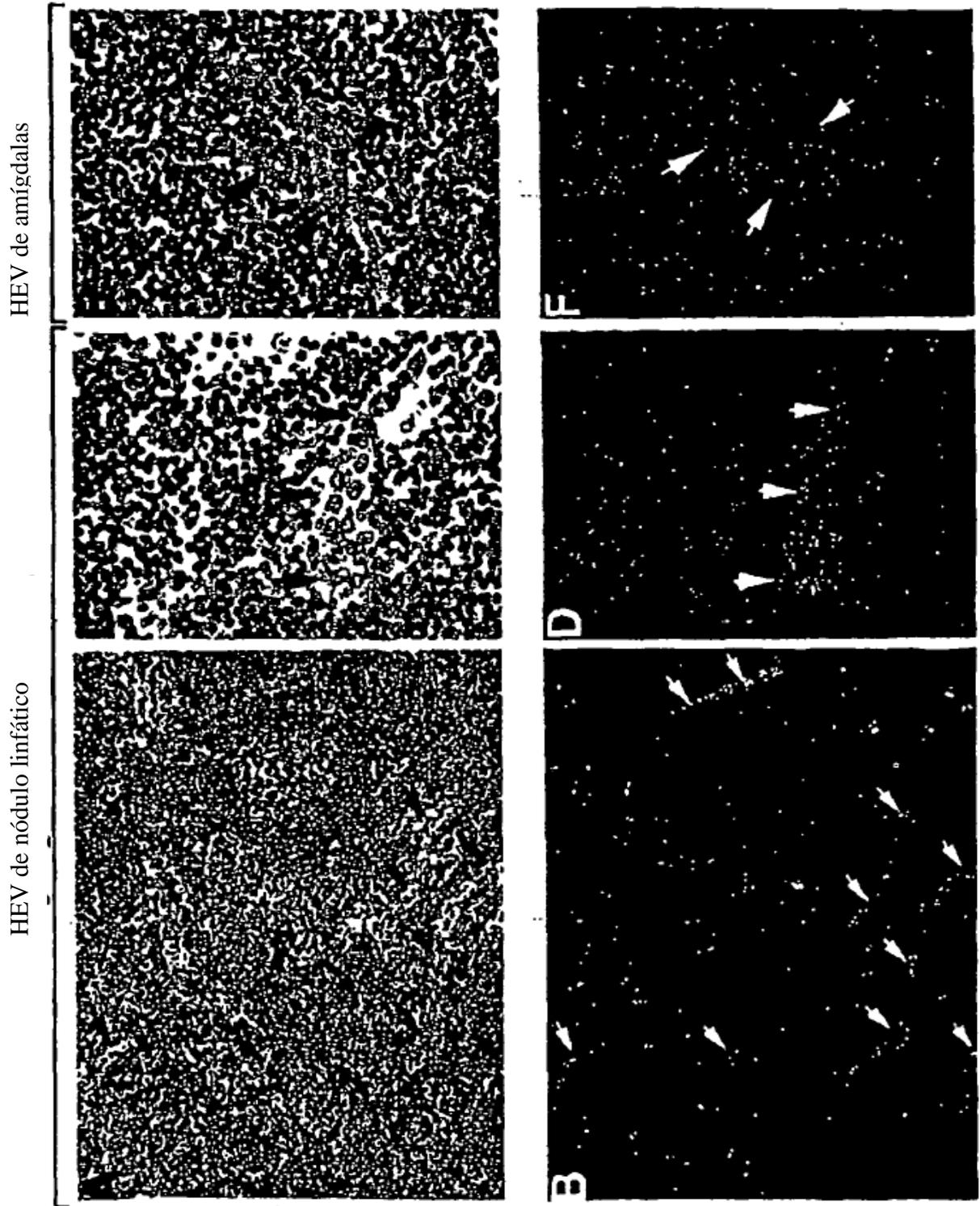


Figura 32

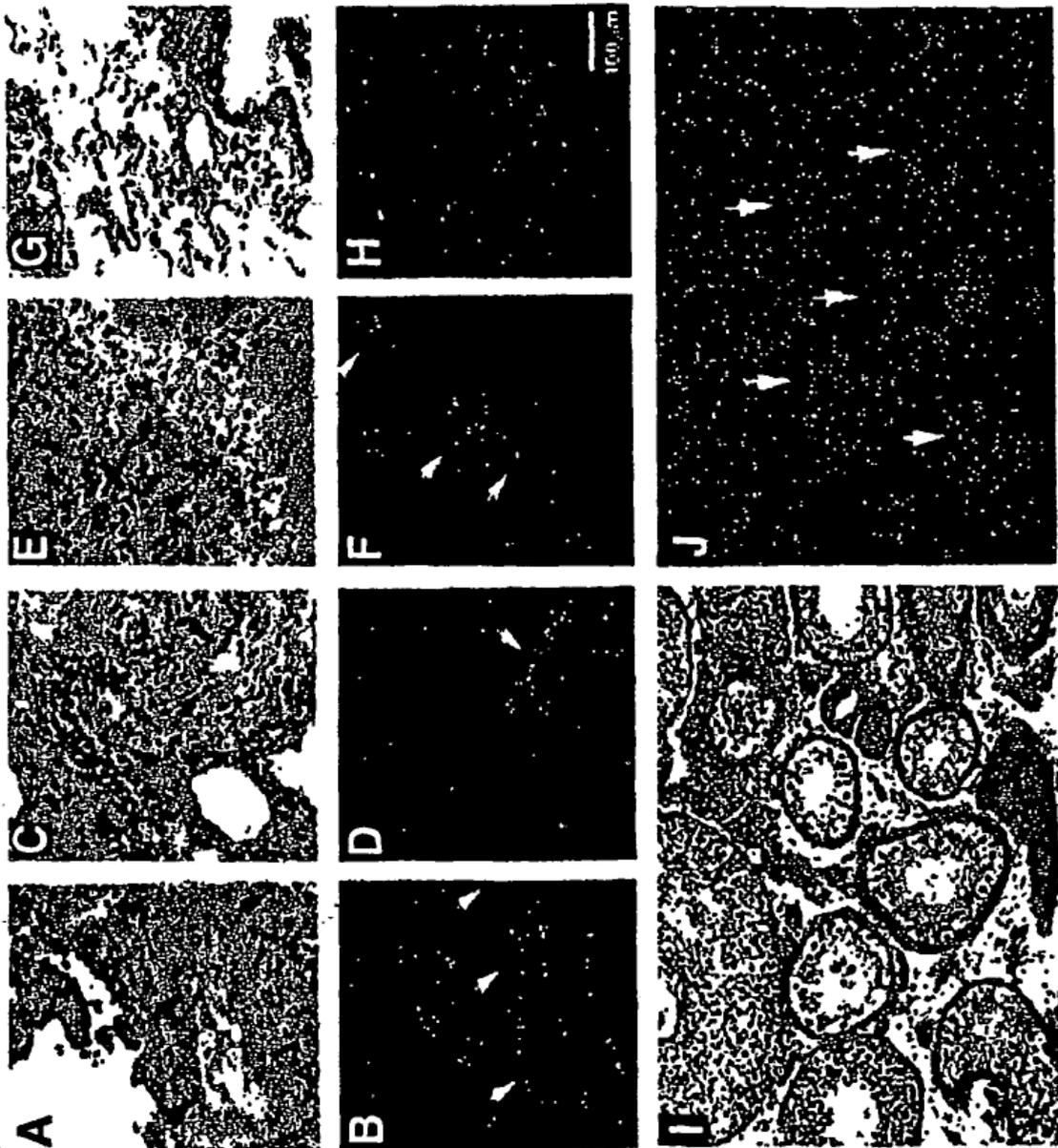


Figura 33

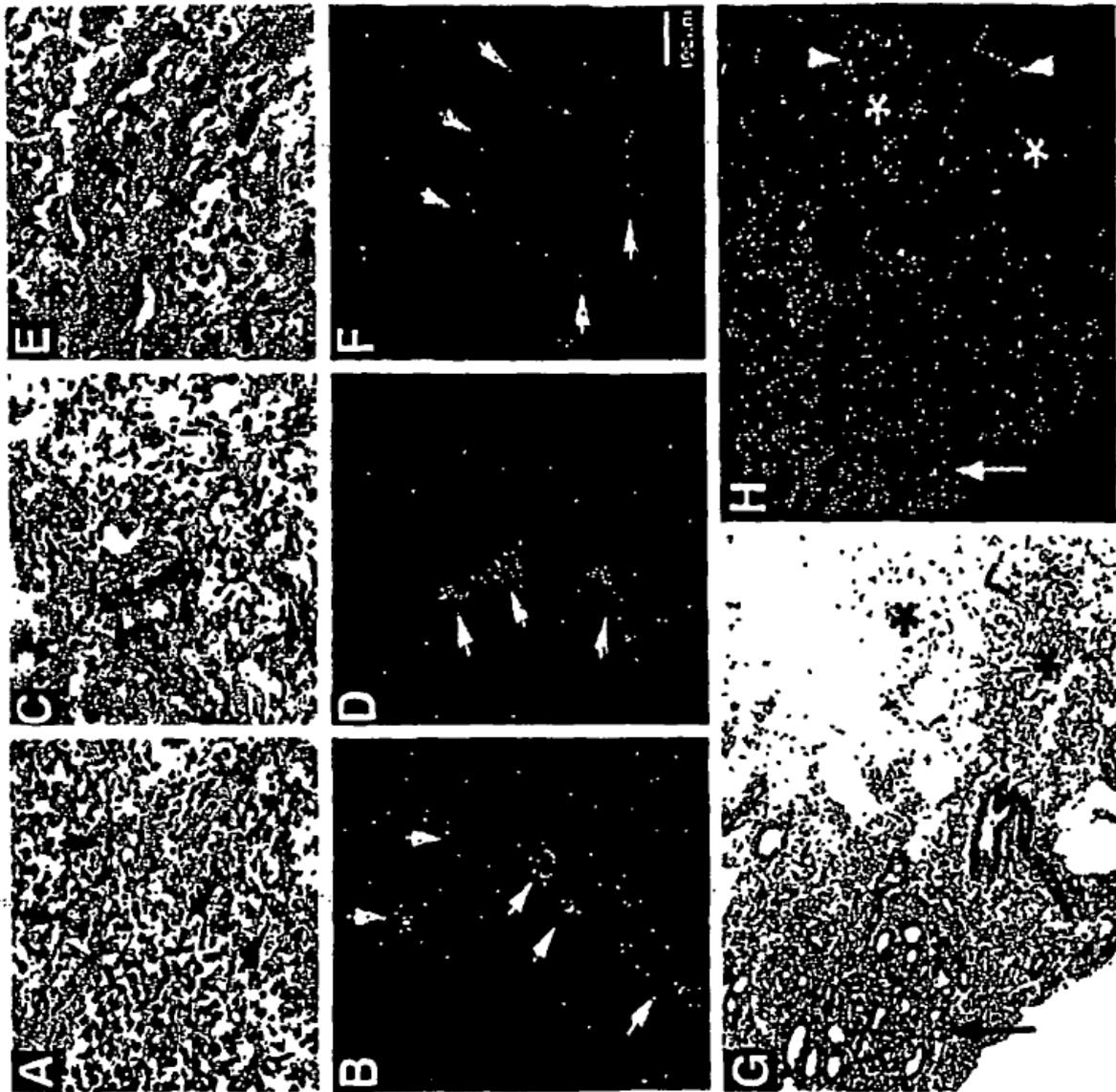


Figura 34

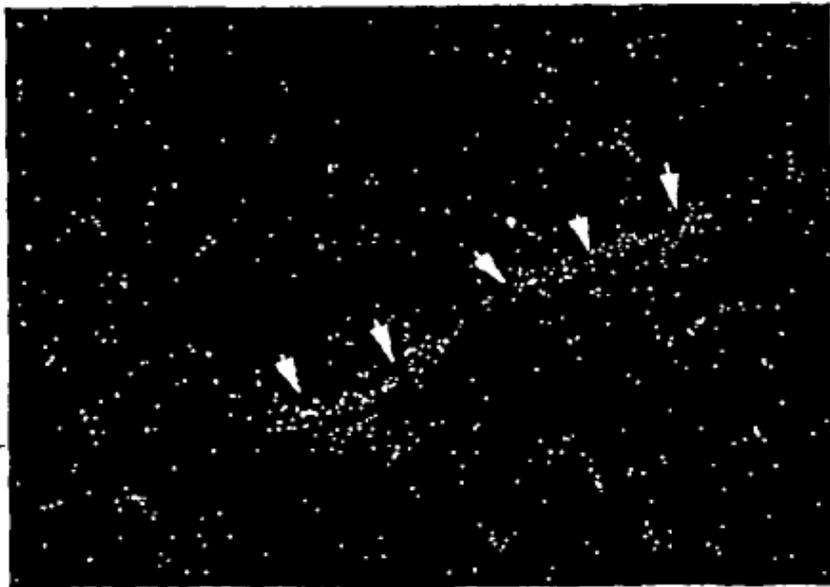
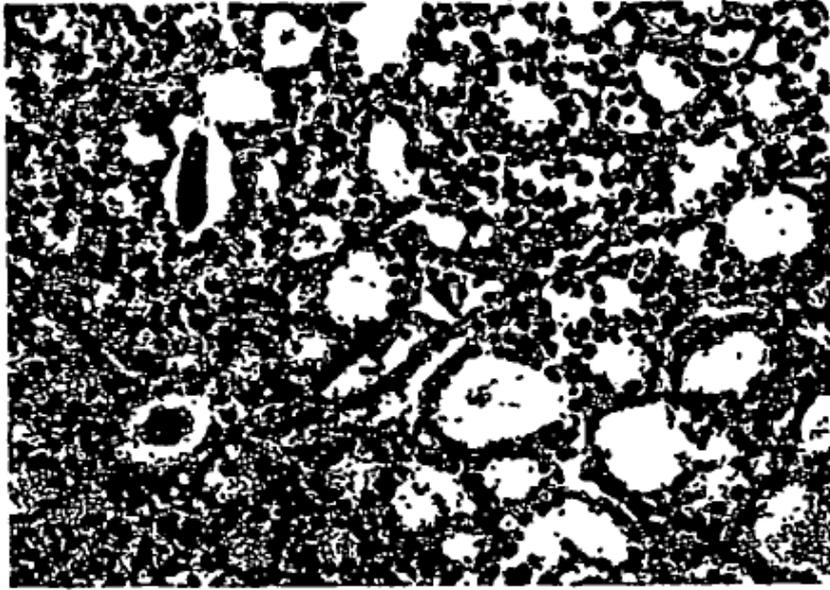


Figura 35

IHC DUAL STIgMA-CD68 IHC

**Macrófagos de glándulas
adrenales**



Adrenal-STIgMA



Adrenal-CD68



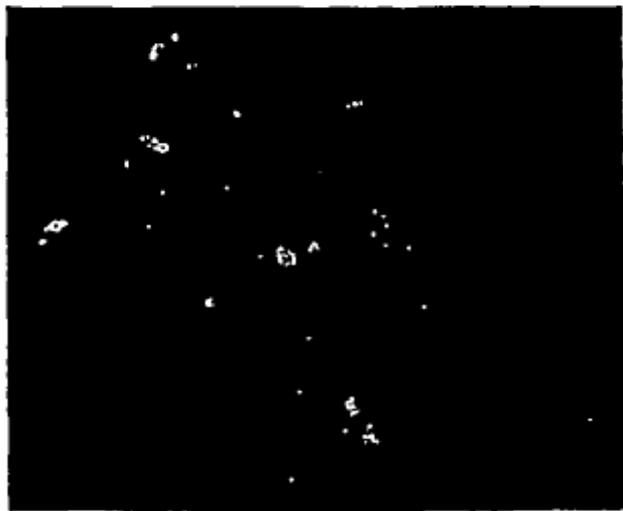
Adrenal-STIgMA/CD68

Figura 36

células de Kupffer de hígado



STIgMA-hígado



CD68-hígado

Figura 37

Células microgliales de cerebro



Cerebro-STIgMA



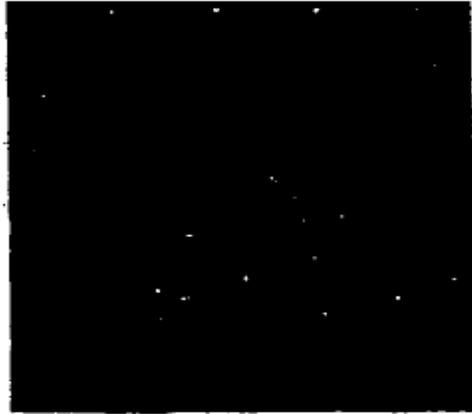
Cerebro-CD68



Cerebro STIgMA/CD68

Figura 38

**Células Hofbauer de
placenta**



Placenta-STIgMA



Placenta-CD68



Placenta-STIgMA/CD68

Figura 39

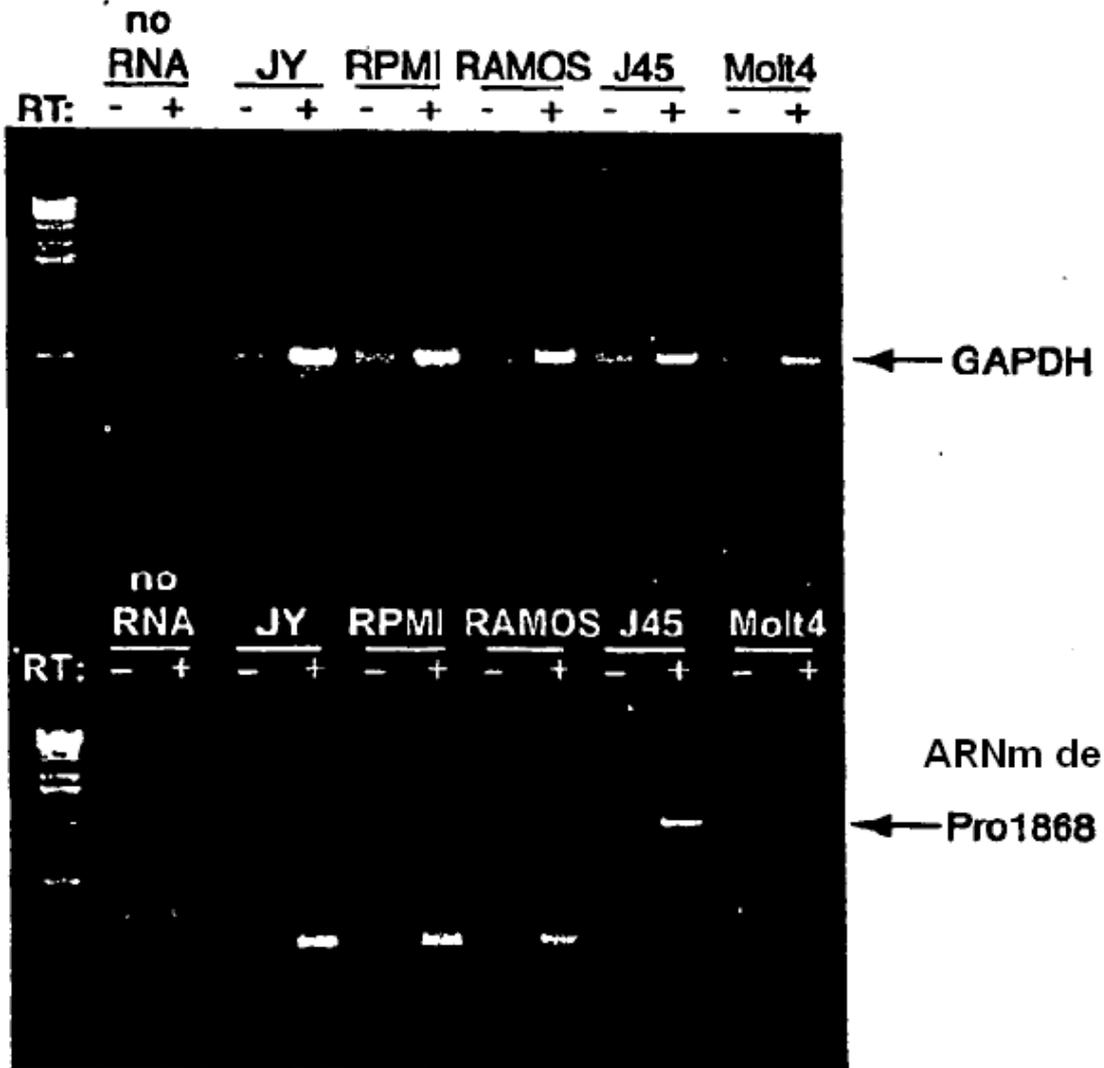


Figura 40

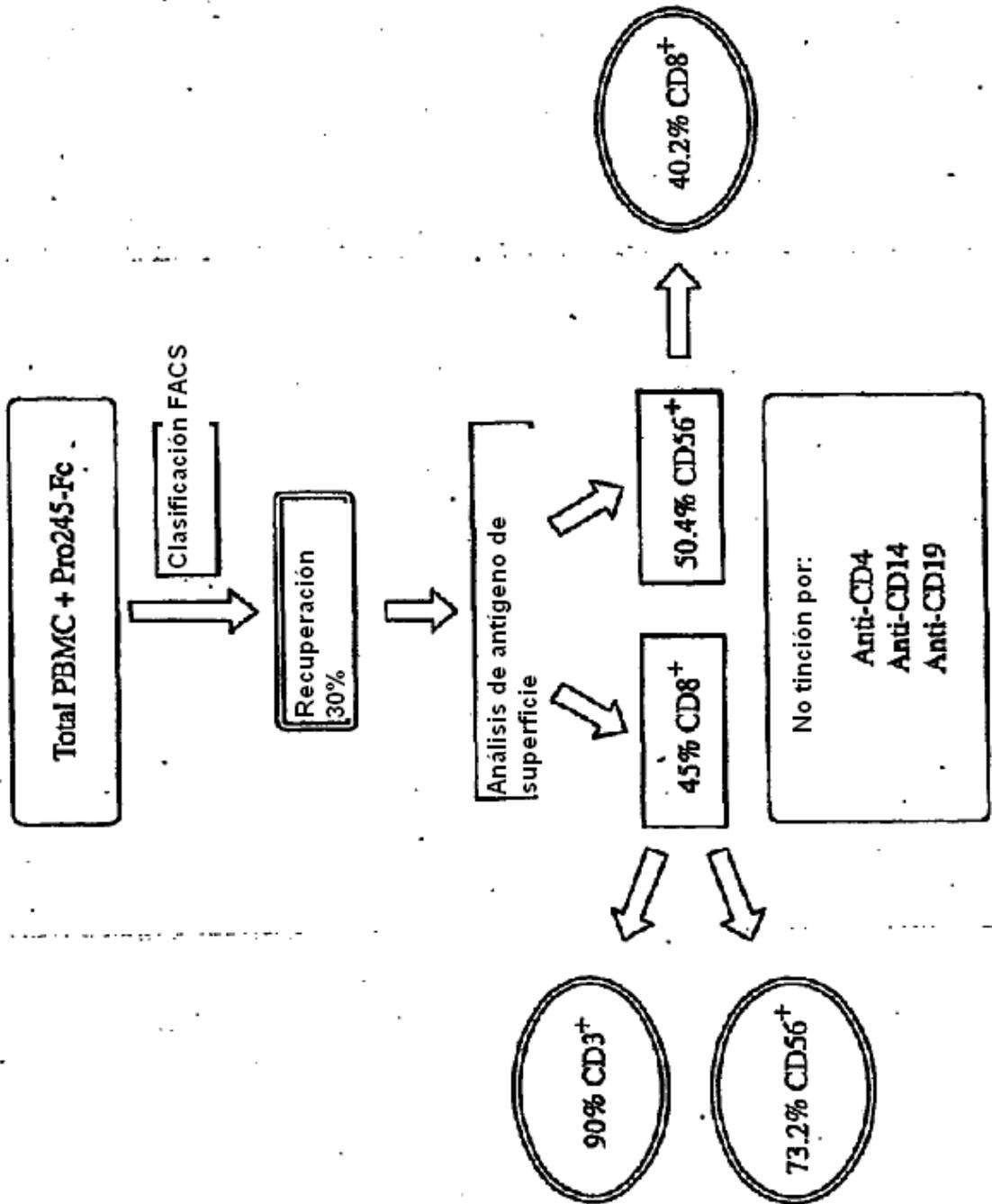


Figura 41

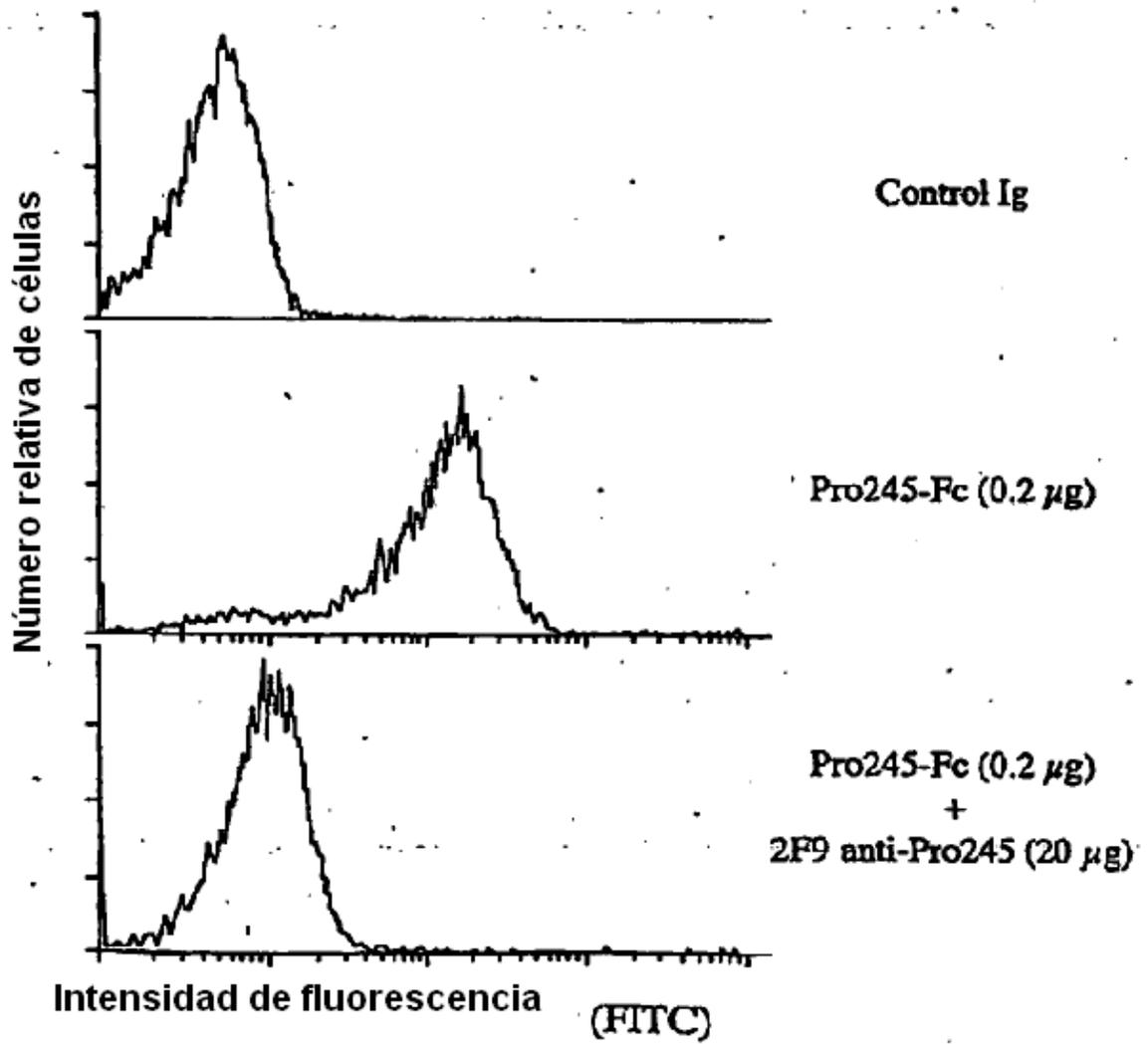


Figura 42

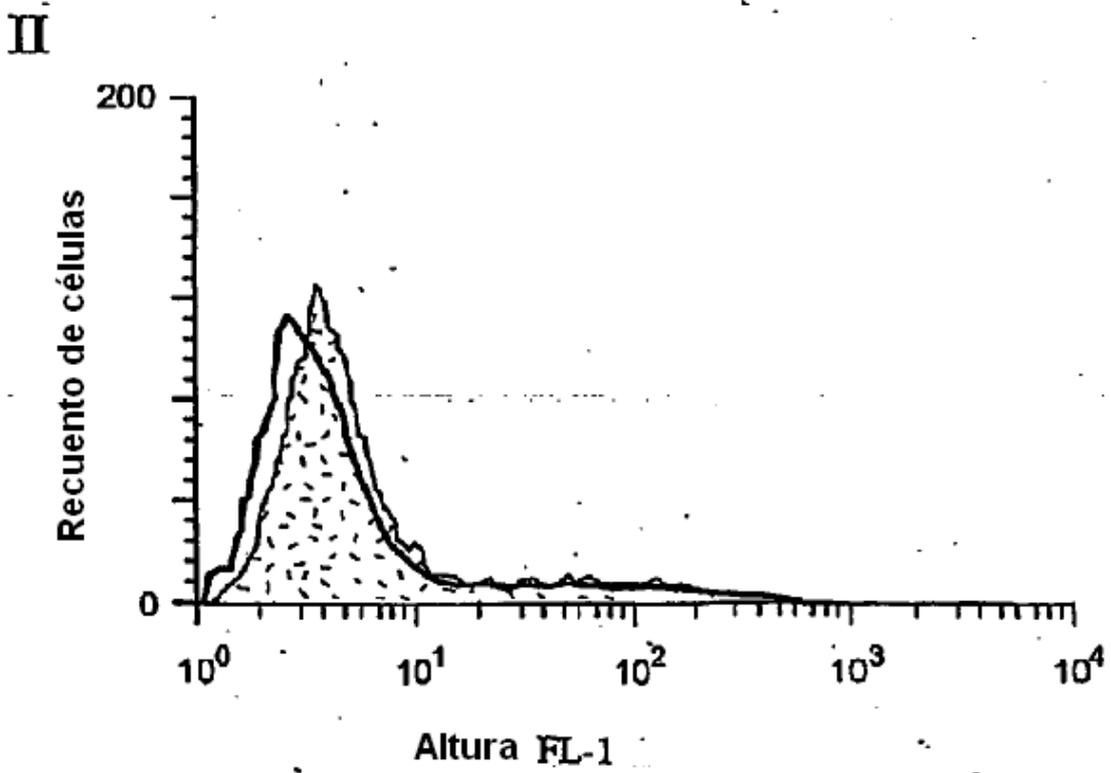
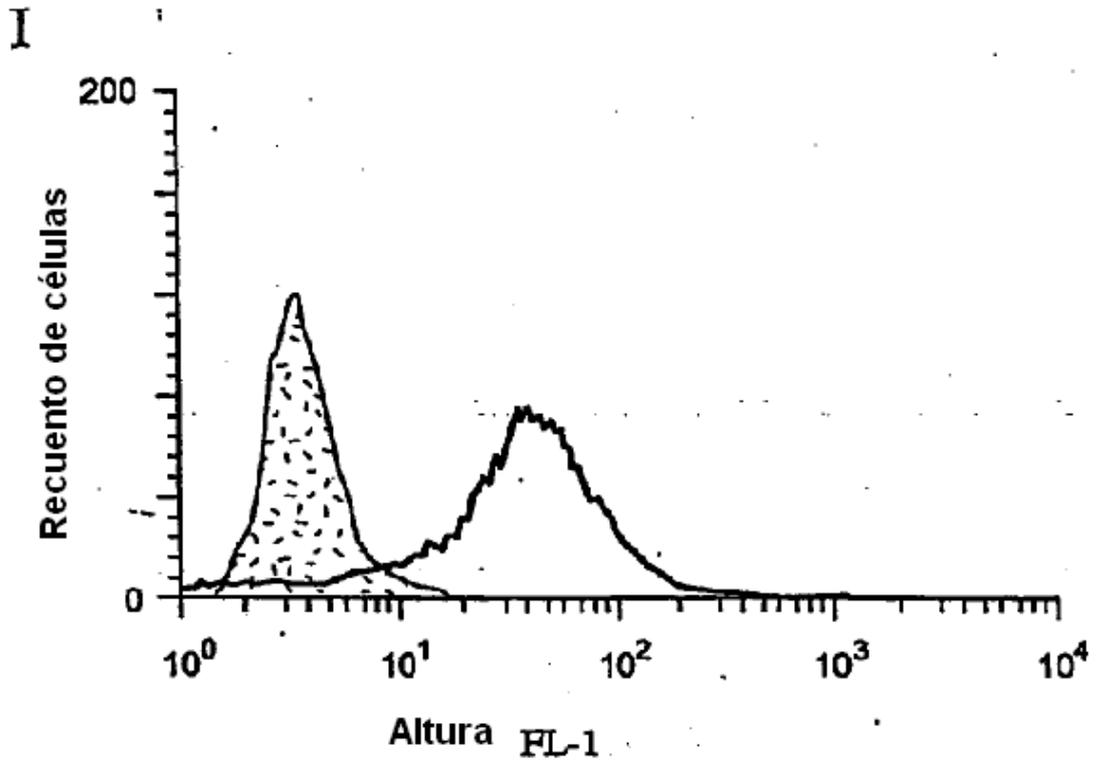


Figura 43

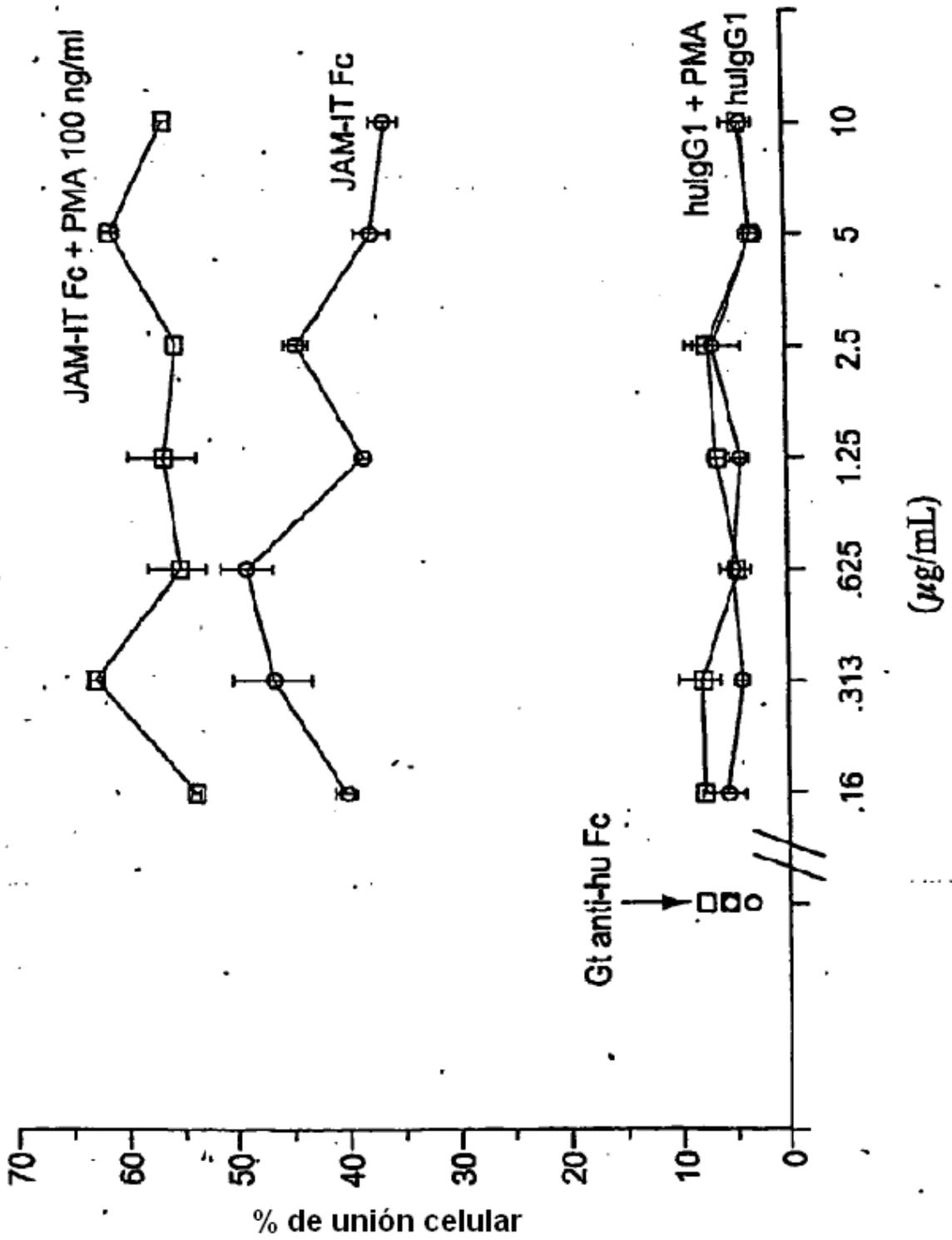


Figura 44

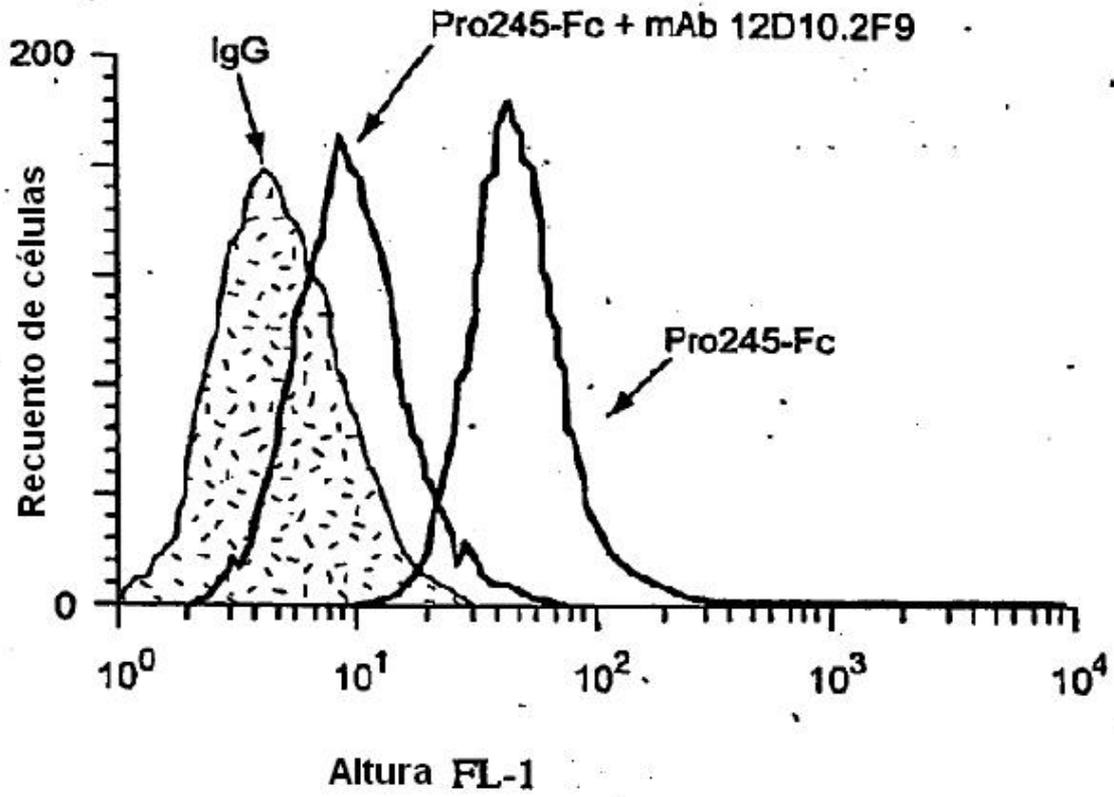


Figura 45

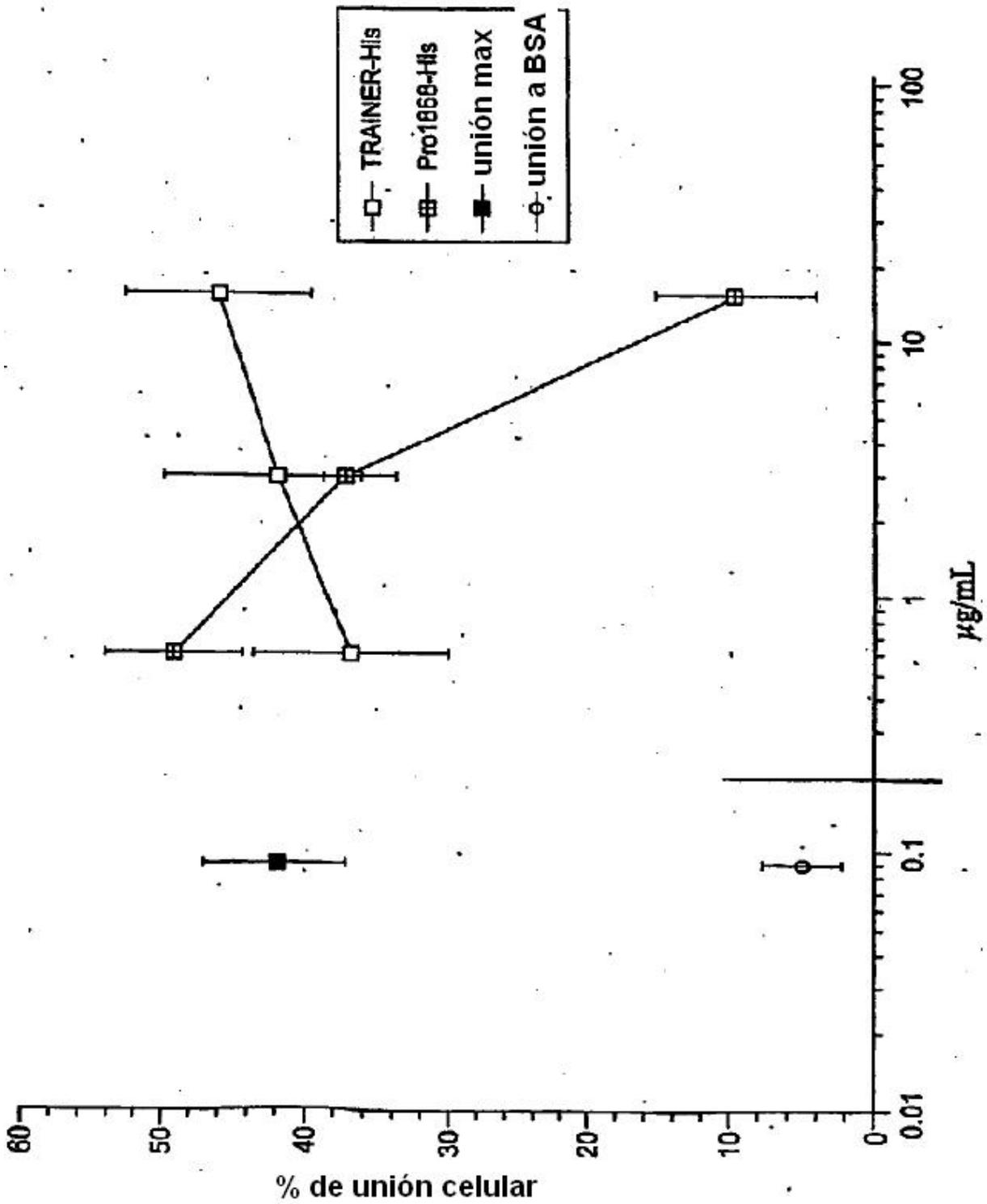


Figura 46

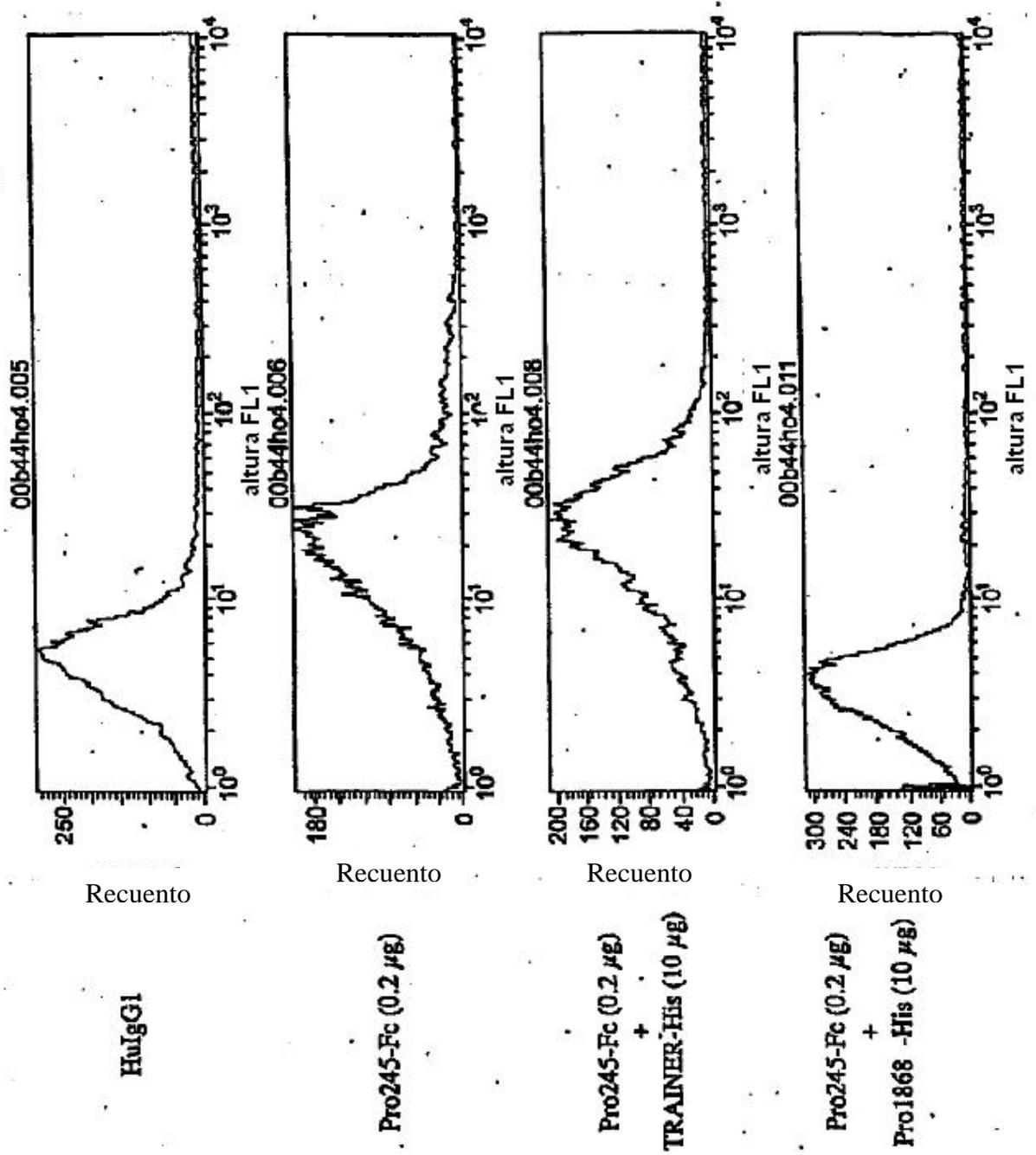
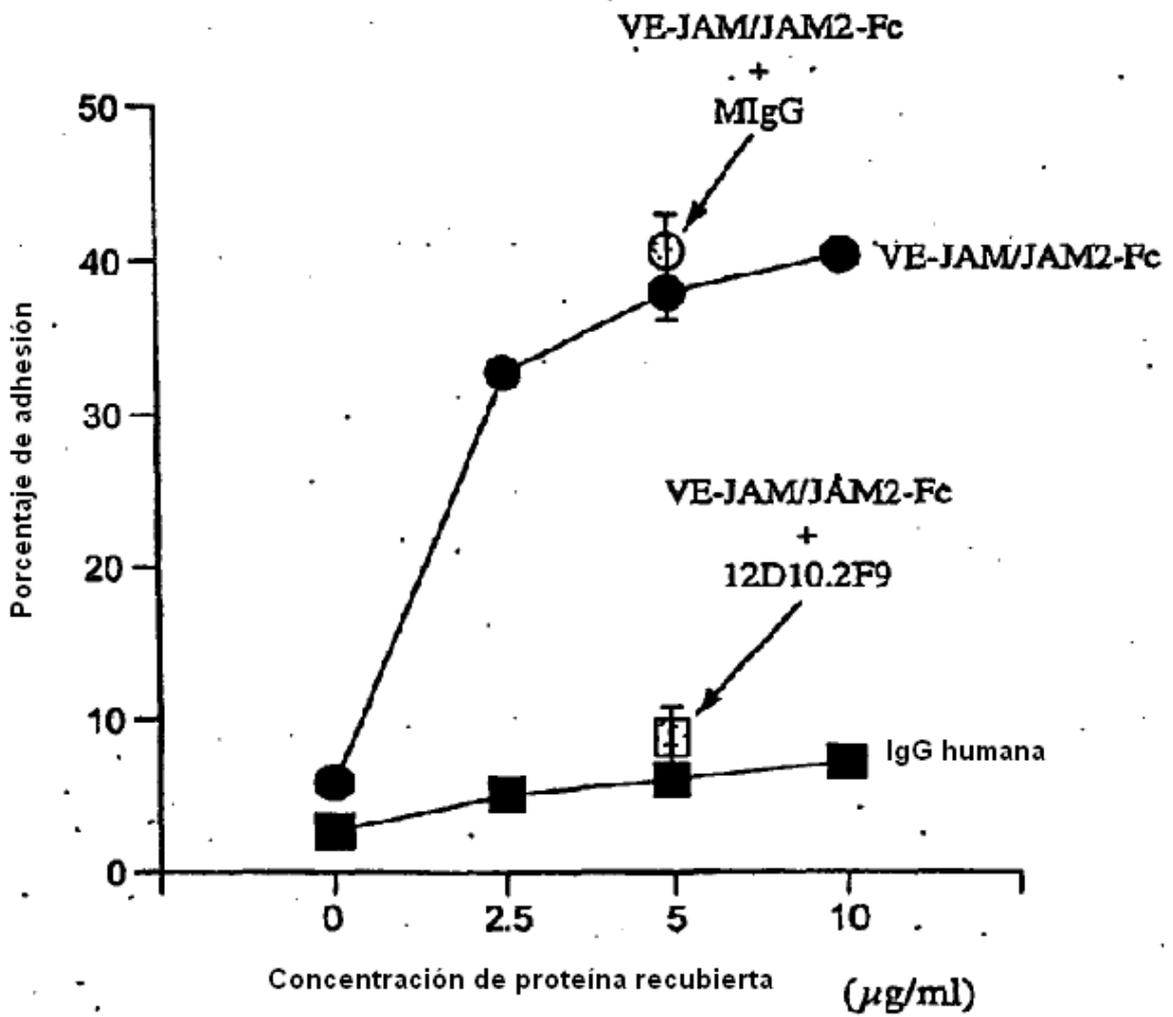


Figura 47



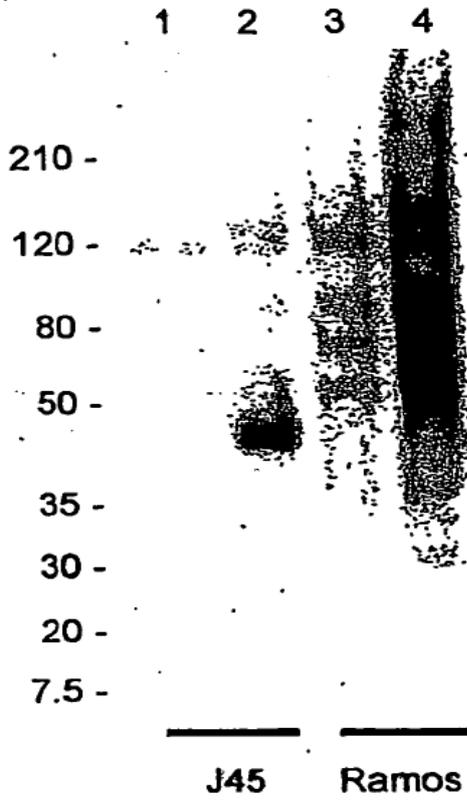


Figura 48

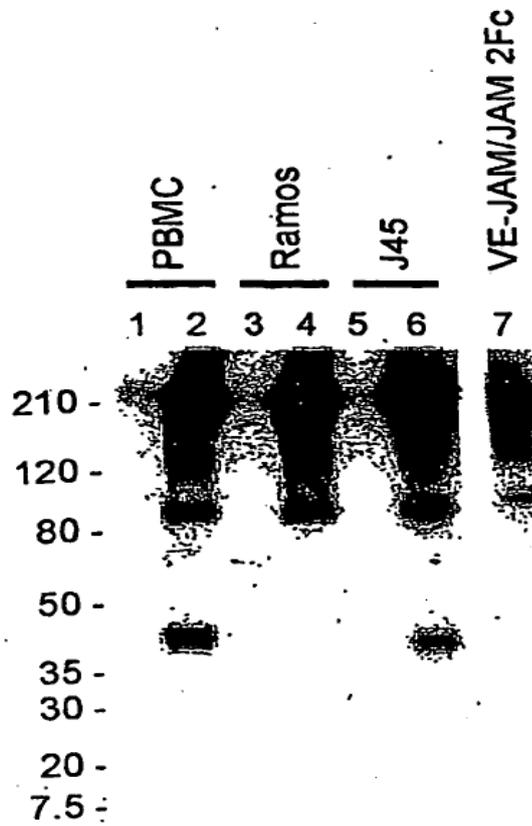


Figura 49

Figura 50

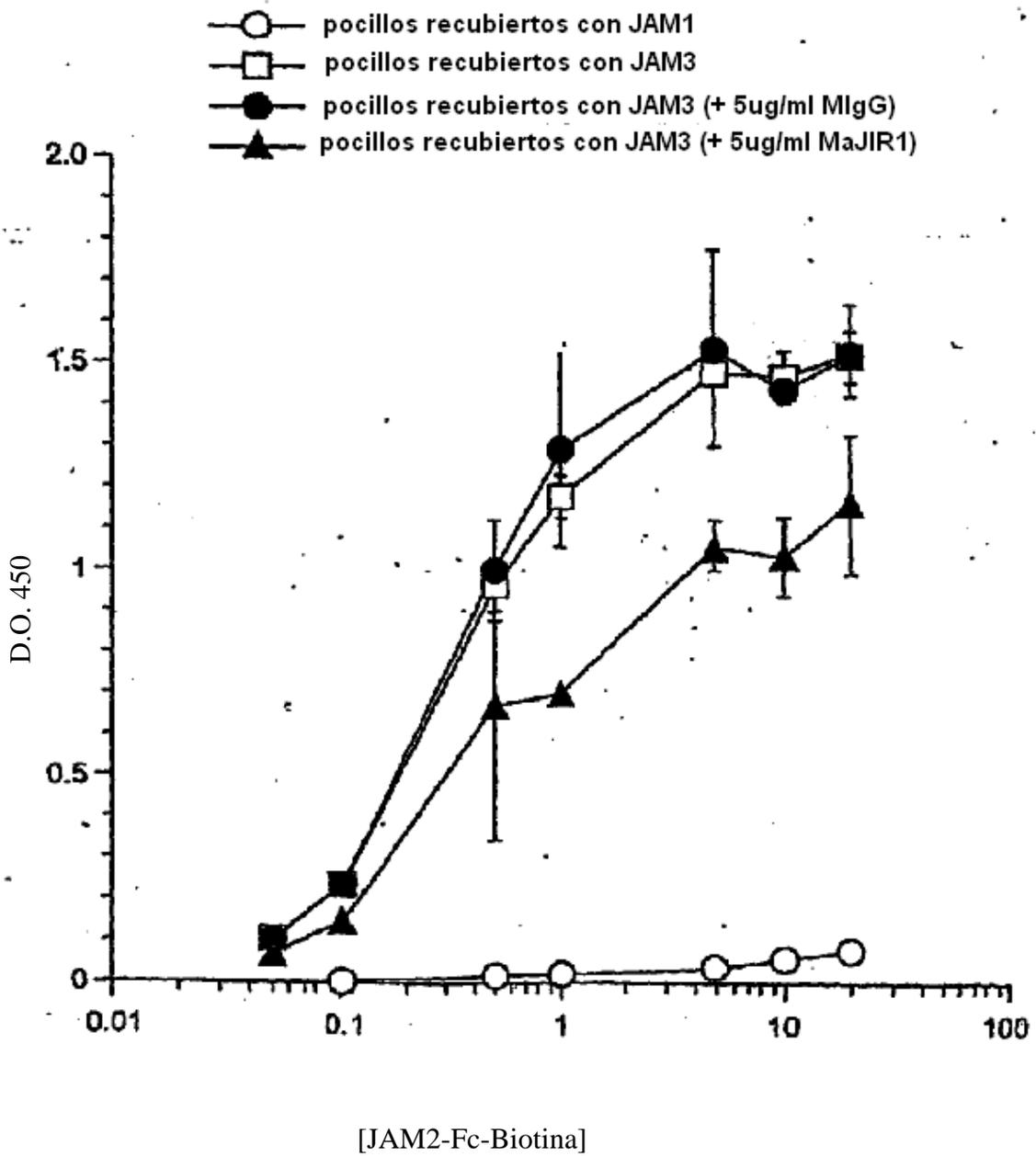


Figura 51

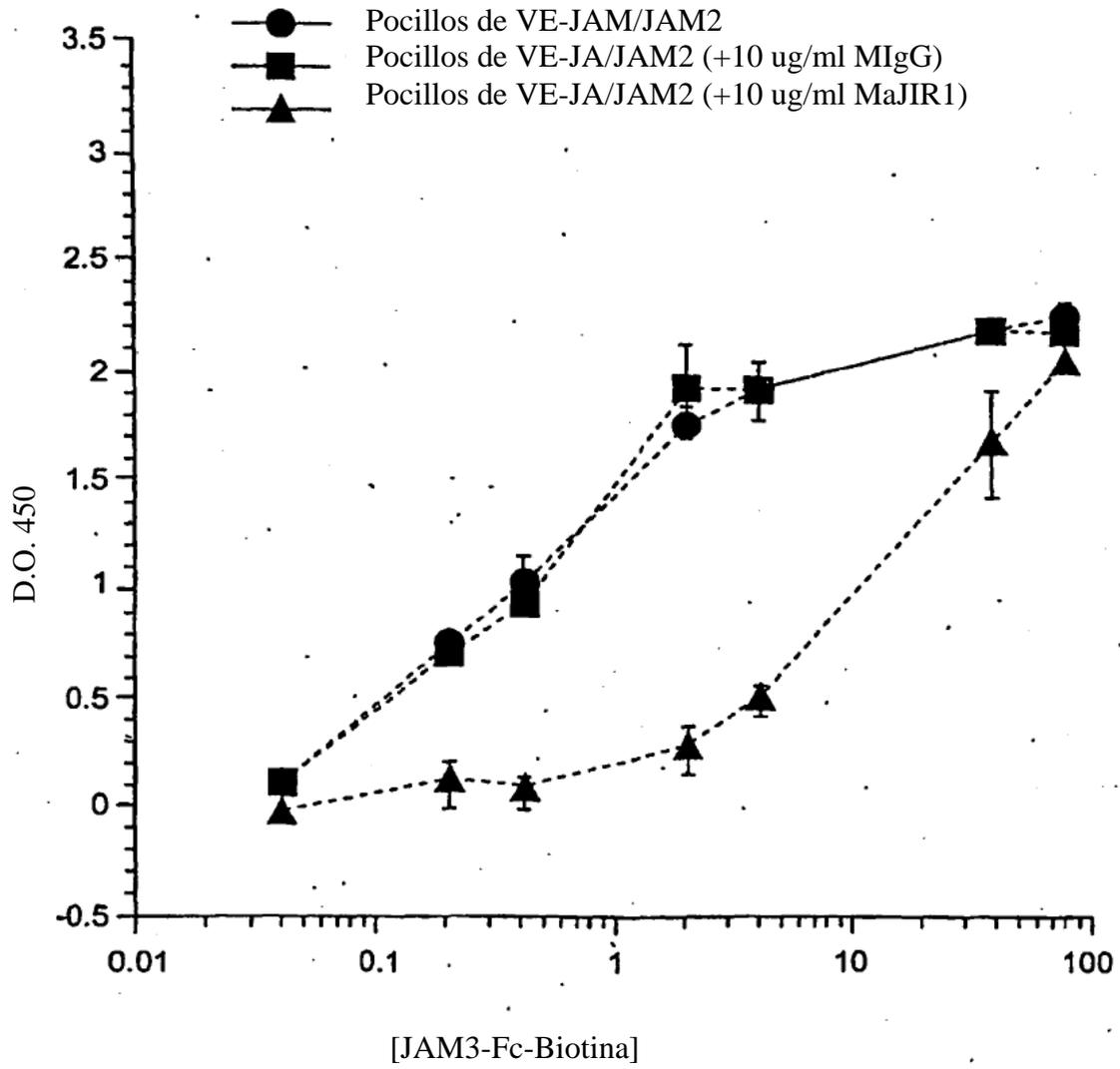


Figura 52

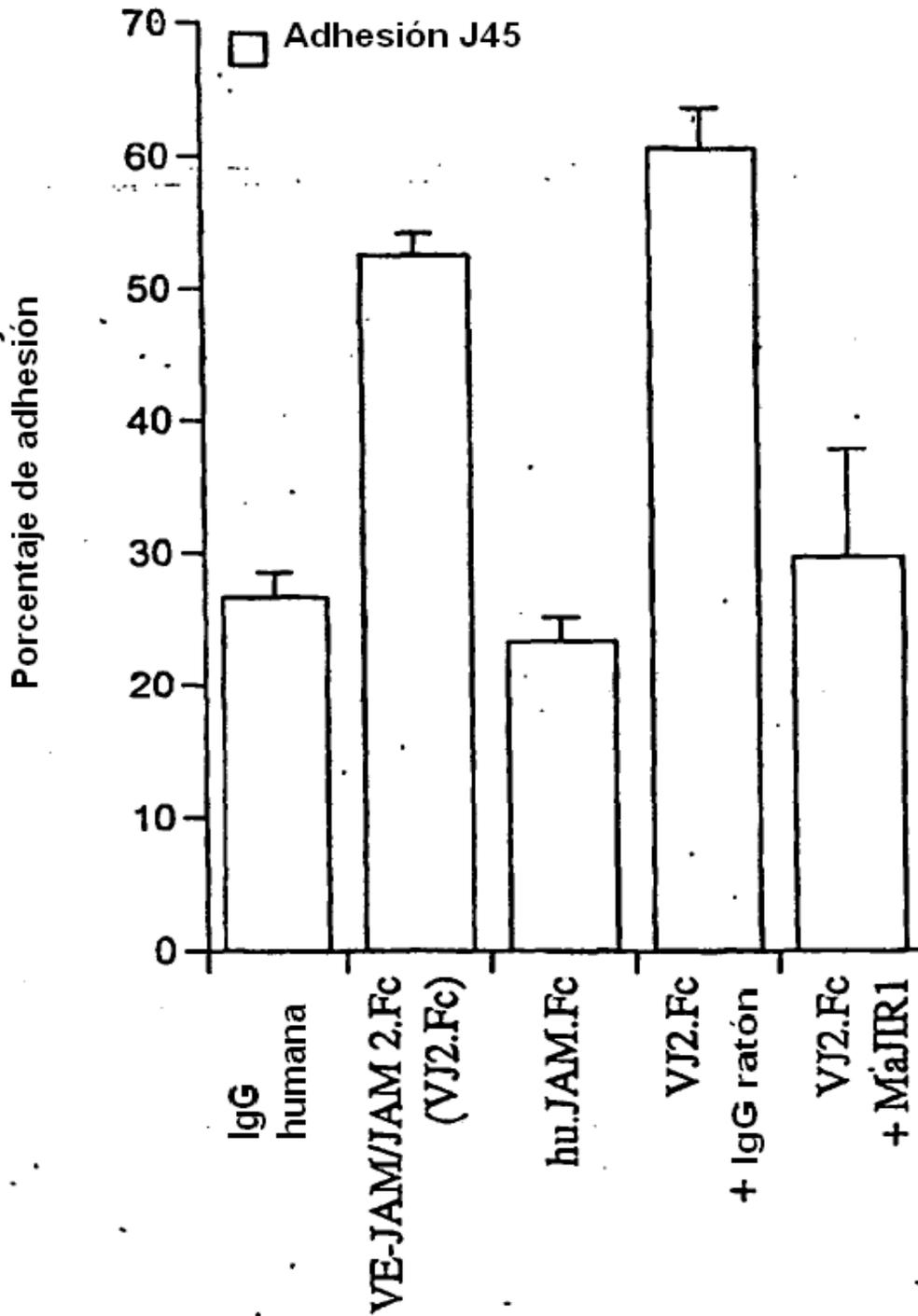


Figura 53

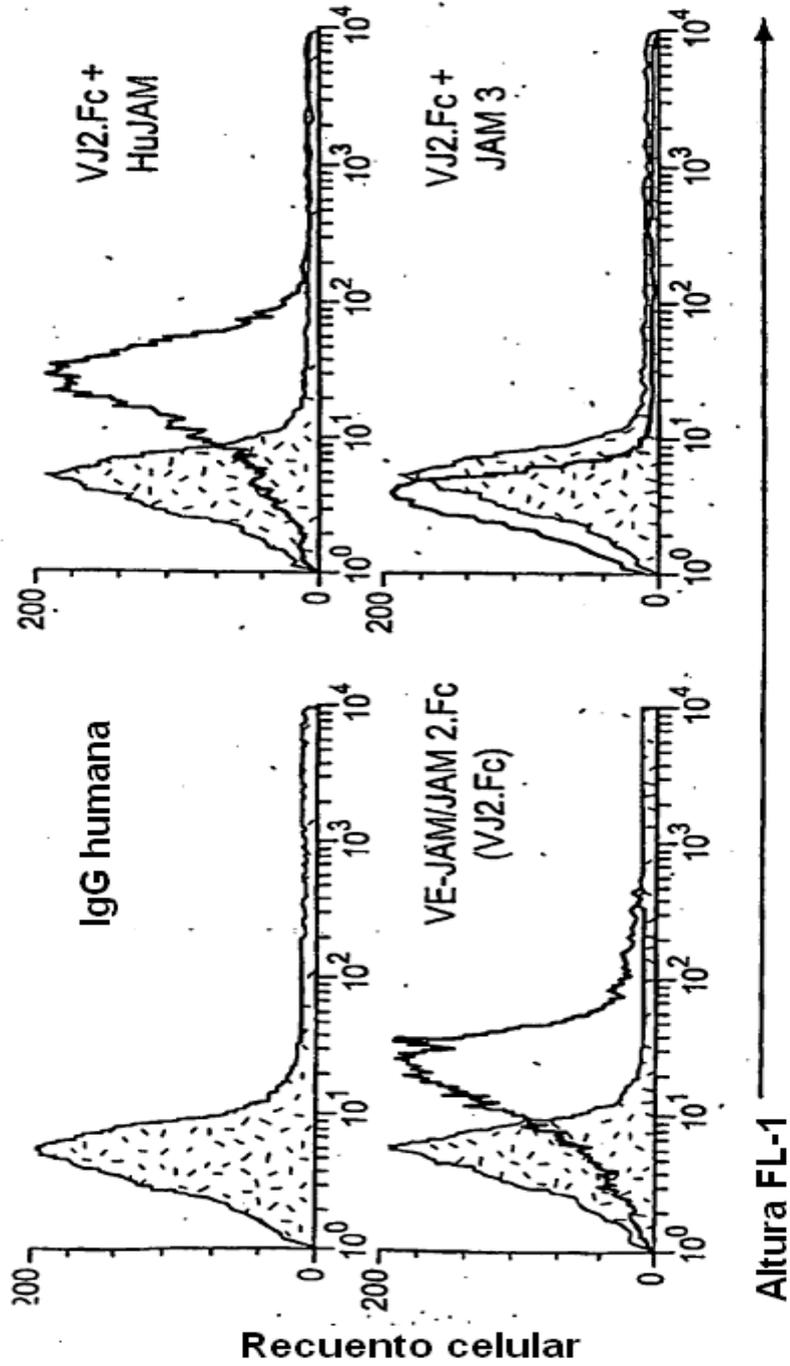


Figura 54

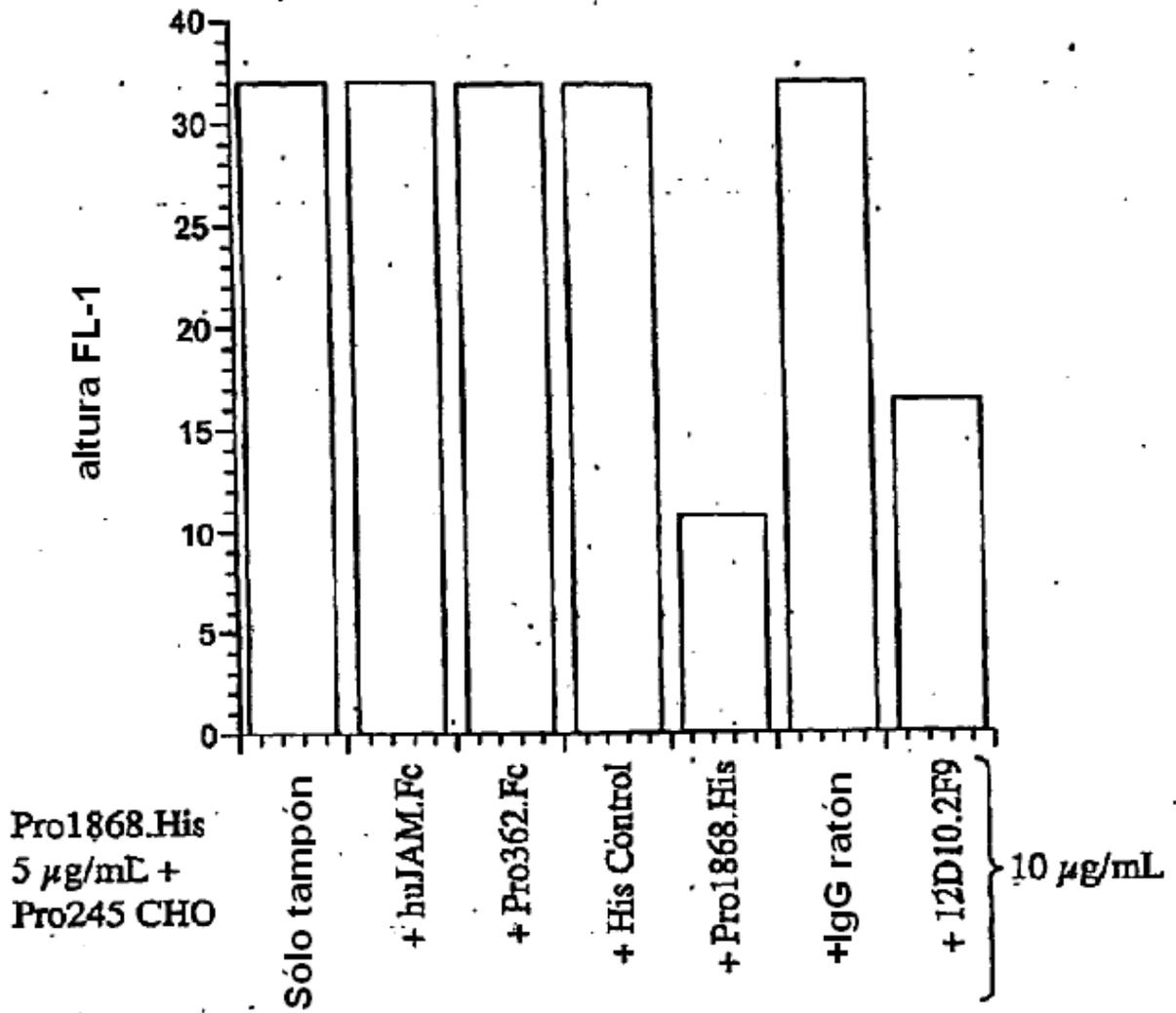


Figura 55

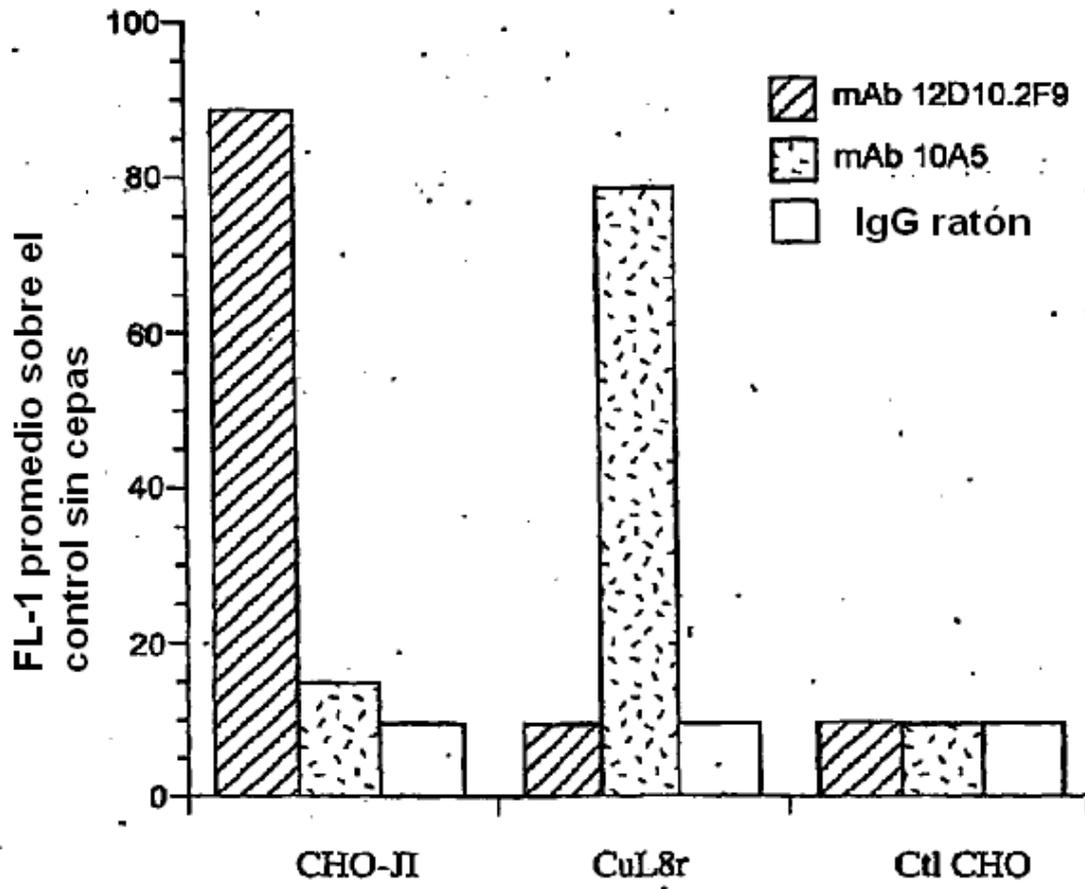


Figura 57

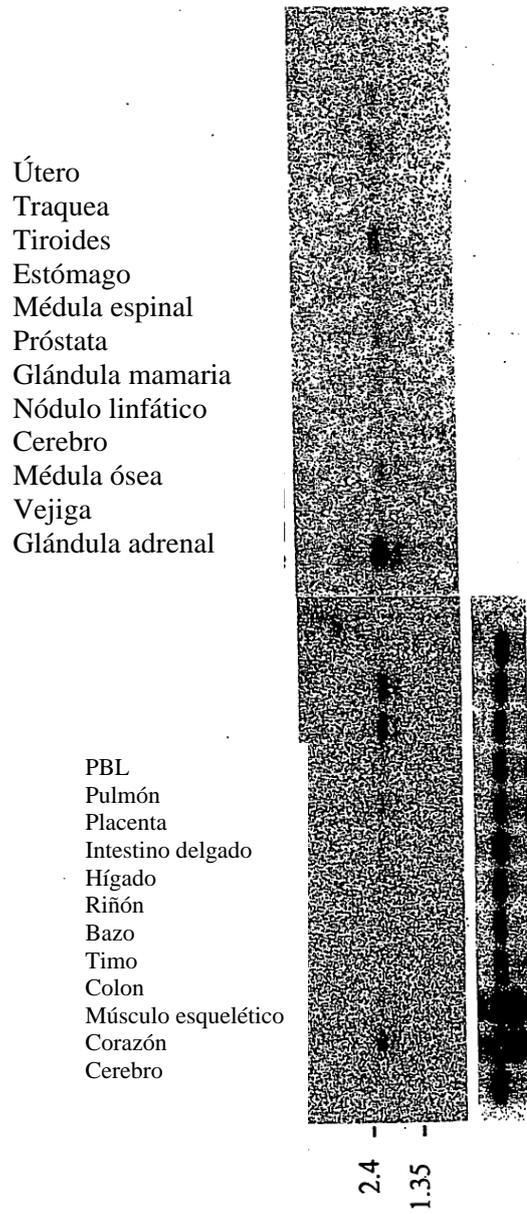


Figura 58

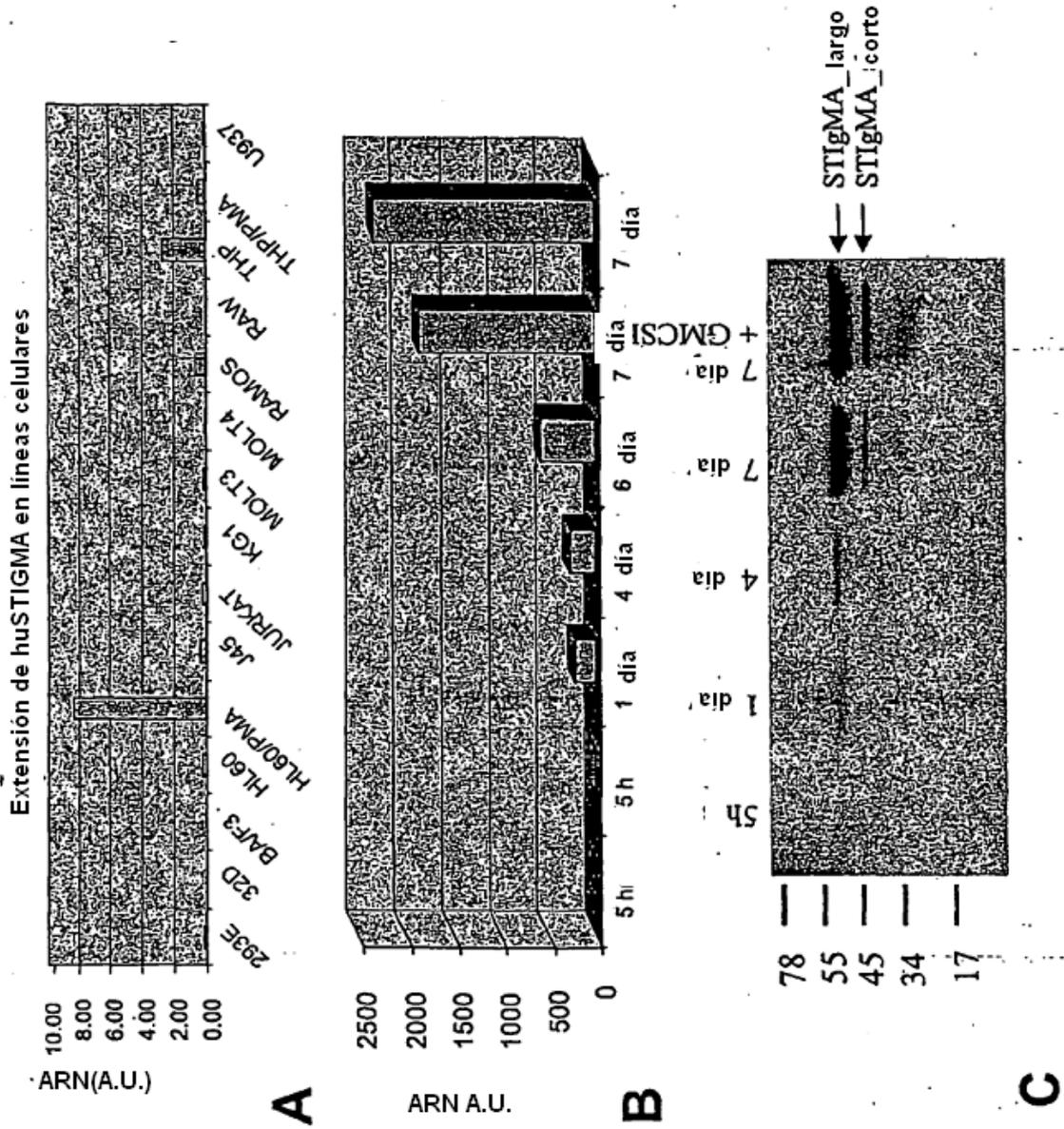


Figura 59

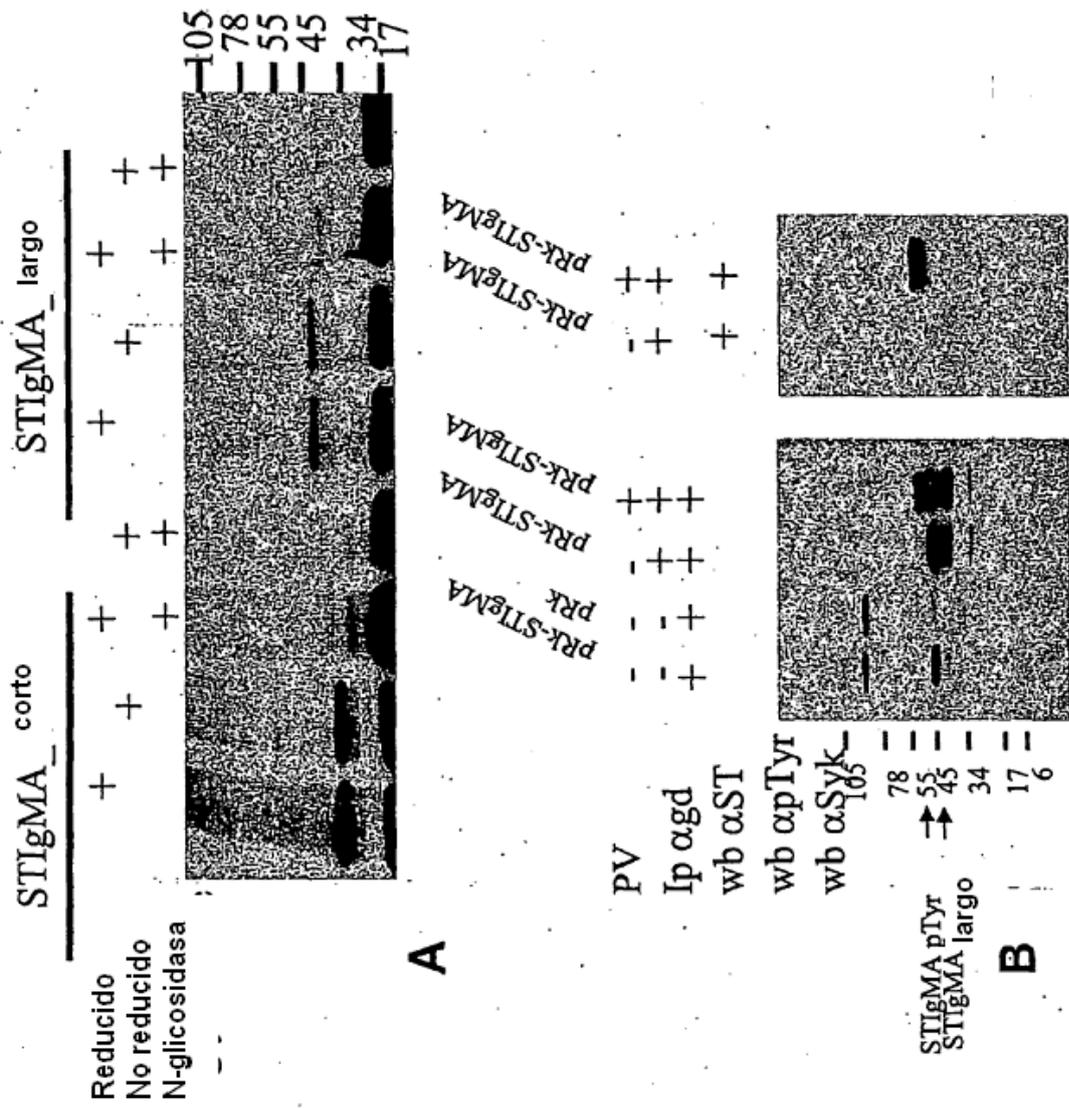


Figura 60

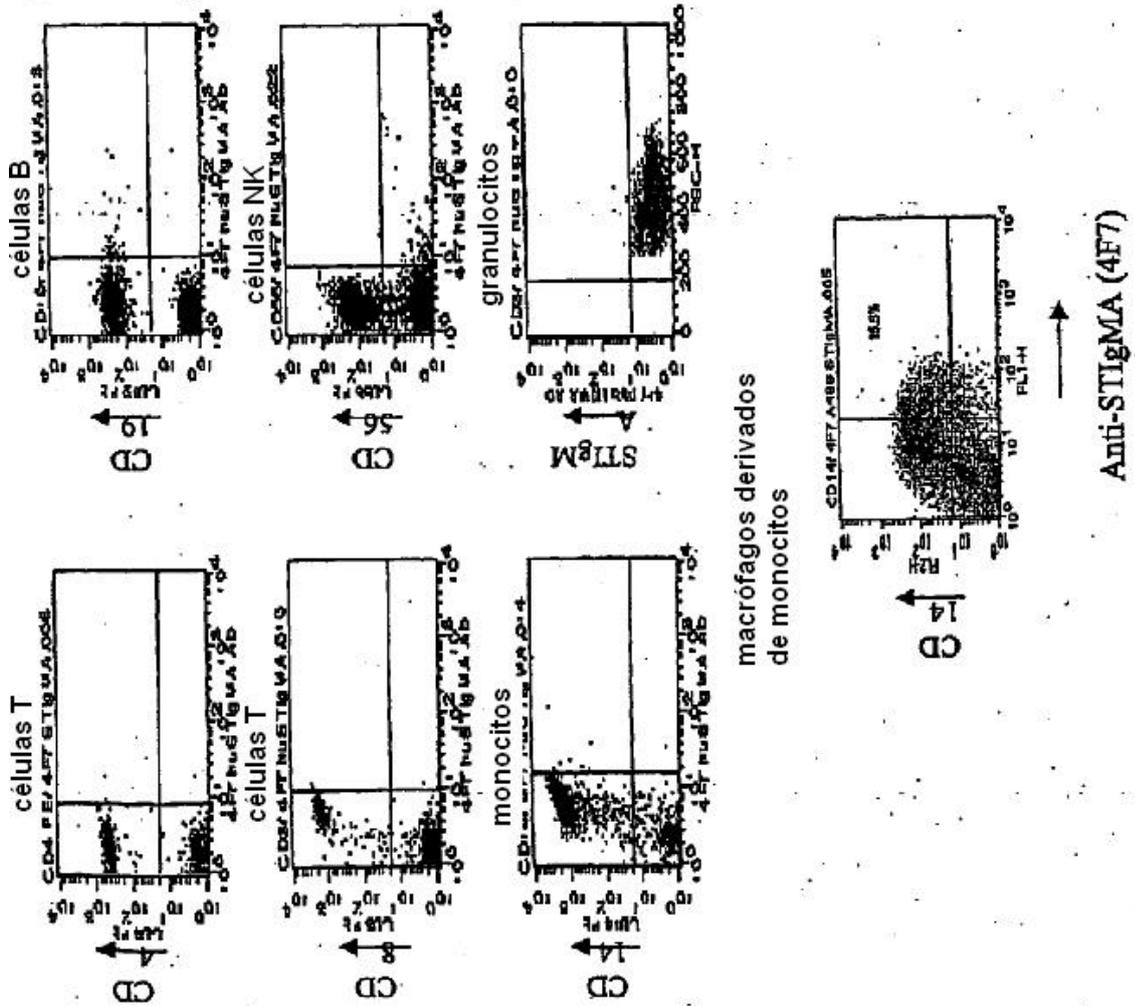


Figura 61A

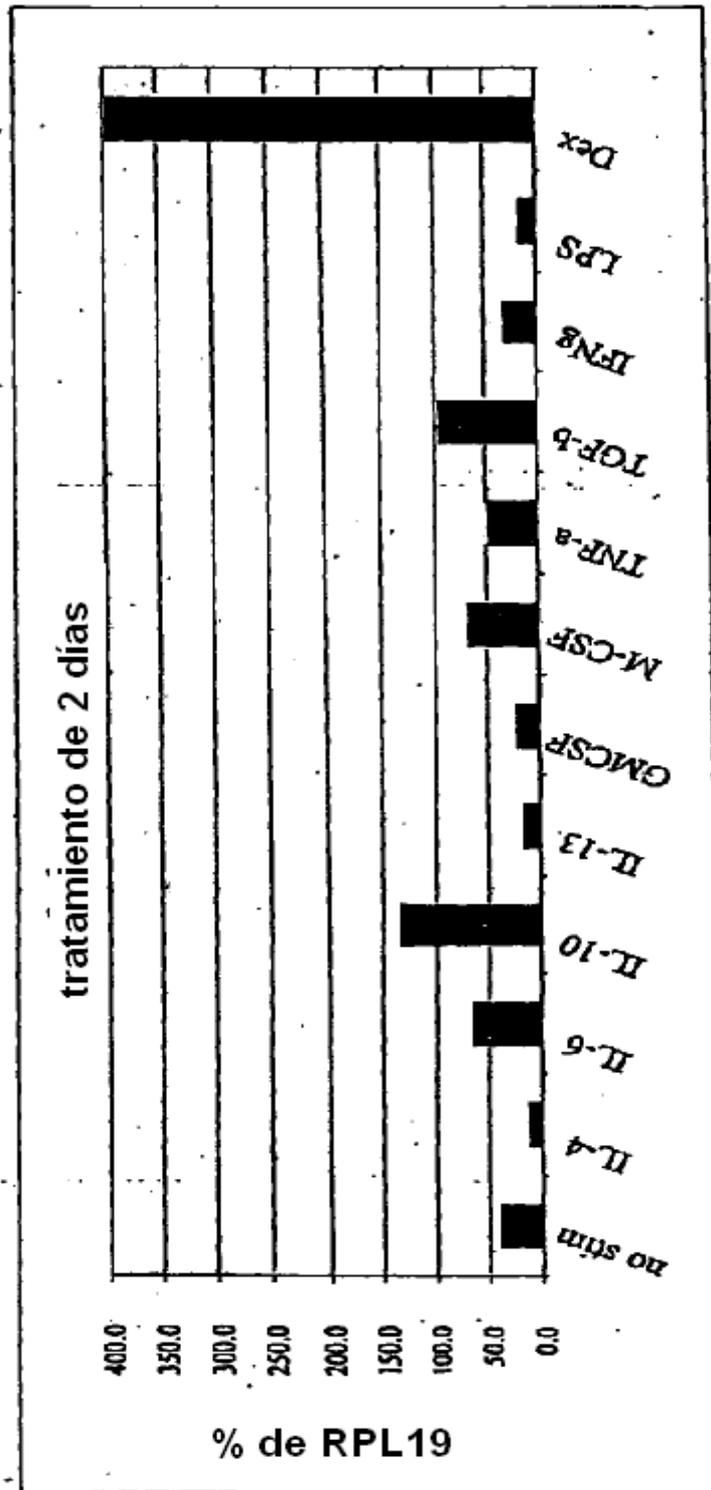


Figura 61B

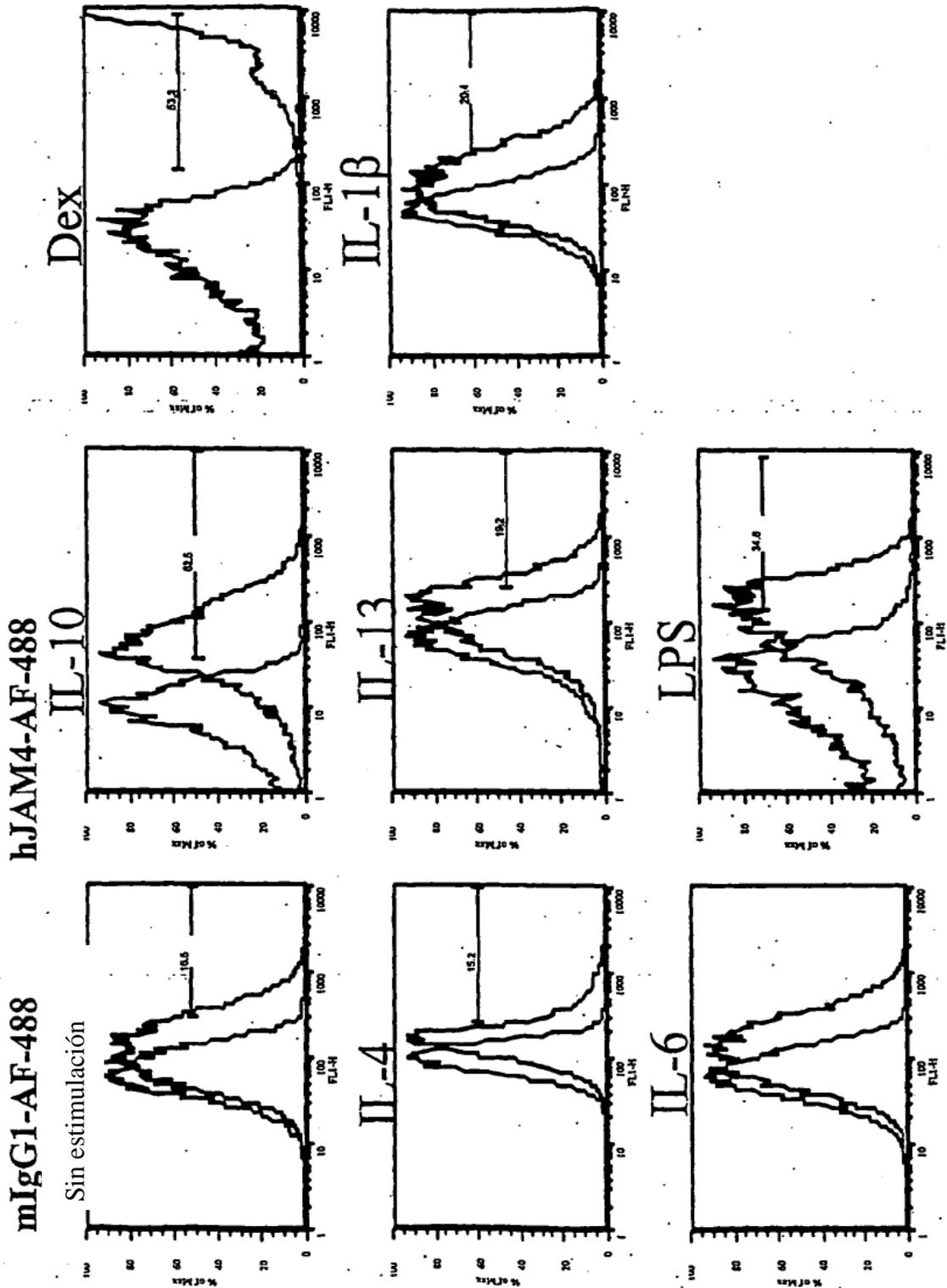


Figura 62

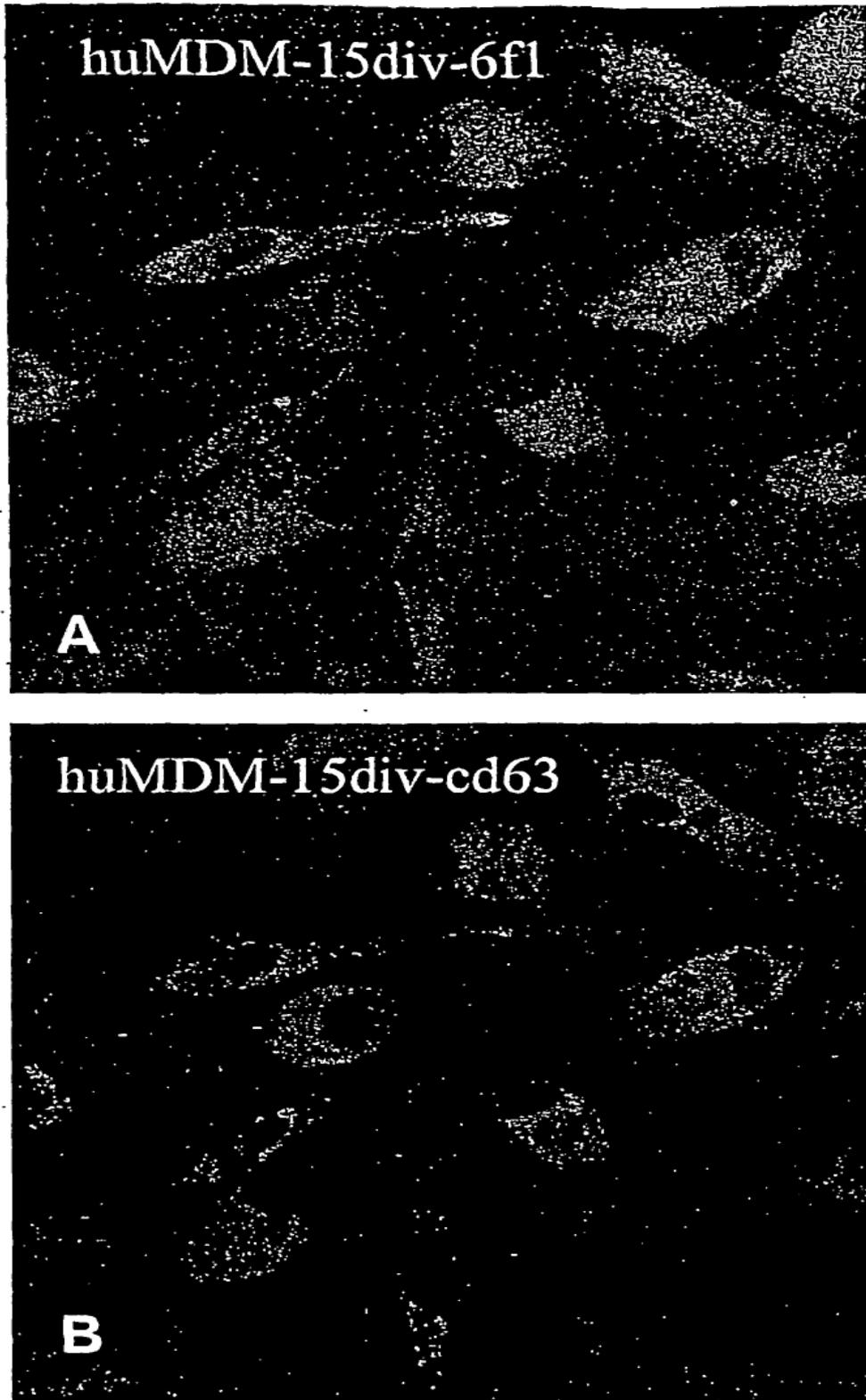


Figura 63

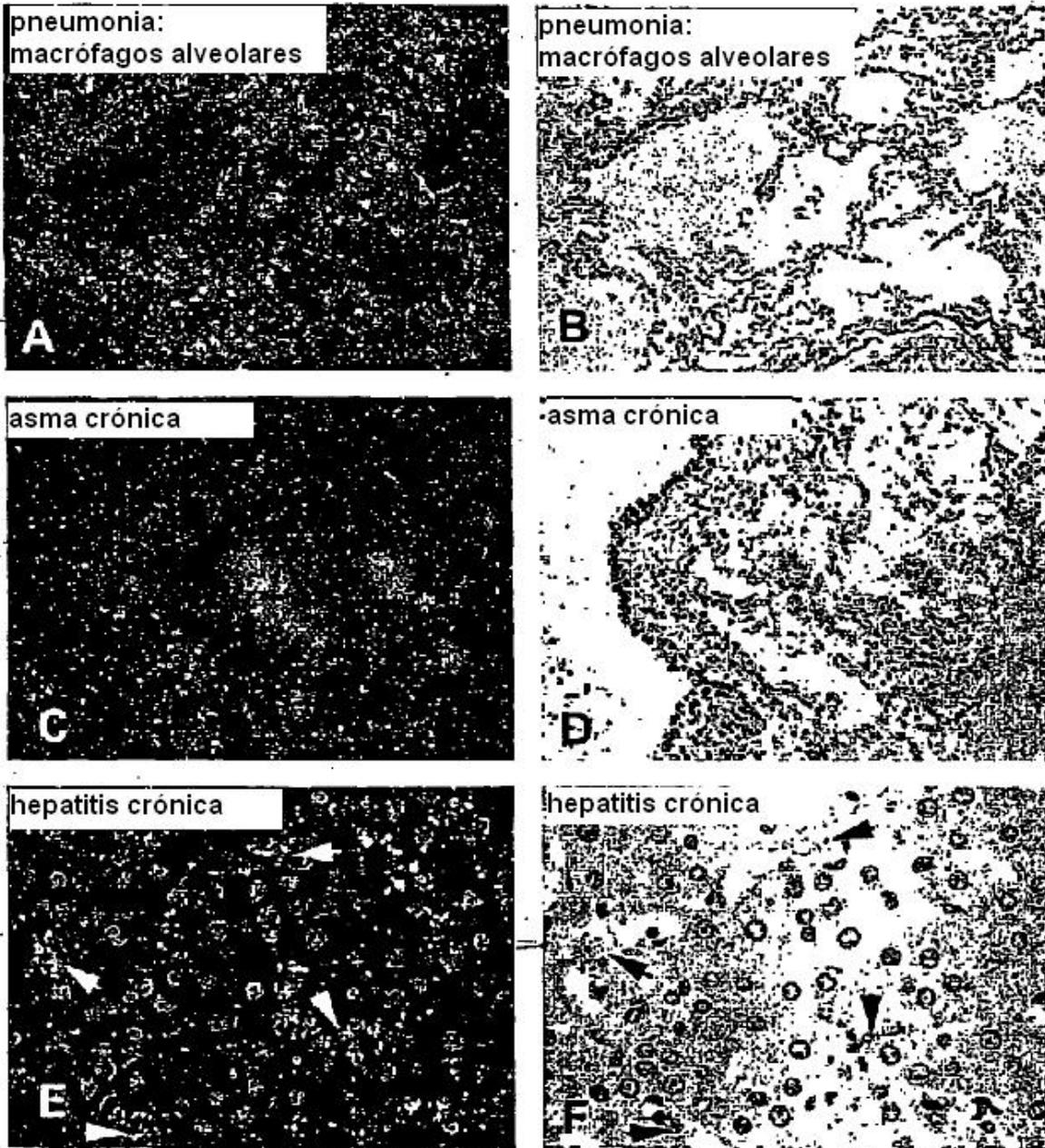


Figura 64

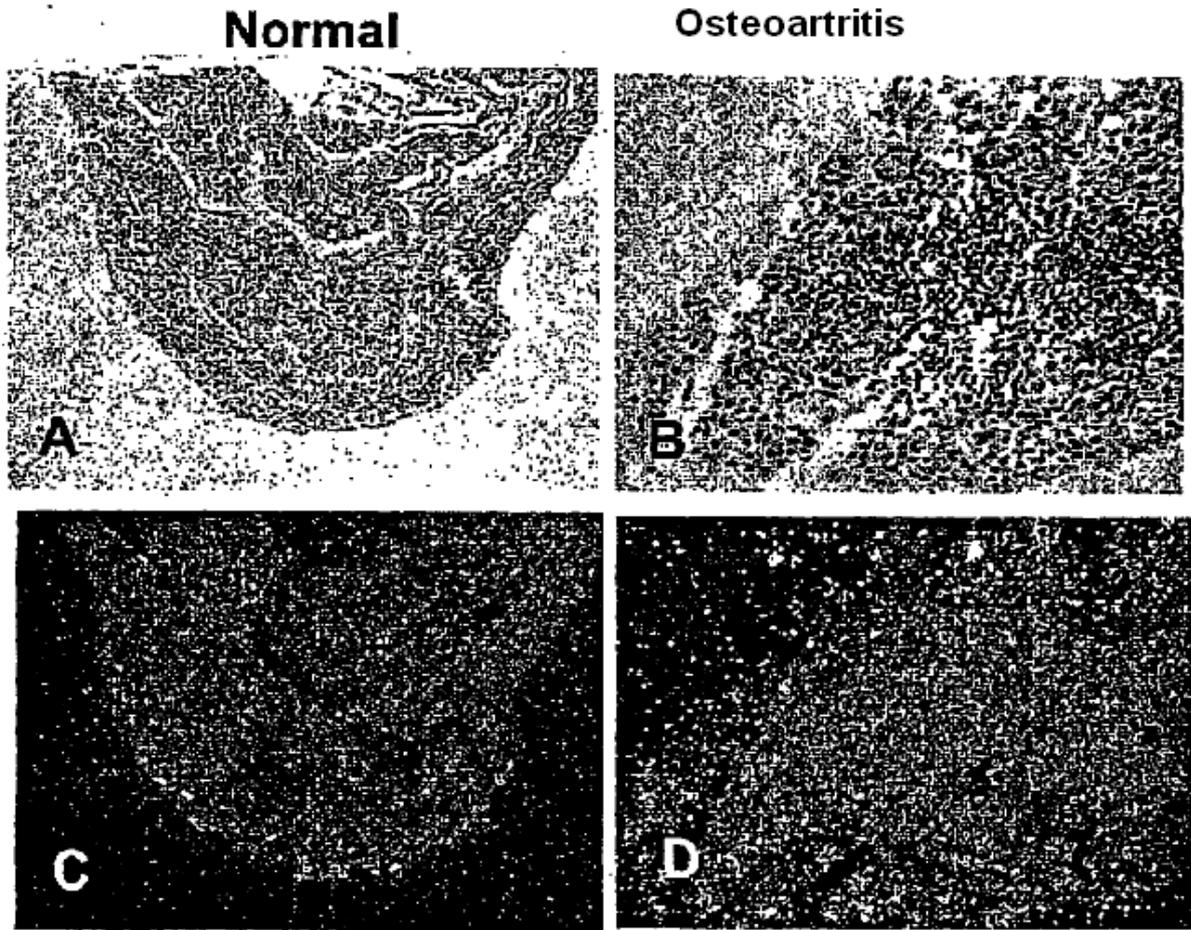


Figura 65

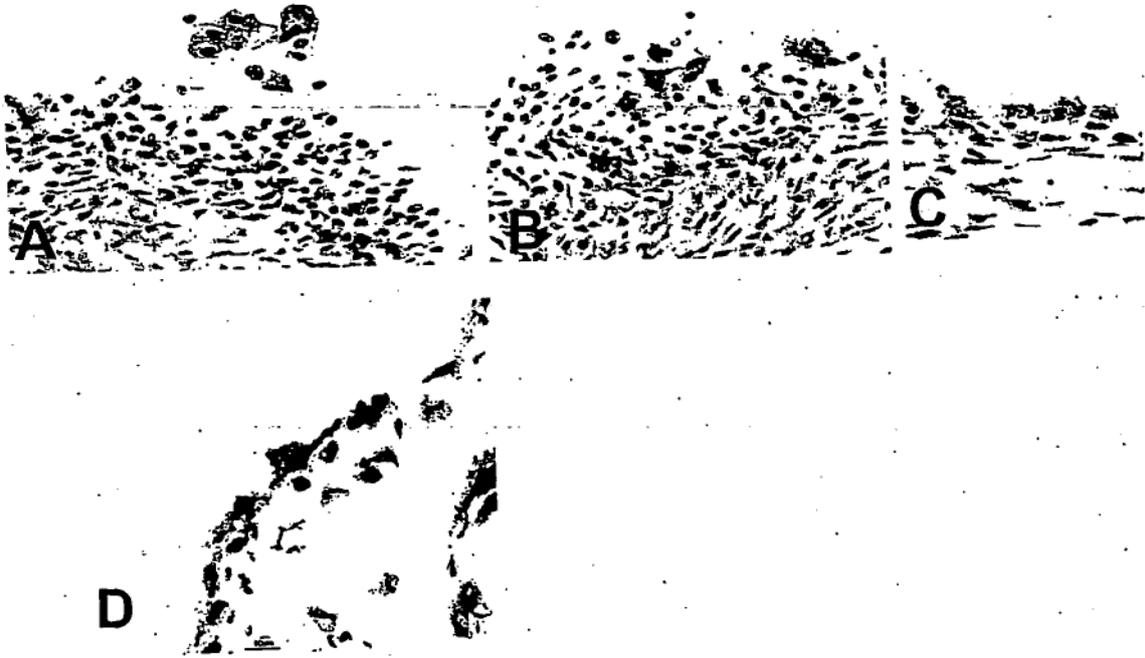


Figura 66

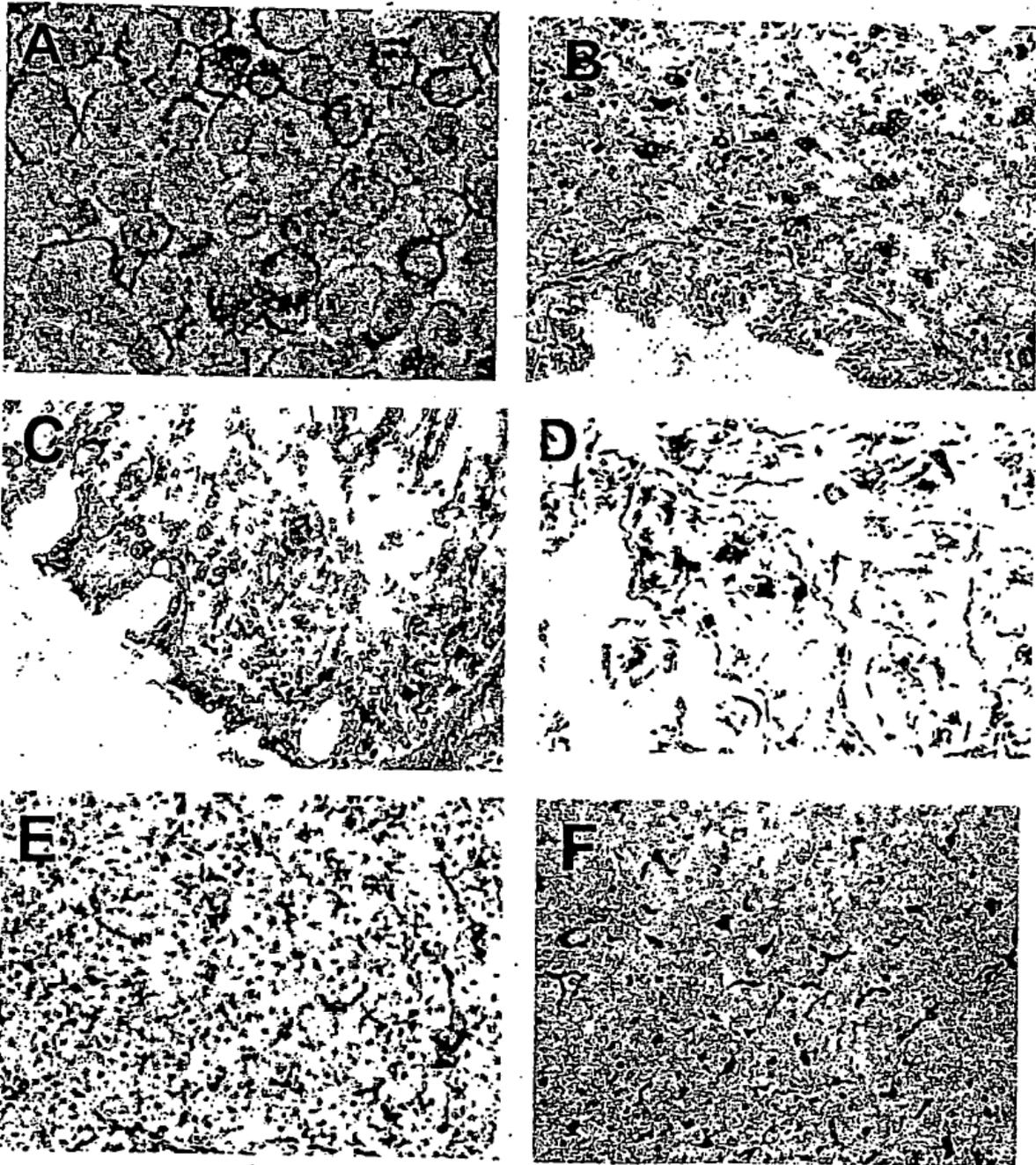


Figura 67

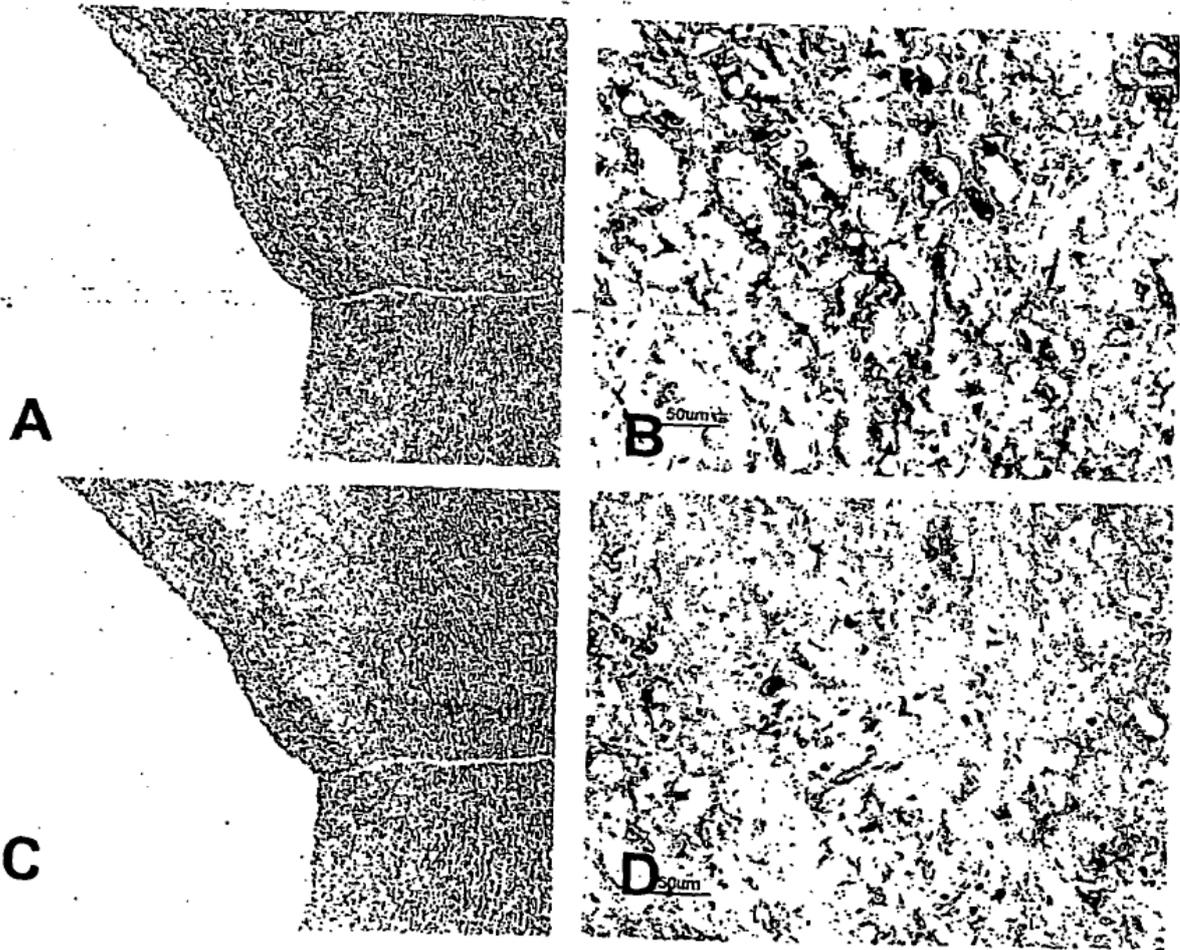


Figura 68

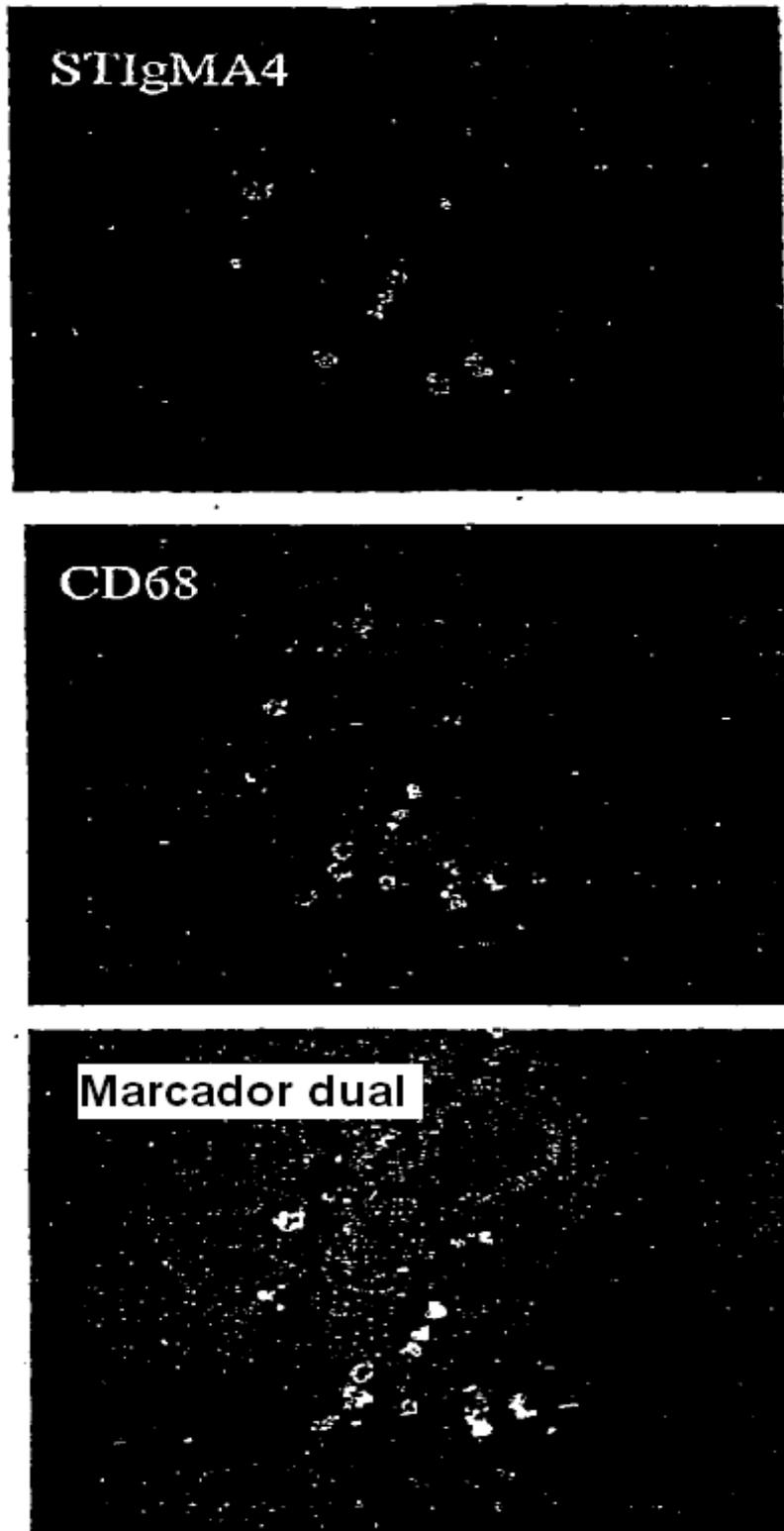
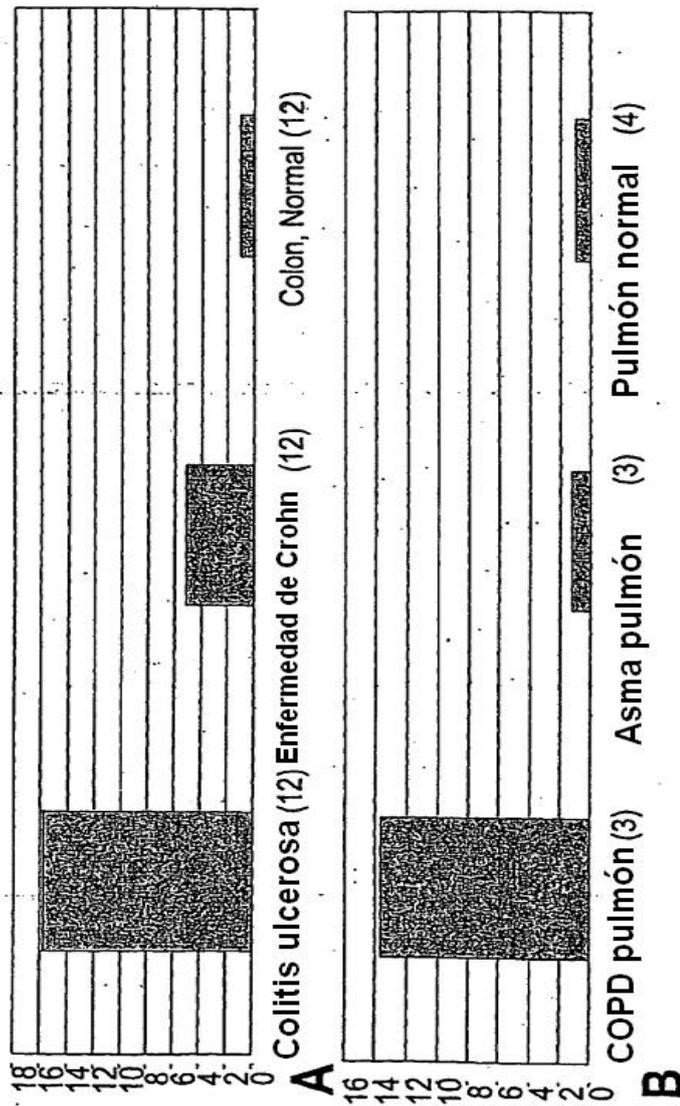


Figura 69



Nº de veces la diferencia con respecto al normal

Figura 70

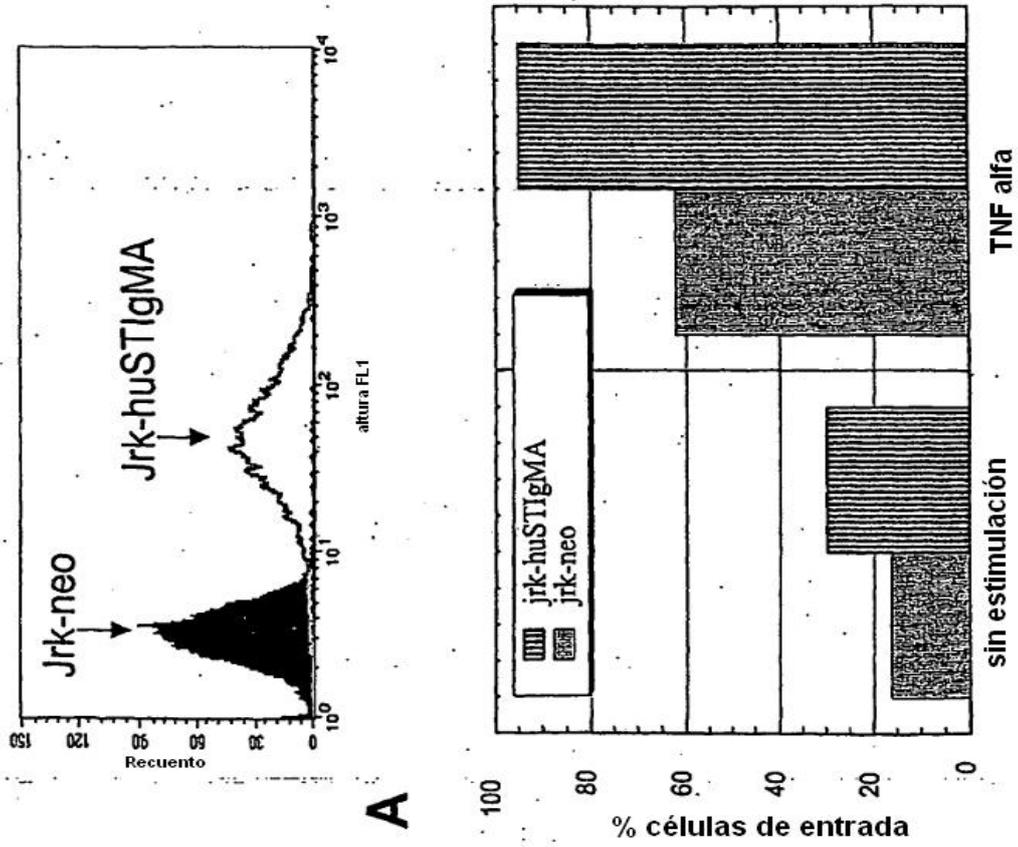


Figura 71: Efecto de la inyección sistémica de muSTIgMA-Fc en la progresión de CIA

