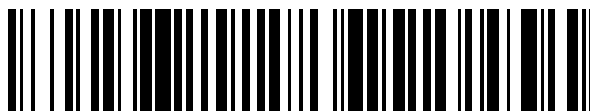


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 720**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2000** **E 00923254 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013** **EP 1169448**

54 Título: **Homólogos del factor de necrosis tumoral y ácidos nucleicos que los codifican**

30 Prioridad:

12.04.1999 US 128849 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.09.2013

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA WAY

SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

GODDARD, AUDREY;

PAN, JAMES y

YAN, MINHONG

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 421 720 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

Homólogos del factor de necrosis tumoral y ácidos nucleicos que los codifican

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere en general a la identificación y aislamiento de nuevo ADN y a la producción recombinante de polipéptidos nuevos que tiene homología con receptores del factor de necrosis tumoral, designado aquí como polipéptidos "DNA98853" y polipéptidos "DNA101848".

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] El control de la cantidad de células en los mamíferos se cree que está determinado, en parte, por un equilibrio entre la proliferación celular y la muerte celular. Una forma de muerte celular, a veces denominada muerte celular necrótica, se caracteriza habitualmente como una forma patológica de muerte celular resultante de algún trauma o daño celular. En cambio, existe otra forma "fisiológica" de muerte celular que normalmente procede de una manera ordenada o controlada. Esta forma ordenada o controlada de muerte celular se denomina a menudo como "apoptosis" [véase, por ejemplo, Barr et al., *Bio/Technology*, 12:487-493 (1994); Steller et al., *Science*, 267: 1445-1449 (1995)]. La muerte celular apoptótica tiene lugar de forma natural en muchos procesos fisiológicos, incluyendo el desarrollo embrionario y la selección clonal en el sistema inmunitario [Itoh et al., *Cell*, 66:233-243 (1991)]. Los niveles bajos de muerte celular apoptótica se ha asociado con una variedad de condiciones patológicas, que incluyen cáncer, lupus e infección del virus del herpes [Thompson, *Science*, 267:1456-1462 (1995)]. Los niveles altos de muerte celular apoptótica pueden estar asociados con una variedad de otras condiciones patológicas, que incluyen SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, retinitis pigmentosa, degeneración cerebelar, anemia aplásica, infarto de miocardio, apoplejía, lesión por perfusión, enfermedad del hígado inducida por toxina (véase, Thompson, *supra*).

[0003] La muerte celular apoptótica habitualmente se acompaña de uno o más cambios morfológicos y bioquímicos característicos en células, tales como la condensación del citoplasma, pérdida de microvellosidades en la membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de la función mitocondrial. Se cree que hay una variedad de señales extrínsecas e intrínsecas que desencadenan o inducen tales cambios celulares morfológicos y bioquímicos [Raff, *Nature*, 356: 397-400 (1992); Steller, *supra*; Sachs et al., *Blood*, 82: 15 (1993)]. Por ejemplo, pueden ser desencadenados por estímulos hormonales, tales como hormonas glucocorticoides para timocitos inmaduros, así como la eliminación de determinados factores de crecimiento [Watanabe-Fukunaga et al., *Nature*, 356: 314-317 (1992)]. Además, se ha descrito que algunos de oncogenes identificados tales como *myc*, *rel* y *E1A*, y de supresores tumorales, como *p53*, tienen un papel en la inducción de la apoptosis. Asimismo, se ha observado que algunos fármacos quimioterapéuticos y algunas formas de radiación tienen actividad inductora de apoptosis [Thompson, *supra*].

[0004] Diversas moléculas, tales como el factor de necrosis tumoral-alfa ("TNF-alfa"), el factor de necrosis tumoral-beta ("TNF-beta" o "linfotóxina-alfa"), la linfotóxina-beta ("LT-beta"), el ligando CD30, el ligando CD27, el ligando CD40, el ligando OX-40, el ligando 4-1BB, el ligando de Apo-1 (también denominado como ligando Fas o ligando CD95), el ligando de Apo-2 (también denominado como TRAIL), el ligando de Apo-3 (también denominado TWEAK), EDA y EDA-A2 se han identificado como miembros de la familia de citoquinas del factor de necrosis tumoral ("TNF") (véase, por ejemplo, Gruss y Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995); Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996); Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995); Browning et al., *Cell*, 72:847-856 (1993); Armitage et al., *Nature*, 357:80-82 (1992), WO 97/01633 publicada el 16 de enero de 1997; WO 97/25428 publicada el 17 de julio de 1997; Marsters et al., *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998); Chicheportiche et al., *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997); Bayes et al., *Human Molecular Genetics*, 7: 1661-1669 (1998); Kere et al., *Nature Genetics*, 13:409-416 (1996)]. De entre estas moléculas, se ha descrito que TNF-alfa, TNF-beta, el ligando CD30, el ligando 4-1BB, el ligando Apo-1, el ligando Apo-2 (TRAIL) y el ligando Apo-3 (TWEAK) están implicadas en la muerte de la célula apoptótica. Se ha descrito que tanto TNF- α como TNF- β inducen la muerte apoptótica en células tumorales susceptibles [Schmid et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986); Dealtry et al., *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987)]. Zheng et al. han descrito que TNF- α está implicado en la apoptosis después de la estimulación de células T positivas en CD8 [Zheng et al., *Nature*, 377:348-351 (1995)]. Otros investigadores han descrito que el ligando CD30 puede estar implicado en la eliminación de células T autorreactivas en el timo [Amakawa et al., *Cold Spring Harbor Laboratory Symposium on Programmed Cell Death*, Resumen No. 10, (1995)].

[0005] Las mutaciones en el receptor de ratón Fas/Apo-1 o en los genes del ligando (denominados *lpr* y *gld*, respectivamente) se han relacionado con algunos trastornos autoinmunitarios, lo que indica que el ligando Apo-1 puede desempeñar algún papel en la regulación de la selección clonal de linfocitos autorreactivos en la periferia [Krammer et al., *Curr. Op. Immunol.*, 6: 279-289 (1994); Nagata et al., *Science*, 267: 1.449-1.456 (1995)]. También se ha descrito que el ligando Apo-1 induce la apoptosis posterior a la estimulación en linfocitos T CD4-positivos y en linfocitos B, y puede estar implicado en la eliminación de linfocitos activados cuando su función ya no es necesaria [Krammer et al., *supra*; Nagata et al., *supra*]. Se ha descrito que los anticuerpos monoclonales de ratón agonistas que se unen específicamente al receptor Apo-1 muestran actividad citotóxica que es comparable o similar a la del

TNF- α [Yonehara et al., J. Exp. Med., 169: 1.747-1.756 (1989)].

[0006] Se cree que la inducción de varias respuestas celulares mediadas por tales citoquinas de la familia del TNF, se inicia a partir de su unión a receptores celulares específicos. Se identificaron dos receptores distintos del TNF de aproximadamente 55 kDa (TNFR1) y 75 kDa (TNFR2) (Hohman et al., J. Biol. Chem., 264:14927-14934 (1989); Brockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:3127-3131 (1990); EP 417.563, publicada el 20 de marzo de 1991) y se han aislado y caracterizado los ADNc de ser humano y ratón correspondientes a ambos tipos de receptores (Loetscher et al., Cell, 61:351 (1990); Schall et al., Cell, 61:361 (1990); Smith et al., Science, 248:1019-1023 (1990); Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88:2830-2834 (1991); Goodwin et al., Mol. Cell. Biol., 11:3020-3026 (1991)). Se han asociado amplios polimorfismos con los genes de ambos receptores de TNF (véase, por ejemplo, (Takao et al., Immunogenetics, 37:199-203 (1993)). Ambos TNFR comparten la típica estructura de receptores de la superficie celular que incluyen regiones extracelular, transmembrana e intracelular. Las partes extracelulares de ambos receptores se hallan de forma natural también como proteínas de unión a TNF solubles (Nophar, Y. et al., EMBO J., 9:3269 (1990); y Kohno, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87:8331 (1990)). La clonación de receptores de TNF solubles recombinantes se describen en Hale et al., J. Cell. Biochem. Suplemento 15F, 1991, p. 113 (P424).

[0007] La parte extracelular de TNFR de tipo 1 y tipo 2 (TNFR1 y TNFR2) contiene un patrón de secuencia de aminoácidos repetitivo de cuatro dominios ricos de cisteína (CRD) designados 1 a 4, empezando desde el extremo terminal NH₂. Cada CRD tiene aproximadamente 40 aminoácidos de largo y contiene 4 a 6 residuos de cisteína en las posiciones que están bien conservadas [Schall et al., supra; Loetscher et al., supra; Smith et al., supra; Nophar et al., supra; Kohno et al., supra]. En TNFR1, los límites aproximados de los cuatro CRD son los siguientes: CRD1 aminoácidos 14 a aproximadamente 53; CRD2 aminoácidos de aproximadamente 54 a aproximadamente 97; CRD3 aminoácidos de aproximadamente 98 a aproximadamente 138; CRD4 aminoácidos de aproximadamente 139 a aproximadamente 167. En TNFR2, CRD2 incluye aminoácidos 17 a aproximadamente 54; CRD2 aminoácidos de aproximadamente 55 a aproximadamente 97; CRD3 aminoácidos de aproximadamente 98 a aproximadamente 140; y CRD4 aminoácidos de aproximadamente 141 a aproximadamente 179 [Banner et al., Cell, 73:431-435 (1993)]. El papel potencial de los CRD en la unión a ligando también se describe en Banner et al., supra.

[0008] Un patrón repetitivo similar de CRD existe en varias proteínas de la superficie celular, incluyendo el receptor del factor de crecimiento nervioso p75 (NGFR) [Johnson et al., Cell, 47:545 (1986); Radeke et al., Nature, 325:593 (1987)], el antígeno de células B CD40 [Stamenkovic et al., EMBO J., 8:1403 (1989)], el antígeno de células T OX40 [Mallet et al., EMBO J., 9:1063 (1990)] y el antígeno Fas [Yonehara et al., J. Exp. Med., 169:1747-1756 (1989) e Itoh et al., Cell, 66:233-243 (1991)]. Los CRD también se hallan en las proteínas T2 del tipo TNFR (sTNFR) de poxvirus de Shope y mixoma [Upton et al., Virology, 160:20-29 (1987); Smith et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 176:335 (1991); Upton et al., Virology, 184: 370 (1991)]. La alineación óptima de estas secuencias indica que las posiciones de los residuos de cisteína están bien conservadas. Estos receptores se denominan a veces colectivamente como miembros de la superfamilia de receptores TNF/NGF. Estudios recientes en p75NGFR mostraron que la delección de CDR1 [Welcher, A.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 159-163 (1991)] o una inserción de 5 aminoácidos en este dominio [Yan, H. y Chao, M.V., J. Biol. Chem., 266:12099-12104 (1991)] presentaban un efecto escaso o nulo en la unión a NGF [Yan, H. y Chao, M.V., supra]. EL NGFR p75 contiene un tramo rico en prolina de aproximadamente 60 aminoácidos, entre su CRD4 y región transmembrana, que no está implicado en la unión a NGF [Peetre, C. et al., Eur. J. Hematol., 41:414-419 (1988); Seckinger, P. et al., J. Biol. Chem., 264:11966-11973 (1989); Yan, H. y Chao, M.V., supra]. Una región rica en prolina similar se halla en TNFR 2, pero no en TNFR1.

[0009] Los ligandos de la familia de TNF identificados hasta la fecha, con la excepción de la linfotóxina α , son proteínas transmembrana del tipo II, cuyo extremo C-terminal es extracelular. En cambio, la mayoría de receptores en la familia de receptores TNF (TNFR) identificados hasta la fecha son proteínas transmembrana de tipo I. Tanto en las familias de ligandos de TNF como los receptores, se ha observado homología entre los miembros de la familia principalmente en el dominio extracelular ("ECD"). Varias de las citoquinas de la familia de TNF, incluyendo TNF- α , el ligando Apo-1 y el ligando CD40, se separan proteolíticamente en la superficie celular; la proteína resultante en cada caso forma habitualmente una molécula homotrimérica que funciona como citoquina soluble. Las proteínas de la familia de receptores de TNF también se separan normalmente proteolíticamente para liberar los ECD de receptores solubles que pueden funcionar como inhibidores de las citoquinas afines.

[0010] Recientemente, se han identificado otros miembros de la familia de TNFR. Dichos miembros de la familia de TNFR recientemente identificados incluyen CAR1, HVEM y osteoprotegerina (OPG) [Brojatsch et al., Cell, 87:845-855 (1996); Montgomery et al., Cell, 87:427-436 (1996); Marsters et al., J. Biol. Chem., 272:14029-14032 (1997); Simonet et al., Cell, 89:309-319 (1997)]. A diferencia de otras moléculas de tipo TNFR conocidas, Simonet et al., supra, describen que la OPG no contiene una secuencia que abarca la transmembrana hidrofóbica.

[0011] Se ha identificado en ratón otro nuevo miembro de la familia de receptores TNF/NGF, un receptor referido como GITR para "gen relacionado con la familia de receptores del factor de necrosis tumoral inducido por glucocorticoides" [Nocentini et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6216-6221 (1997)]. El receptor GITR de ratón es una proteína transmembrana de tipo I de 228 aminoácidos que se expresa en linfocitos T del timo, bazo y nódulos

linfáticos en ratones normales. La expresión del receptor GTR de ratón se indujo en linfocitos T tras la activación con anticuerpos anti-CD3, Con A o forbol 12-miristato 13-acetato.

[0012] En Marsters et al., Curr. Biol., 6:750 (1996), los investigadores describen un polipéptido humano de secuencia nativa de longitud completa, denominado Apo-3, que muestra similitud con la familia de TNFR en sus repeticiones extracelulares ricas en cisteína y se parece a TNFR1 y CD95 en que contiene una secuencia de dominio de muerte citoplasmática [véase también Marsters et al., Curr. Biol., 6:1669 (1996)]. También se ha referido a Apo-3 por otros investigadores como DR3, wsl-1, TRAMP, y LARD [Chinnaiyan et al., Science, 274:990 (1996); Kitson et al., Nature, 384:372 (1996); Bodmer et al., Immunity, 6:79 (1997); Screaton et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:4615-4619 (1997)].

[0013] Pan et al., han descrito otro miembro de la familia de receptores del TNF denominado como "DR4" (Pan et al., Science, 276:111-113 (1997)). Se indicó que el DR4 contenía un dominio de muerte citoplasmático capaz de involucrar el aparato de suicidio de la célula. Pan et al., describen que se cree que el DR4 es un receptor para el ligando conocido como ligando Apo2 o TRAIL.

[0014] En Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997) y Pan et al., Science, 277:815-818 (1997), se describe otra molécula que se cree que es un receptor para el ligando Apo2 (TRAIL). Esa molécula se denomina como DR5 (también se ha denominado alternativamente como Apo-2; TRAIL-R2, TRICK2 o KILLER (Screaton et al., Curr. Biol., 7:693-696 (1997); Walczak et al., EMBO J., 16:5386-5387 (1997); Wu et al., Nature Genetics, 17:141-143 (1997)). Se ha descrito que el DR5, al igual que el DR4, contiene un dominio de muerte citoplasmático y que es capaz de señalar la apoptosis.

[0015] Recientemente se identificó otro receptor que contiene el dominio de muerte, DR6 [Pan et al., FEBS Letters, 431: 351-356 (1998)]. A parte de contener cuatro posibles dominios extracelulares y un dominio de muerte citoplasmática, se cree que DR6 contiene una posible secuencia de cremalleras de leucina que se solapa con un motivo rico en prolina en la región citoplasmática. El motivo rico en prolina se parece a las secuencias que se unen a los dominios src-homología-3, que se hallan en muchas moléculas de transducción de señales intracelulares.

[0016] Un grupo adicional de receptores recientemente identificados se denomina como "receptores de señuelo", los cuales se cree que funcionan como inhibidores, en vez de como transductores de señal. Este grupo incluye el DCR1 (también denominado como TRID, LIT o TRAIL-R3) (Pan et al., Science, 276:111-113 (1997); Sheridan et al., Science, 277:818-821 (1997); McFarlane et al., J. Biol. Chem., 272:25417-25420 (1997); Schneider et al., FEBS Letters, 416:329-334 (1997); Degli-Esposti et al., J. Exp. Med., 186:1165-1170 (1997); y Mongkolsapaya et al., J. Immunol., 160:3-6 (1998)) y el DCR2 (también denominado TRUND o TRAIL-R4) (Marsters et al., Curr. Biol., 7:1003-1006 (1997); Pan et al., FEBS Letters, 424:41-45 (1998); Degli-Esposti et al., Immunity, 7:813-820 (1997)), ambos son moléculas de la superficie celular, así como el OPG (Simonet et al., ver más arriba) y el DCR3 (Pitti et al., Nature, 396:699-703 (1998)), ambas son proteínas solubles, secretadas.

[0017] Para una revisión de la familia de citoquinas de TNF y sus receptores, véase Ashkenazi et al., Science, 281:1305-1308 (1998); Golstein, Curr. Biol., 7:750-753 (1997); y Gruss y Dower, supra.

[0018] Tal como se entiende actualmente, el programa de muerte celular contiene por lo menos tres elementos importantes – activadores, inhibidores y efectores; en *C. elegans*, estos elementos son codificados respectivamente por tres genes, *Ced-4*, *Ced-9* y *Ced-3* [Steller, Science, 267: 1445 (1995); Chinnaiyan et al., Science, 275: 1122-1126 (1997); Wang et al., Cell, 90:1-20 (1997)]. Dos de los miembros de la familia de TNFR, TNFR1 y Fas/Apo1 (CD95), pueden activar la muerte celular apoptótica [Chinnaiyan y Dixit, Current Biology, 6: 555-562 (1996); Fraser y Evan, Cell, 85: 781-784 (1996)]. También se sabe que TNFR1 media en la activación del factor de transcripción, NF- κ B [Tartaglia et al., Cell, 74: 845-853 (1993); Hsu et al., Cell, 84: 299-308 (1996)]. Además de cierta homología de ECD, estos dos receptores comparten homología en su dominio intracelular (ICD) en una zona interfacial de oligomerización conocido como el dominio de muerte [Tartaglia et al., supra; Nagata, Cell, 88: 355 (1997)]. Los dominios de muerte también se hallan en varias proteínas "metazoanas" que regulan la apoptosis, concretamente, la proteína de *Drosophila*, Reaper, y las proteínas de mamífero a las que se hace referencia como FADD/MORT1, TRADD y RIP (Cleaveland y Ihle, Cell, 81: 479-482 (1995)).

[0019] Tras la unión del ligando y agrupamiento con el receptor, se cree que TNFR1 y CD95 reclutan FADD en un complejo de señalización inductor de la muerte. CD95 supuestamente se une directamente a FADD, mientras que TNFR1 se une a FADD indirectamente a través de TRADD [Chinnaiyan et al., Cell, 81: 505-512 (1995); Boldin et al., J. Biol. Chem., 270: 387-391 (1995); Hsu et al., supra; Chinnaiyan et al., J. Biol. Chem. 271, 4961-4965 (1996)]. Se ha descrito que FADD actúa como una proteína adaptadora que recluta la proteasa relacionada con *Ced-3*, MACH α /FLICE (caspasa 8), en el complejo de señalización de la muerte [Boldin et al., Cell, 85: 803-815 (1996); Muzio et al., Cell, 85: 817-827 (1996)]. MACH α /FLICE parece ser el desencadenante que inicia una cascada de proteasas apoptóticas, incluyendo la enzima convertidora de interleuquina-1 β (ICE) y GPP32/Yama, que pueden ejecutar algunos aspectos críticos del programa de muerte celular [Fraser y Evan, supra].

[0020] Recientemente se ha descrito que la muerte celular programada implica la actividad de miembros de una familia de proteasas de cisteína relacionadas con el gen de la muerte celular de *C-elegans*, *ced-3*, y a la enzima

conversora de IL-1 de mamífero, ICE. La actividad de las proteasas ICE y CPP32/Yama puede ser inhibida por el producto del gen del virus de la viruela de las vacas ("cowpox"), *crmA* [Ray et al., Cell, 69: 597-604 (1992); Tewari et al., Cell, 81: 801-809 (1995)]. Estudios recientes muestran que CrmA puede inhibir la muerte celular inducida por TNFR-1 y C095 [Enari et al., Nature, 375: 78-81 (1995); Tewari et al., J. Biol. Chem., 270: 3255-3260 (1995)].

[0021] Tal como revisó recientemente Tewari et al., TNFR1, TNFR2 y CD40 modulan la expresión de citoquinas proinflamatorias y coestimulantes, los receptores de citoquinas, y las moléculas de adhesión celular a través de la activación del factor de transcripción, NF- κ B [Tewari et al., Curr. Op. Genet. Develop., 6:39-44 (1996)]. NF- κ B es el prototipo de una familia de factores de transcripción dimericos cuyas subunidades contienen regiones Rel conservadas [Verma et al., Genes Develop, 9: 2723-2735 (1996); Baldwin, Ann. Rev. Immunol., 14: 649-681 (1996)]. En su forma latente, NF- κ B se compleja con miembros de la familia de inhibidores I κ B; tras la inactivación del I κ B en respuesta a ciertos estímulos; el NF- κ B liberado se transloca al núcleo donde se une a secuencias de ADN específicas y activa la transcripción de los genes.

[0022] Para otras revisiones recientes de dichos mecanismos de señalización, véase, por ejemplo, Ashkenazi et al., Science, 281:1305-1308 (1998) y Nagata, Cell, 88:355-365 (1997).

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0023] Los solicitantes han identificado clones de ADNc que codifican nuevos polipéptidos que tienen cierta identidad de secuencia con la proteína o proteínas receptoras del factor de necrosis tumoral descritas anteriormente, en los que los polipéptidos se designan en la presente solicitud como polipéptido "DNA98853" y polipéptido "DNA101848".

[0024] En el presente documento se describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende el ADN que codifica un polipéptido DNA98853. En ciertos aspectos, el ácido nucleico aislado comprende el ADN que codifica el DNA98853 que tiene los residuos de aminoácidos 1 a 299 o 1 a 136 de la figura 2 (SEQ ID NO:3), o es complementario a dichas secuencias de ácidos nucleicos codificantes, y permanece de forma estable unido a las mismas bajo condiciones de astringencia, por lo menos moderadas y, opcionalmente, elevadas. La secuencia del ácido nucleico aislado puede comprender el inserto de ADNc del vector depositado el 6 de abril de 1999 como ATCC 203906 que incluye la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido DNA9885.

[0025] También se describe en el presente documento un vector que comprende ADN que codifica un polipéptido DNA98853. También se describe una célula huésped que comprende dicho vector. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, E. coli, o levadura. También se describe un proceso para producir polipéptidos DNA98853 y comprende cultivar las células huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido DNA98853 y recuperar el polipéptido DNA98853 del cultivo celular.

[0026] También se describe en el presente documento un polipéptido DNA98853 aislado, en particular, un polipéptido DNA98853 de secuencia nativa aislada, que en un ejemplo, incluye una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1 a 299 de la figura 2 (SEQ ID NO:3). Los ejemplos adicionales incluyen secuencias del dominio extracelular aisladas de un polipéptido DNA98853 que comprenden los aminoácidos 1 a 136 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEQ ID NO:3), o fragmentos de la misma. Opcionalmente, el polipéptido DNA98853 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por el inserto de ADNc del vector depositado el 6 de abril de 1999 como ATCC 203906.

[0027] También se describen moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido DNA98853 o secuencia del dominio extracelular u otro fragmento del mismo fusionado a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. Un ejemplo de dicha molécula quimérica comprende un polipéptido DNA98853 fusionado a una secuencia de epítipo con etiqueta o una región de Fc de una inmunoglobulina.

[0028] También se describe un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido DNA98853 o dominio extracelular del mismo. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[0029] También se describen métodos de diagnóstico y terapéuticos que utilizan el polipéptido DNA98853 o el ADN que codifica el polipéptido DNA98853.

[0030] La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende ADN que codifica un polipéptido DNA101848. En ciertos aspectos, el ácido nucleico aislado comprende ADN que codifica el polipéptido DNA101848 que tiene los residuos de aminoácidos 1 a 297 o 1 a 136 de la figura 4 (SEQ ID NO:6), o es complementario a dichas secuencias de ácidos nucleicos, y permanece de forma estable unido a las mismas bajo condiciones de astringencia, por lo menos moderadas y, opcionalmente, elevadas. La secuencia del ácido nucleico aislado puede comprender el inserto de ADNc del vector depositado el 6 de abril de 1999 como ATCC 203907 cuyo ejemplo incluye la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido DNA101848.

[0031] También se describe en el presente documento un vector que comprende ADN que codifica un polipéptido DNA101848. También se describe una célula huésped que comprende dicho vector. A modo de ejemplo, las células

huésped pueden ser células CHO, E. coli, o levadura. También se describe un proceso para producir polipéptidos DNA101848 y comprende cultivar las células huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido DNA101848 y recuperar el polipéptido DNA101848 del cultivo celular.

[0032] La presente invención se refiere a un polipéptido DNA101848 aislado, en particular, un polipéptido DNA101848 de secuencia nativa aislada, que en un ejemplo, incluye una secuencia de aminoácidos que comprende los residuos 1 a 297 de la figura 4 (SEQ ID NO: 6). Los ejemplos adicionales incluyen secuencias del dominio extracelular aisladas de un polipéptido DNA101848 que comprenden los aminoácidos 1 a 136 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 4 (SEQ ID NO: 6), o fragmentos de la misma. Opcionalmente, el polipéptido DNA101848 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por el inserto de ADNc del vector depositado el 6 de abril de 1999 como ATCC 203907.

[0033] También se describen moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido DNA101848 o secuencia del dominio extracelular u otro fragmento del mismo fusionado a un polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. Un ejemplo de dicha molécula quimérica comprende un polipéptido DNA101848 fusionado a una secuencia de epítipo con etiqueta o una región de Fc de una inmunoglobulina.

[0034] La invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido DNA101848 o dominio extracelular del mismo tal como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[0035] En una realización adicional, la presente invención proporciona el uso médico de un anticuerpo de la invención en métodos terapéuticos tal como se define en las reivindicaciones. También se describen métodos de diagnóstico y terapéuticos que utilizan el polipéptido DNA101848 o el ADN que codifica el polipéptido DNA101848.

[0036] Los solicitantes han descubierto sorprendentemente que el ligando de la familia de TNF referido como EDA-A2 se une al receptor DNA101848. De este modo, la presente invención proporciona métodos nuevos de utilización de antagonistas de estos ligandos y receptores relacionados con TNF tal como se define en las reivindicaciones. Los antagonistas y agonistas aquí descritos son útiles, entre otras cosas, en el diagnóstico o tratamiento in vitro, in situ, o in vivo de células de mamífero o condiciones patológicas asociadas con la presencia (o ausencia) de EDA-A2.

[0037] Los métodos de utilización incluyen los usos médicos para el tratamiento de condiciones o enfermedades patológicas en mamíferos asociadas con o resultantes de un aumento o incremento de la expresión y/o actividad de EDA-A2 tal como se define en las reivindicaciones. En los métodos de tratamiento, los antagonistas de EDA-A2 se pueden administrar al mamífero que sufre de dicha condición o enfermedad patológica. Los antagonistas de EDA-A2 contemplados en la utilización incluyen inmunoadhesinas de receptores DNA101848 o DNA98853, así como anticuerpos contra el receptor DNA101848 o DNA98853, que preferiblemente bloquean o reducen la unión o activación al respectivo receptor por EDA-A2. Los antagonistas de EDA-A2 contemplados en la utilización incluyen además anticuerpos anti-EDA-A2 que son capaces de bloquear o reducir la unión del ligando a los receptores DNA101848 o DNA98853. Otras moléculas antagonistas incluyen formas modificadas covalentemente, o proteínas de fusión, que comprenden DNA101848 o DNA98853. A modo de ejemplo, dichos antagonistas pueden incluir DNA101848 o DNA98853 "pegilados" o DNA101848 o DNA98853 fusionados a secuencias heterólogas, tales como epítopos etiqueta o cremalleras de leucina.

[0038] En otra realización de la invención, se proporcionan métodos in vitro y usos médicos para utilizar los antagonistas de EDA-A2 para bloquear o neutralizar la interacción entre EDA-A2 y DNA101848 tal como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la invención proporciona un método que comprende exponer una célula de mamífero a uno o más antagonistas de EDA-A2 en una cantidad eficaz para disminuir, neutralizar o bloquear la actividad del ligando de EDA-A2, en el que la célula puede estar en un cultivo celular o en un mamífero, por ejemplo, un mamífero que padece, por ejemplo, una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o cáncer, tal como se define en las reivindicaciones. De este modo, la presente invención incluye usos médicos para tratar un mamífero que padece una condición patológica, tal como una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario, o cáncer, que comprende administrar una cantidad eficaz de uno o más antagonistas de EDA-A2, tal como se describen aquí.

[0039] La presente invención también proporciona composiciones que comprenden uno o más antagonistas de EDA-A2 tal como se definen en las reivindicaciones. Opcionalmente, las composiciones de la invención incluirán portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0040]

La figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) (y secuencia complementaria (SEQ ID NO:2)) de un ADNc de polipéptido DNA98853 de secuencia nativa (nucleótidos 1-903). También se presenta subrayadas la posición de tres repeticiones ricas en cisteína codificadas por los nucleótidos 10-126, 133-252 y 259-357. El posible dominio transmembrana de la proteína está codificado por los nucleótidos 409-474 en la figura.

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:3) derivada de los nucleótidos 1-900 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 1. Existe un potencial dominio transmembrana entre los aminoácidos 137 y 158 en la figura, ambos inclusive.

5 La figura 3 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:4) (y secuencia complementaria (SEQ ID NO:5)) de un ADNc de polipéptido DNA101848 de secuencia nativa (nucleótidos 1-897). También se presenta subrayadas la posición de tres repeticiones ricas en cisteína codificadas por los nucleótidos 10-126, 133-252 y 259-357. El posible dominio transmembrana de la proteína está codificado por los nucleótidos 409-474 en la figura.

10 La figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:6) derivada de los nucleótidos 1-894 de la secuencia de nucleótidos mostrada en la figura 3. Existe un potencial dominio transmembrana entre los aminoácidos 137 y 158 en la figura, ambos inclusive

15 La figura 5 ilustra una alineación de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido DNA101848 (SEQ ID NO:6) con la secuencia de aminoácidos de un polipéptido DNA98853 (SEQ ID NO:3). La alineación muestra la identidad de secuencia a excepción de un espacio de dos aminoácidos en el polipéptido DNA101848.

20 La figura 6 ilustra una representación esquemática de un procedimiento nuevo de PCR de larga distancia inverso llevado a cabo para aislar la secuencia codificante de longitud completa para los polipéptidos DNA98853 y DNA101848.

La figura 7 ilustra transferencias Northern que muestran niveles de expresión del polipéptido DNA101848 en varias líneas celulares y tejidos humanos.

25 La figura 8 ilustra los resultados de ensayos del polipéptido DNA101848 para determinar la activación de NF-KB. Estos ensayos analizan la expresión de un gen informador impulsado por un promotor que contiene un elemento sensible a NF-KB del gen de E-selectina.

30 La figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos del clon 509 1511H de Incyte. (SEQ ID No:7)

Las figuras 10A-10D muestran los resultados del ensayo de inmunotinción de MCF-7 (células transfectadas con construcciones de DNA101848 Flag N-terminal o C-terminal) para determinar las propiedades transmembrana del receptor DNA101848.

35 La figura 11 muestra los resultados de un ensayo de inmunotinción de células transfectadas COS7 (con varios ligandos relacionados con TNF) para determinar si DNA101848 es un receptor para EDA-A2.

40 Las figuras 12A-12D muestran los resultados de un ensayo in situ de células COS7 (transfectadas con DNA101848 o vector vacío). Los resultados mostraron que AP-EDA-A2, pero no AP-TNF-alfa o AP-TALL-1, se unió a las células transfectadas con DNA101848.

La figura 13 muestra los resultados de un ensayo de transferencia Western para determinar si las formas etiquetadas con Flag d EDA-A2 se unen específicamente a DNA101848.

45 Las figuras 14A-14B ilustran los resultados de los ensayos de DNA101848 y EDA-A2 para determinar la activación de NF-KB.

La figuras 15A-15B ilustra los resultados de los ensayos de transferencia Western que muestran los efectos de DNA101848 y EDA-A2 en la activación de NF-KB.

50 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

55 **[0041]** El término "Polipéptido DNA98853" cuando se utiliza en el presente documento comprende el polipéptido DNA98853 de secuencia nativa y variantes del polipéptido DNA98853 (que se definen posteriormente en la presente invención). Los polipéptidos DNA98853 se pueden aislar de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos.

60 **[0042]** Un "polipéptido DNA98853 de secuencias nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido DNA98853 derivado de la naturaleza. Dicho polipéptido DNA98853 de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o se puede producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido DNA98853 de secuencia nativa" comprende específicamente formas truncadas o secretadas naturales de un polipéptido DNA98853 (por ejemplo, formas solubles que contienen, por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y variantes alélicas naturales del polipéptido DNA98853. En una realización de la invención, el polipéptido DNA98853 de secuencia

nativa es un polipéptido DNA98853 de secuencia nativa maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 299 de la figura 2 (SEQ ID NO:3). En otra realización de la invención, el polipéptido DNA98853 de secuencia nativa es una secuencia del dominio extracelular de la polipéptido DNA98853 de longitud completa, en la que el posible dominio transmembrana del polipéptido DNA98853 de longitud completa de ejemplo, incluye los aminoácidos 137-158 de la secuencia mostrada en la figura 2 (SEQ ID No: 3). De este modo, realizaciones adicionales de la presente invención están dirigidas a polipéptidos que comprenden los aminoácidos 1-136 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 (SEQ ID NO:3). Opcionalmente, el polipéptido DNA98853 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por la inserción de ADNc del vector DNA98853 depositado el 6 de abril de 1999 como ATCC 20306.

[0043] El “dominio extracelular del polipéptido DNA98853” o “ECD del polipéptido DNA98853” se refiere a una forma de DNA98853 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmico del polipéptido DNA98853. Habitualmente, el ECD del polipéptido DNA98853 tendrá menos de un 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplásmico y, preferiblemente, tendrá menos de un 0,5% de dichos dominios. Opcionalmente, el ECD del polipéptido DNA98853 comprenderá los residuos de aminoácidos 1 a 136 de la figura 2 (SEQ ID No: 3). Se incluyen variantes por delección o fragmentos de ECD o de longitud completa en que uno o más aminoácidos se eliminan del extremo N o C terminal. Preferiblemente, dichas variantes por delección o fragmentos poseen una actividad deseada, tal como se describe aquí. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para el polipéptido DNA98853 de la presente invención se identifica según el criterio utilizado de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero probablemente por no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio identificado inicialmente. Por consiguiente, el ECD del polipéptido DNA98853 puede comprender opcionalmente los aminoácidos 1 a X de la figura 2 (SEQ ID NO:3), en la que X es cualquiera de los residuos de aminoácidos 131 a 141 de la figura 2 (SEQ ID NO:3).

[0044] “Variante del polipéptido DNA98853” significa un polipéptido DNA98853, tal como se define a continuación, que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido DNA98853 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la figura 2 (SEQ ID No: 3) para un polipéptido DNA98853 humano de secuencia nativa de longitud completa o una secuencia ECD del polipéptido DNA98853. Entre dichas variantes del polipéptido DNA98853 se incluyen, por ejemplo, polipéptidos DNA98853 en los que se añaden, o se eliminan, uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de la figura 2 (SEQ ID No: 3). Normalmente, una variante del polipéptido DNA98853 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, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la figura 2 (SEQ ID No: 3).

[0045] El término “Polipéptido DNA101848” cuando se utiliza en el presente documento comprende el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa y variantes del polipéptido DNA101848 (que se definen posteriormente en la presente invención). Los polipéptidos DNA101848 se pueden aislar de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos.

[0046] Un “polipéptido DNA101848 de secuencias nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido DNA101848 derivado de la naturaleza. Dicho polipéptido DNA101848 de secuencia nativa se puede aislar de la naturaleza o se puede producir mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido DNA101848 de secuencia nativa” comprende específicamente formas truncadas o secretadas naturales de un polipéptido DNA101848 (por ejemplo, formas solubles que contienen, por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas) y variantes alélicas naturales del polipéptido DNA101848. En una realización de la invención, el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa es un polipéptido DNA101848 de secuencia nativa maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 1 a 297 de la figura 4 (SEQ ID NO:6). En otra realización de la invención, el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa es una secuencia del dominio extracelular de la polipéptido DNA101848 de longitud completa, en la que el posible dominio transmembrana del polipéptido DNA98853 de longitud completa, incluye los aminoácidos 137-158 de la secuencia mostrada en la figura 4 (SEQ ID No: 6). De este modo, realizaciones adicionales de la presente invención están dirigidas a polipéptidos que comprenden los aminoácidos 1-136 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 4 (SEQ ID NO:6). Opcionalmente, el polipéptido DNA101848 se obtiene o es obtenible mediante la expresión del polipéptido codificado por la inserción de ADNc del vector DNA101848 depositado el 6 de abril de 1999 como ATCC 203907.

[0047] El “dominio extracelular del polipéptido DNA101848” o “ECD del polipéptido DNA101848” se refiere a una forma del polipéptido DNA101848 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmico del polipéptido DNA101848. Habitualmente, el ECD del polipéptido DNA101848 tendrá menos de un 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplásmico y, preferiblemente, tendrá menos de un 0,5% de dichos dominios. Opcionalmente, el ECD de polipéptido DNA101848 comprenderá los residuos de aminoácidos 1 a 136 de la figura 4

(SEC ID No: 6). Se incluyen las variantes por delección o fragmentos de la longitud completa o ECD en que uno o más aminoácidos se eliminan del extremo N o C-terminal. Preferiblemente, dichas variantes por delección o fragmentos poseen una actividad deseada, tal como la descrita aquí. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para el polipéptido DNA101848 de la presente invención se identifica según el criterio utilizado de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana puede variar, pero probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio identificado inicialmente. Por consiguiente, el ECD del polipéptido DNA101848 puede comprender opcionalmente los aminoácidos 1 a X de la figura 4 (SEQ ID NO:6), en la que X es cualquiera de los residuos de aminoácidos 131 a 141 de la figura 4 (SEQ ID NO:6).

[0048] "Variante del polipéptido DNA101848" significa un polipéptido DNA101848, tal como se define a continuación, que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el polipéptido DNA101848 que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la figura 4 (SEC ID No: 6) para un polipéptido DNA101848 humano de secuencia nativa de longitud completa o una secuencia ECD del polipéptido DNA101848. Entre dichas variantes del polipéptido DNA101848 se incluyen, por ejemplo, polipéptidos DNA101848 en los que se añaden, o se eliminan, uno o más residuos de aminoácidos en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de la figura 4 (SEC ID No: 6). Normalmente, una variante del polipéptido DNA98853 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, más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 95% de identidad en la secuencia de aminoácidos y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de la figura 4 (SEC ID No: 6).

[0049] El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de aminoácidos de polipéptido identificadas en este documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en, por ejemplo, una secuencia del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848, tras alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Los métodos para realizar la alineación de secuencias y determinar la identidad de secuencias con conocidos para el experto en la materia, se pueden realizar sin una gran experimentación y se pueden obtener cálculos de los valores de identidad con precisión. El alineamiento con el fin de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas formas que están dentro de las habilidades de la técnica, por ejemplo, utilizando el software informático disponible, tal como software ALIGN o Megalign (DNASTAR), WU-BLAST-2 [Altschul et al., Meth. Enzym., 266:460-480 (1996)], y ALIGN-2 [propiedad de Genentech, Inc., y solicitada en la U.S. Copyright Office el 10 de diciembre de 1991]. Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para la medición de la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la máxima alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Opcionalmente se puede realizar la alineación utilizando los parámetros por defecto en el programa informático

[0050] El término "epítipo etiquetado o marcado" cuando se usa en este documento, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un a polipéptido DNA98853 o un polipéptido DNA101848, o una secuencia de dominio de los mismos, fusionado con un "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene suficientes residuos como para proporcionar un epítipo frente al que puede obtenerse un anticuerpo, o que se pueda identificar por algún otro agente, aunque también es suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848. El polipéptido etiqueta preferiblemente también es suficientemente exclusivo como para que el anticuerpo no presente una reacción cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados generalmente tienen al menos seis residuos de aminoácido y, normalmente, entre aproximadamente 8 y aproximadamente 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 residuos).

[0051] "Aislado" cuando se usa para describir los diversos polipéptidos descritos en este documento, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que normalmente interferirían con los usos diagnóstico o terapéutico del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En las realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) a un nivel suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N-terminal o internos usando un secuenciador de copa giratoria, (2) hasta homogeneidad mediante PAGE-SDS en condiciones reductoras y no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferiblemente, con plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que no se presentará al menos un componente del ambiente natural del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848. Sin embargo, generalmente, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

[0052] Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853. Una molécula

de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 aislada es diferente de la forma o disposición en que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido DNA98853 aisladas se diferencian de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 tal como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 aislada incluye moléculas de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido DNA98853 donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0053] Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848 "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848 aislada es diferente de la forma o disposición en que se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido DNA101848 aisladas se diferencian de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848 tal como existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848 aislada incluye moléculas de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848 contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido DNA101848 donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0054] "EDA-A2" o "ligando de EDA-A2" se refieren a la molécula relacionada con TNF descrita, por ejemplo, por Bayes et al., Human Molecular Genetics, 7:1661-1669 (1998). Los términos "EDA-A2" o "polipéptido EDA-A2", cuando se utilizan aquí, comprenden "polipéptidos EDA-A2 de secuencia nativa" y "variantes de EDA-A2". "EDA-A2" es la designación dada a aquellos polipéptidos que son codificados por las moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia de polinucleótido mostrada en Bayes et al., supra y variantes de la misma, moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia, y variantes de la misma, así como fragmentos de los anteriores que tienen la actividad biológica (preferiblemente, la capacidad de unirse a los receptores DNA101848 o DNA98835) de EDA-A2 de secuencia nativa descrito en Bayes et al., supra. Las variantes de EDA-A2 biológicamente activas tendrán preferiblemente por lo menos el 80%, más preferiblemente por lo menos el 90%, e incluso más preferiblemente por lo menos el 95% de la identidad de la secuencia de aminoácidos con el polipéptido EDA-A2 de secuencia nativa descrito por Bayes et al., supra. Un polipéptido EDA-A2 de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido EDA-A2 correspondiente derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos EDA-A2 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o se pueden producir mediante medios recombinantes y/o sintéticos. El término "polipéptido EDA-A2 de secuencia nativa" comprende específicamente formas truncadas o secretadas naturales (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativos) y variantes alélicas naturales del polipéptido. Los solicitantes encontraron que la forma EDA-A1 del ligando descrito en Bayes et al., supra, no se unía a la construcción DNA101848-hFc de los solicitantes (la construcción se describe en los ejemplos siguientes), y por tanto, se cree que esa forma EDA-A1 particular del ligando puede no ser una variante biológicamente activa para los objetivos de esta definición.

[0055] 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 procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0056] 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 los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

[0057] El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales anti-polipéptido DNA98853 individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), anticuerpos monoclonales anti-polipéptido DNA101848 individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 con especificidad poliepitópica y composiciones de anticuerpos anti-polipéptido DNA101848 con especificidad poliepitópica. El término "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza aquí, 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.

[0058] "Activo" o "actividad" para los objetivos del presente documento se refiere a una forma o formas del polipéptido DNA98853 que mantienen las actividades biológicas y/o inmunológicas del polipéptido DNA98853 nativo o natural y a una forma o formas del polipéptido DNA101848 que mantienen las actividades biológicas y/o inmunológicas del polipéptido DNA101848 nativo o natural. Dichas actividades incluyen, por ejemplo, la capacidad de modular (ya sea de forma agonista o antagonista) la apoptosis, las respuestas proinflamatorias o autoinmunes en células de mamífero, así como la capacidad de unirse al ligando EDA-A2. La actividad agonista incluirá la capacidad de estimular o aumentar una actividad, mientras que la actividad antagonista incluirá la capacidad de bloquear, suprimir o neutralizar una actividad.

[0059] Tal como se utiliza aquí, el término "inmunoadhesina", designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden la fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir es "heteróloga"), y de una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una secuencia contigua de aminoácidos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluidos IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0060] El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe, o neutraliza una o más actividades biológicas del polipéptido EDA-A2, in vitro, in situ, o in vivo. Entre los ejemplos de dichas actividades biológicas de EDA-A2 se incluyen la unión de DNA101848 o DNA98853, y la activación de NF-KB, así como las descritas adicionalmente en la literatura.

[0061] El término "antagonista de EDA-A2" se refiere a cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de EDA-A2 e incluye, pero sin limitación, formas solubles de los receptores DNA101848 o DNA98853, tal como una secuencia de dominio extracelular de DNA101848 o DNA98853, inmunoadhesinas de los receptores DNA101848 o DNA98853, proteínas de fusión de los receptores DNA101848 o DNA98853, formas modificadas covalentemente de los receptores DNA101848 o DNA98853, variantes de DNA101848 o DNA98853, y anticuerpos de los receptores DNA101848 o DNA98853. Para determinar si una molécula antagonista de EDA-A2 parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de EDA-A2, se pueden realizar ensayos para valorar el efecto o efectos de la molécula antagonista en, por ejemplo, la unión de EDA-A2 a DNA101848 o DNA98853, o la activación de NF-KB por el ligando respectivo. Dichos ensayos se pueden realizar en formatos de ensayo in vitro o in vivo, por ejemplo, en células transfectadas que expresan DNA101848. Preferiblemente, el antagonista de EDA-A2 utilizado en los métodos descritos en el presente documento serán capaces de bloquear o neutralizar por lo menos un tipo de actividad de EDA-A2, que se puede determinar opcionalmente en ensayos tales como los descritos en el presente documento. Opcionalmente, un antagonista de EDA-A2 será capaz de reducir o inhibir la unión de EDA-A2 a DNA101848 o DNA98853 en por lo menos el 50%, preferiblemente por lo menos el 90%, más preferiblemente por lo menos el 99%, y lo más preferiblemente en un 100%, en comparación con una molécula de control negativa, en un ensayo de unión, tal como se describe en los ejemplos.

[0062] Los términos "tratar", "tratamiento" y "terapia" tal como se utiliza aquí se refieren a terapia curativa, terapia profiláctica y terapia preventiva.

[0063] Los términos "apoptosis" y "actividad apoptótica" se utilizan en un sentido amplio y se refieren a la forma ordenada o controlada de la muerte celular en mamíferos que está acompañada habitualmente por uno o más cambios celulares característicos, incluyendo la condensación del citoplasma, pérdida de microvellosidades en la membrana plasmática, segmentación del núcleo, degradación del ADN cromosómico o pérdida de la función mitocondrial. Esta actividad se puede determinar y medir, por ejemplo, mediante ensayos de viabilidad celular, análisis FACS o electroforesis de ADN, todos ellos conocidos en la técnica.

[0064] Los términos "cáncer", "canceroso" o "maligno" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluye, pero sin limitación, carcinoma, que incluye adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de estos cánceres son cáncer de célula escamosa, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y no Hodgkin, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer de cuello de útero, cáncer de ovario, cáncer de hígado, tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón, tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de esófago y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello.

[0065] El término "enfermedad relacionada con el sistema inmunitario" significa una enfermedad en que un componente del sistema inmunitario de un mamífero causa, media o en cualquier caso contribuye a la morbilidad en el mamífero. También se incluyen enfermedades en que la estimulación o la intervención de la respuesta inmunitaria

presenta un efecto de mejora en la progresión de la enfermedad. Se incluyen en este término enfermedades autoinmunes, enfermedades inflamatorias mediadas por el sistema inmunitario, enfermedades inflamatorias no mediadas por el sistema inmunitario, enfermedades infecciosas y enfermedades inmunodeficientes. Ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias, algunas de las cuales mediadas por células T o el sistema inmunitario, que pueden tratarse según la invención incluyen el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), el síndrome de Sjogren, vasculitis, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmunitario), tiroiditis (enfermedad de Graves, la tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmunitario (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico, tales como la esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares, tales como la hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis activa crónica autoinmune, cirrosis biliar primaria, la hepatitis granulomatosa, y la colangitis esclerosante, enfermedades pulmonares inflamatorias y fibróticas, tales como la enfermedad inflamatoria del intestino (colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten, y la enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas por el sistema inmunitario, incluyendo las enfermedades ampollas de la piel, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como el asma, la rinitis alérgica, la dermatitis atópica, hipersensibilidad a la comida y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y la neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes, incluyendo el rechazo del injerto y enfermedad del injerto contra el huésped. Las enfermedades infecciosas incluyen el SIDA (infección por VIH), la hepatitis A, B, C, D, y E, infecciones bacterianas, infecciones por hongos, infecciones por protozoos y las infecciones parasitarias.

[0066] "Enfermedad autoinmune" se utiliza en el presente documento en un sentido general amplio para referirse a trastornos o condiciones en mamíferos en que la destrucción de tejidos normal o sano aparece a partir de las respuestas inmunes humorales o celulares del mamífero individuo a sus propios constituyentes del tejido. Entre los ejemplos se incluyen, pero sin limitación, lupus eritematoso, tiroiditis, artritis reumatoide, psoriasis, esclerosis múltiple, diabetes autoinmune y enfermedad inflamatoria intestinal (IBS).

[0067] El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa 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 toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de los mismos.

[0068] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de una enfermedad. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, arabinósido de citosina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfan, cisoxina, taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ), y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Rnace), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalan, CPT-11, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomicina, aminopterina, dactinomicina, mitomicinas, esperamicinas (véase la Patente de Estados Unidos No. 4.675.187), melfalan y otras mostazas de nitrógeno relacionadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores, tales como tamoxifeno y onapristona.

[0069] 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 *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan dichos genes en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen 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 vincas (vincristina y vinblastina), taxol, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13.

[0070] El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas 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; prorrelaxina; 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; 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-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 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.

[0071] El término “mamífero”, tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo un humano, vacas, caballos, perros y gatos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un humano.

II. Composiciones y métodos de la invención

A. Polipéptido DNA98853 de longitud completa

[0072] La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptido DNA98853. En particular, los solicitantes han identificado y aislado el ADNc que codifica un polipéptido DNA98853, tal y como se describe con mayor detalle en los posteriores ejemplos. Utilizando los programas informáticos de alineación de secuencias BLAST y FastA (con parámetros por defecto fijados), los solicitantes hallaron que partes del polipéptido DNA98853 tienen cierta identidad de secuencia con varios miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. Por consiguiente, actualmente se cree que el polipéptido DNA98853 descrito en la presente solicitud es un elemento recientemente identificado de la familia de polipéptidos de receptores del factor de necrosis tumoral.

[0073] La activación de NF-KB por el polipéptido DNA98853 sugiere un papel para esta proteína en la modulación de la apoptosis, las respuestas proinflamatorias y autoinmunes en células de mamífero. Se contempla, por ejemplo, que se pueda utilizar una molécula de inmuno adhesina del polipéptido DNA98853 (por ejemplo, una construcción de ECD de polipéptido DNA98853-Ig) de una manera antagónica para bloquear la activación de NF-KB.

B. Polipéptido DNA101848 de longitud completa

[0074] La presente invención se refiere a secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptido DNA101848. En particular, los solicitantes han identificado y aislado el ADNc que codifica un polipéptido DNA101848, tal y como se describe con mayor detalle en los posteriores ejemplos. Utilizando los programas informáticos de alineación de secuencias BLAST y FastA (con parámetros por defecto fijados), los solicitantes hallaron que partes del polipéptido DNA101848 tienen cierta identidad de secuencia con varios miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. Por consiguiente, actualmente se cree que el polipéptido DNA101848 descrito en la presente solicitud es un elemento recientemente identificado de la familia de polipéptidos de receptores del factor de necrosis tumoral.

[0075] Se observó la expresión de ARNm del polipéptido DNA101848 en varias células y tejidos. Tal como se muestra en la figura 7, se detectaron niveles de expresión relativamente elevados del ARNm del polipéptido DNA101848 en dos líneas celulares de tumor humano, carcinoma de pulmón A549 y melanoma G361. También se hallaron niveles de expresión relativamente débiles en tejidos de próstata, testículos, ovario, tiroides, médula espinal y glándulas adrenales. De manera destacada, existía un transcrito más pequeño con un nivel de expresión relativamente elevado en el tejido de estómago.

[0076] La activación de NF-KB por el polipéptido DNA101848 sugiere un papel para esta proteína en la modulación de la apoptosis, las respuestas proinflamatorias y autoinmunes en células de mamífero. Se contempla, por ejemplo, que se pueda utilizar una molécula de inmuno adhesina del polipéptido DNA101848 (por ejemplo, una construcción de ECD de polipéptido DNA101848-Ig) de una manera antagónica para bloquear la activación de NF-KB.

[0077] Tal como se describe en el presente documento, los solicitantes han encontrado que EDA-A2 actúa como un ligando para el receptor de DNA101848. Por consiguiente, se describen varios métodos para utilizar antagonistas de ADA-A2. Dado el porcentaje relativamente elevado de identidad de secuencia entre los receptores de DNA101848 y DNA98853 (particularmente la identidad de secuencia completa (100%) en sus respectivas regiones de ECD), se cree que se pueden utilizar varias construcciones de DNA98853 como antagonistas de EDA-A2 de forma similar a las construcciones de DNA101848 antagónicas descritas en el presente documento.

C. Variantes de los polipéptidos DNA98853 y DNA101848

[0078] Además del polipéptido DNA98853 de secuencia nativa y de longitud completa aquí descrito, se contempla que se pueden preparar variantes del polipéptido DNA98853. Las variantes del polipéptido DNA98853 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante del polipéptido DNA98853 o mediante la síntesis del polipéptido DNA98853 deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del polipéptido DNA98853, 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.

[0079] Las variaciones en el polipéptido DNA98853 de secuencia nativa y longitud completa o en varios dominios del polipéptido DNA98853 aquí descritos 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 No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido DNA98853 que da lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido DNA98853 en comparación con el polipéptido DNA98853 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 polipéptido DNA98853.

[0080] De manera similar, se pueden preparar variantes de DNA101848. Las variantes del polipéptido DNA101848 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante del polipéptido DNA101848 o mediante la síntesis del polipéptido DNA101848 deseado. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del polipéptido DNA101848, 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.

[0081] Las variaciones en el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa y longitud completa o en varios dominios del polipéptido DNA 101848 aquí descritos 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 No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido DNA101848 que da lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido DNA101848 en comparación con el polipéptido DNA101848 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 polipéptido DNA101848.

[0082] Para 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 polipéptido con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tienen una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y analizando en las variantes resultantes de la actividad en cualquiera de los ensayos in vitro descritos en los ejemplos siguientes.

[0083] 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 fabricar el ADN variante que codifica el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 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.

[0084] El análisis de aminoácidos por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos relativamente pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido de 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.

D. Modificaciones del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848

[0085] Se describen las modificaciones covalentes de los polipéptidos DNA98853 de los polipéptidos DNA101848. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de los residuos de aminoácidos marcados de un polipéptido

DNA98853 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N o C-terminales de un polipéptido DNA98853. El polipéptido DNA101848 se puede modificar de manera similar en los residuos de aminoácidos marcados que tienen cadenas laterales seleccionadas o en sus residuos N o C-terminales.

[0086] La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular el polipéptido DNA98853 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-polipéptido DNA98853, y viceversa. Dichos agentes bifuncionales también son útiles para reticular el polipéptido DNA101848 con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-polipéptido DNA101848, y viceversa. Entre los agentes entrecruzadores 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 glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, 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 DNA98853 o el polipéptido DNA101848 incluido en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo de cualquiera de los polipéptidos. 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 el polipéptido DNA98853 de secuencia nativa, la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa, la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido DNA98853 de secuencia nativa y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa.

[0089] La adición de sitios de glicosilación a los polipéptidos DNA98853 o polipéptidos DNA101848 se puede realizar alterando la secuencia de aminoácidos de los mismos. 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 polipéptido DNA98853 de secuencia nativa, o uno o más residuos de serina o treonina en el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del polipéptido DNA98853 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido DNA98853 en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados. De manera similar, la secuencia de aminoácidos del polipéptido DNA101848 puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el polipéptido DNA98853 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 DNA98853 o el polipéptido DNA101848 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.*, 259-306 (1981).

[0091] La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 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 química 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 en los polipéptidos 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 del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 comprende la unión del polipéptido a uno del conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), 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] Los polipéptidos DNA98853 también se pueden modificar de manera que formen moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido DNA98853 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos. En un ejemplo, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un polipéptido DNA98853 con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo etiqueta se coloca generalmente en los extremos amino terminal o carboxi terminal del polipéptido DNA98853. La presencia de dichas formas etiquetadas con epítipo de un polipéptido DNA98853 se puede detectar utilizando un anticuerpo

contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el polipéptido DNA98853 se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. En un ejemplo alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido DNA98853 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula de IgG. Opcionalmente, la molécula quimérica comprenderá una secuencia de ECD del polipéptido DNA98853 a una región Fc de una molécula de IgG.

[0094] Las moléculas de inmunoadhesina también se contemplan para su uso en los métodos del presente documento. Las inmunoadhesinas receptoras pueden comprender varias formas de DNA101848 o DNA98853, tales como el polipéptido de longitud completa, así como formas solubles del receptor que comprenden una secuencia del dominio extracelular (ECD) o un fragmento de la secuencia de ECD. En un ejemplo, la molécula puede comprender una fusión del receptor DNA101848 o DNA98853 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la inmunoadhesina, dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) del polipéptido receptor en lugar de por lo menos una región variable en una molécula de Ig. En un ejemplo particularmente preferido, la fusión de la inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de Estados Unidos No. 5,428,130 concedida el 27 de junio de 1995 y Chamow et al., TIBTECH, 14:52-60 (1996).

[0095] El diseño de inmunoadhesina más simple y sencillo combina el dominio o dominios de unión de la adhesina (por ejemplo, el dominio extracelular (ECD) de un receptor) con Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Normalmente, cuando se preparan las inmunoadhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará por el extremo C terminal al ácido nucleico que codifica el extremo N terminal de una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina, aunque las fusiones N-terminales también son posibles.

[0096] Habitualmente, en dichas fusiones el polipéptido quimérico codificado mantendrá por lo menos los dominios bisagra, dominios C_{H2} y C_{H3} funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. Las fusiones también se realizan al extremo C terminal de la parte Fc de una región constante, o al N-terminal inmediato al C_{H1} de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se realiza la fusión no es crítico; se conocen bien sitios concretos y se pueden seleccionar con el fin de optimizar la actividad biológica, la secreción, o características de unión de la inmunoadhesina.

[0097] En una realización preferida, la secuencia de adhesina se fusiona al extremo N-terminal del dominio Fc de la inmunoglobulina G₁ (IgG₁). Es posible fusionar la región constante de cadena pesada completa con la secuencia de adhesina. Sin embargo, más preferiblemente, en la fusión se utiliza una secuencia que empieza en la región bisagra justo corriente arriba del sitio de división por papaína que define químicamente Fc de IgG (es decir, el residuo 216, tomando como el primer residuo de la región constante de cadena pesada el 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de aminoácidos de la adhesina se fusiona a (a) la región bisagra y C_{H2} y C_{H3} o (b) los dominios C_{H1}, bisagra, C_{H2} y C_{H3}, de una cadena pesada de IgG.

[0098] Para inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterodímeros heterotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen IgG, IgD e IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de peso molecular más elevado; IgM existe generalmente como un pentámero de cuatro unidades básicas que se mantienen juntas mediante enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en el suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser la misma o diferente.

[0099] A continuación, se muestran esquemáticamente varias inmunoadhesinas ensambladas de ejemplo dentro del alcance de la presente invención:

- (a) A_L-A_L;
- (b) A_H-(A_H, A_L-A_H, A_L-V_HC_H, o V_LC_L-A_H);
- (c) A_LA_H-(A_L-A_H, A_L-V_HC_H, V_LC_L-A_H, o V_LC_LV_HC_H);
- (d) A_L-V_HC_H-(A_H, o A_L-V_HC_H, o V_LC_L-A_H);
- (e) V_LC_L-A_H-(A_L-V_HC_H, o V_LC_L-A_H); y
- (f) (A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)₂,

en las que cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesina iguales o diferentes;

V_L es un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina;

V_H es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina;

C_L es un dominio constante de cadena ligera de inmunoglobulina;

C_H es un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero superior a 1;

Y designa el residuo de un agente de reticulación covalente.

[0100] Por brevedad, las estructuras anteriores sólo muestran características claves; no indican los dominios de unión (J) u otros dominios de las inmunoglobulinas, ni se muestran los enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando se necesitan dichos dominios para la actividad de unión, se interpretará que están presentes en las posiciones habituales que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

[0101] Alternativamente, las secuencias de adhesina se pueden insertar entre las secuencias de cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulina, de manera que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena pesada quimérica. En esta realización, las secuencias de adhesina se fusionan al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, entre el dominio bisagra y el dominio C_H2, o entre los dominios C_H2 y C_H3. Se han descrito construcciones similares por Hoogenboom et al., Mol. Immunol. 28: 1027-1037 (1991).

[0102] Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no es necesaria en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina podría estar presente asociada covalentemente a un polipéptido de fusión de adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina, o directamente fusionada a la adhesina. En el primer caso, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se coexpresa habitualmente con el ADN que codifica la proteína de fusión adhesina-cadena pesada de inmunoglobulina. Tras la secreción, el híbrido de cadena pesada y cadena ligera se asociará covalentemente para proporcionar una estructura de tipo inmunoglobulina que comprende dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina unidas por enlaces disulfuro. Lo procedimientos adecuados para la preparación de dichas estructuras se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567 concedida el 28 de marzo de 1989.

[0103] Las inmunoadhesinas se construyen de manera más conveniente mediante la fusión de la secuencia de ADNc que codifica la parte de adhesina en el marco de lectura a una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también se puede utilizar la fusión a fragmentos genómicos de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Aruffo et al., Cell 61: 1303-1313 (1990); y Stamenkovic et al., Cell 66: 1133-1144 (1991)). El último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Los ADNcs que codifican las regiones constantes de cadena pesada de IgG se pueden aislar en base a secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos de bazo y sangre periférica, mediante técnicas de hibridación o reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNcs que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector plasmídico que dirige la expresión eficaz en las células huésped elegidas.

[0104] Los polipéptidos DNA101848 también se pueden modificar de forma que formen moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido DNA101848 fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo. En un ejemplo, dicha molécula quimérica comprende una fusión de un polipéptido DNA101848 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 polipéptido DNA101848. La presencia de dichas formas epítipo etiquetadas de un polipéptido DNA101848 se puede detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítipo etiqueta permite que el polipéptido DNA101848 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 un ejemplo alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido DNA101848 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. Opcionalmente, la molécula quimérica comprenderá una secuencia de ECD del polipéptido DNA101848 fusionada a una región Fc de una molécula de IgG.

[0105] 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 12CA5 [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 la 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)].

[0106] El polipéptido DNA98853 también se puede modificar para formar una molécula quimérica que comprende un polipéptido DNA98853 fusionado a un cremallera de leucinas. De manera similar, el polipéptido DNA101848 también se puede modificar para formar una molécula quimérica que comprende un polipéptido DNA101848 fusionado a un cremallera de leucinas. En la técnica se han descrito varios polipéptidos de cremalleras de leucinas. Véase, por ejemplo, Landschulz et al., Science 240:1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe et al., FEBS Letters 344:1991 (1994); Maniatis et al., Nature 341:24 (1989). Se cree que la utilización de una cremallera de leucinas fusionada a un polipéptido DNA98853 puede ser deseable para ayudar en la dimerización o la trimerización de un polipéptido DNA98853 soluble en solución, y que puede ser deseable una cremallera de leucinas fusionada a un polipéptido

DNA101848 para ayudar en la dimerización o la trimerización de un polipéptido DNA101848 soluble en solución. Los expertos en la materia entenderán que la cremallera de leucinas se pueden fusionar en el extremo N o C-terminal de la molécula de los polipéptidos DNA98853 o DNA101848.

5 E. Preparación de polipéptidos

1. Preparación del polipéptido DNA98853

[0107] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de un polipéptido, tal como el polipéptido DNA98853, mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos para preparar los polipéptidos DNA98853 que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido DNA98853, 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 pueden realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, con un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente varias partes de polipéptidos DNA98853 de forma separada y combinarlas utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido DNA98853 de longitud completa.

2. Preparación del polipéptido DNA101848

[0108] La descripción indicada más abajo también se refiere a la producción del polipéptido DNA101848 mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene el ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848. Por supuesto, se contempla que se puedan utilizar métodos alternativos, conocidos en la técnica, para preparar los polipéptidos DNA101848. Por ejemplo, la secuencia del polipéptido DNA101848, o fracciones del mismo, pueden producirse mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida, tal como se describe anteriormente. Se pueden sintetizar químicamente varias partes de los polipéptido DNA101848 por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir un polipéptido DNA101848 completo.

3. Aislamiento de ADN que codifica los polipéptidos DNA98853 o DNA101848

[0109] El ADN que codifica un polipéptido DNA98853 puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de un tejido que se considera que posee el ARNm del polipéptido DNA98853 y que lo expresa en un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN que codifica el polipéptido DNA98853 humano puede ser obtenido adecuadamente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de un tejido humano, tal y como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica el polipéptido DNA98853 puede obtenerse también a partir de una biblioteca genómica o mediante síntesis con oligonucleótidos.

[0110] De manera similar, el ADN que codifica un polipéptido DNA101848 puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de un tejido que se considera que posee el ARNm del polipéptido DNA101848 y que lo expresa en un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN que codifica el polipéptido DNA101848 humano puede ser obtenido adecuadamente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de un tejido humano, tal y como se describe en los Ejemplos. El gen que codifica el polipéptido DNA101848 puede obtenerse también a partir de una biblioteca genómica o mediante síntesis con oligonucleótidos.

[0111] Las bibliotecas pueden ser cribadas con sondas (como anticuerpos contra el polipéptido DNA98853, anticuerpos contra el polipéptido DNA101848 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 de una biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede realizarse utilizando procedimientos estándar, como los descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning: A laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el polipéptido DNA98853 o el gen que codifica el polipéptido DNA101848 consiste en usar la metodología del PCR [Sambrook y col., *supra*: Dieffenbach y col., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0112] Los Ejemplos mostrados más abajo describen técnicas para el cribado de bibliotecas de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de longitud suficiente y suficientemente específicas como para minimizar falsos positivos. Preferiblemente el oligonucleótido se marca de tal forma que tras la hibridación al ADN puede ser detectado en la biblioteca que se está cribando. Los métodos de marcaje son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de marcadores radioactivos como ATP marcado con P³², biotinización o marcaje enzimático. Sambrook y col., *supra* proporcionan condiciones de hibridación, incluyendo una astringencia moderada y alta.

[0113] Las secuencias identificadas en dichos métodos de cribado de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bancos de datos públicos como el GenBank u otros bancos de datos de secuencias privados. La identidad de la secuencia (tanto a nivel de aminoácidos como de nucleótidos) dentro de regiones definidas o a lo largo de la totalidad de la secuencia puede determinarse mediante el

[0114] El ácido nucleico que tiene una secuencia codificante de proteína se puede obtener mediante el cribado de bibliotecas de ADNc o genómicas seleccionadas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en el presente documento por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos de extensión con cebadores convencionales tal como se describe en Sambrook et al., *supra*, para detectar precursores e intermedios de procesamiento de ARNm que no se pueden transcribir de forma inversa en ADNc.

4. Selección y transformación de células huéspedes

[0115] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos aquí para la producción del polipéptido DNA98853. Alternativamente, las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos aquí para la producción del polipéptido DNA101848. Las células huésped se cultivan en medio nutriente convencional modificado según más apropiado para la inducción de promotores, la selección de transformantes, o la amplificación de los genes que codifican para las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionados por el experto en la materia sin gran experimentación. En general, los principios, protocolos, y técnicas prácticas, para maximizar la productividad de las células pueden encontrarse en *Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach*, M Butler, ed (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., *supra*

[0116] Los métodos de transfección son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, el método del CaPO_4 y la electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio empleando cloruro cálcico, tal como se describe en Sambrook y col., *supra*, o la electroporación, generalmente se usan en procariotas u otras células que contienen barreras importantes como las paredes celulares. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células de plantas, como se describe por Shaw y col., *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de Junio de 1989. Para células mamíferas sin dichas paredes celulares, puede emplearse el método de la precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de las transformaciones de sistemas de célula huésped de mamífero en la patente U.S. 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo habitualmente según el método de Van Solingen y col., *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76:3829 (1979). Sin embargo, pueden usarse también otros métodos para introducir DNA en las células, tales como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policones, por ejemplo, polibrene o poliornitina. Para diversas técnicas de transformación de células de mamífero, véase Keown y col., *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., *Nature*, 336:348-352 (1988).

[0117] Entre las células huésped adecuadas para clonar o expresar el DNA en vectores del presente documento se incluyen procariotas, levaduras o células eucariotas superiores. Entre los procariotas apropiados se incluyen, pero sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceas como *E. coli*. Se encuentran disponibles públicamente varias cepas de *E. coli* tales como la cepa *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31, 446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); la cepa *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53,635).

[0118] Además de procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de expresión o clonación adecuados para vectores que codifican el polipéptido DNA98853 o vectores que codifican el polipéptido DNA101848. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior utilizado habitualmente.

[0119] Las células huésped adecuadas para la expresión de polipéptido DNA98853 glicosilado o polipéptido DNA101848 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células de plantas. Entre los ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero se incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO) y las células COS. Ejemplos más específicos incluyen la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o células 293 subclonadas para crecer en cultivo en suspensión, Graham y col., *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977); células de ovario de hámster chino deficientes en DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células humanas de hígado (Hep G2, HB 8065); y células de tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped adecuada se toma según el criterio del experto en la materia.

5. Selección y utilización de un vector replicable

[0120] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica el polipéptido DNA98853 deseado o que codifica el polipéptido DNA101848 deseado 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 de una secuencia señal si secreta la secuencia, 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.

[0121] El polipéptido DNA98853 deseado o el polipéptido DNA101848 deseado se pueden 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 específico 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 que codifica el polipéptido DNA98853 que se inserta en el vector o puede ser parte del ADN que codifica el polipéptido DNA101848 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líder 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 de factor alfa (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o la 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 secuencias líderes virales secretoras.

[0122] 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 2 μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

[0123] 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, metotrezato 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*.

[0124] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquellos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 o el ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848, 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)].

[0125] Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 o la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848. El promotor dirige la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales son conocidos. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas 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 promotores 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 el polipéptido DNA98853 o unida operativamente al ADN que codifica el polipéptido DNA101848.

[0126] 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 otros enzimas glucolíticos [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucoisomerasa y glucoquinasa.

[0127] 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.

[0128] La transcripción del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 a partir de los vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del polio, virus de la viruela aviar (Patente Reino Unido 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); mediante 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 célula huésped.

[0129] Se puede incrementar la transcripción por eucariotas superiores de un ADN que codifica el polipéptido DNA98853 o de un ADN que codifica el polipéptido DNA101848 mediante la inserción de una secuencia de potenciador 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. Muchas secuencias de potenciador se conocen actualmente 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 polio 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 del polipéptidos DNA98853, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' del promotor. De manera similar, el potenciador se puede cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del polipéptidos DNA101848, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

[0130] 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 desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN's o ADN's eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el polipéptido DNA98853 o del ARNm que codifica el polipéptido DNA101848.

[0131] 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 polipéptidos DNA98853 y/o polipéptidos DNA101848 en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

6. Detección de la amplificación/expresión génica

[0132] La amplificación y/o expresión génicas pueden medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5.201-5.205 (1980)], transferencia en mancha (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, en base a las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, y dobles cadenas híbridas de ARN-ADN o dobles cadenas de proteína-ADN. A su vez, los anticuerpos pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo en el lugar donde la doble cadena está unida a la superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido a la doble cadena.

[0133] Alternativamente, la expresión génica puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares y el ensayo de cultivo celular o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión de un producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el análisis de fluidos de la muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido DNA98853 de secuencia nativa, contra un polipéptido DNA101848 de secuencia nativa, contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento, contra una secuencia exógena fusionada al ADN que codifica el polipéptido DNA98853 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico, o contra una secuencia exógena fusionada al ADN que codifica el polipéptido DNA101848 y que codifica un epítipo de anticuerpo específico.

7. Purificación de polipéptidos

[0134] Se pueden recuperar formas del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si están unidas a la membrana, pueden liberarse de la membrana utilizando una solución detergente adecuada (por ejemplo Triton-X 100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión de los polipéptidos DNA98853 o DNA101848 se pueden alterar mediante varios medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, alteración mecánica o agentes de lisado celular.

[0135] Se puede desear purificar el polipéptido DNA98853 o Polipéptido DNA101848 a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; 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 polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848. 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 proceso de producción utilizado y el polipéptido DNA98853 o polipéptido DNA101848 concreto producido.

F. Usos para el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848

[0136] Las secuencias de nucleótidos (o sus complementos) que codifican los polipéptidos DNA98853, y las secuencias de nucleótidos o sus complementos que codifican los polipéptidos DNA101848, tienen varias aplicaciones en biología molecular, que incluyen usos como sondas de hibridación, en el mapeo cromosómico y génico y en la generación de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 también será útil para la preparación de los polipéptidos DNA98853 mediante técnicas recombinantes aquí descritas. De manera similar, el ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA101848 también será útil para la preparación de los polipéptidos DNA101848 mediante las técnicas recombinantes aquí descritas.

[0137] La secuencia de nucleótidos de DNA98853 de longitud completa (SEQ ID NO:1) o la secuencia del polipéptido DNA98853 de secuencia nativa de longitud completa (SEQ ID NO:3), o partes de las mismas, se pueden utilizar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el gen del polipéptido DNA98853 de longitud completa o para aislar otros genes (por ejemplo, aquellos que codifican variantes naturales del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA98853 de otra especie) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de nucleótidos del polipéptido DNA98853 descrito en la figura 1 (SEQ ID NO:1). Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivar de la secuencia de nucleótidos de DNA98853 de SEQ ID NO:1 tal como se muestra en la figura 1 o de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de ADN que codifica el polipéptido DNA98853 de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un método de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen del polipéptido DNA98853 utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases.

[0138] De manera similar, la secuencia de nucleótidos de DNA101848 de longitud completa (SEQ ID NO:4) o la secuencia del polipéptido DNA101848 de secuencia nativa de longitud completa (SEQ ID NO:6), o partes de las mismas, se pueden utilizar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el gen del polipéptido DNA101848 de longitud completa o para aislar otros genes (por ejemplo, aquellos que codifican variantes naturales del polipéptido DNA101848 o el polipéptido DNA101848 de otra especie) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de nucleótidos del polipéptido DNA101848 descrito en la figura 4 (SEQ ID NO:6). Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivar de la secuencia de nucleótidos de DNA101848 de SEQ ID NO:4 tal como se muestra en la figura 3 o de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones de ADN que codifica el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un método de cribado comprenderá el aislamiento de la región codificante del gen del polipéptido DNA101848 utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases.

[0139] Las sondas de hibridación se pueden marcar con una variedad de marcadores, que incluyen radionucleótidos, tales como ^{32}P o ^{35}S , o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina, acoplados a la sonda a través de sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen del polipéptido DNA98853 de la presente invención, o complementaria a la del gen del polipéptido DNA101848 de la presente invención, se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar qué miembros de dichas bibliotecas se hibridan a la sonda. Las técnicas de hibridación se describen con más detalle en los ejemplos siguientes.

[0140] Las sondas también se pueden utilizar en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para la identificación de secuencias de polipéptido DNA98853 o secuencias de polipéptido DNA101848 estrechamente relacionadas.

[0141] Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido DNA98853 o un polipéptido DNA101848 también se pueden utilizar para construir sondas de hibridación para el mapeo de los genes que codifican ese polipéptido, y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas aquí se pueden mapear en un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como hibridación in situ, análisis de unión contra marcadores cromosómicos conocidos y el cribado de hibridación con bibliotecas.

[0142] Cuando las secuencias codificantes del polipéptido DNA98853 codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el polipéptido DNA98853 funciona como receptor), el polipéptido DNA98853 se puede utilizar en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. De manera similar, cuando las secuencias codificantes del polipéptido DNA101848 codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el polipéptido DNA101848 funciona como receptor), el polipéptido DNA101848 se puede utilizar en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión.

[0143] Mediante dichos métodos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción de unión del receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión también se pueden utilizar para cribar inhibidores o agonistas peptídicos o de molécula pequeña de la interacción de unión. Además, el polipéptido DNA98853 receptor o el polipéptido DNA101848 receptor se puede utilizar para aislar otros ligandos correlativos. Los ensayos de cribado se pueden diseñar para encontrar compuestos candidatos que mimetizan la actividad biológica de un polipéptido DNA98853 nativo, un polipéptido DNA101848 nativo, un receptor para Polipéptido DNA98853, o un receptor para polipéptido DNA101848. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolas particularmente adecuadas para la identificación de candidatos de fármacos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluían compuestos sintéticos orgánicos o inorgánicos. Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

[0144] Los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido DNA98853, polipéptido DNA101848, o cualquiera de sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, cuyo transgén se introdujo en el animal o un ascendiente del animal en una fase prenatal, por ejemplo, embrionaria. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica el polipéptido DNA98853 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido DNA98853 según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica el polipéptido DNA98853. En otra realización, el ADNc que codifica el polipéptido DNA101848 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido DNA101848 según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica el polipéptido DNA101848.

[0145] Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales, tales como ratones o ratas, se han convertido en tradicionales y se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 4,736,866 y 4,870,009. Habitualmente, se marcarían células particulares para la incorporación de transgenes del polipéptido DNA98853 y/o el polipéptido DNA101848 con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica el polipéptido DNA98853 introducida en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria se pueden utilizar para examinar el efecto de la expresión incrementada de ADN que codifica el polipéptido DNA98853. Alternativamente, Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica el polipéptido DNA101848 introducida en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria se pueden utilizar para examinar el efecto de la expresión incrementada de ADN que codifica el polipéptido DNA101848. Dichos animales se pueden utilizar como animales de prueba para reactivos que se cree que confieren protección frente a, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. Según esta característica de la invención, se trata una invención con el reactivo y una incidencia reducida de la condición patológica, en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una potencial intervención terapéutica para la condición patológica.

[0146] Alternativamente, se pueden utilizar homólogos del polipéptido DNA98853 no humanos para construir un animal "knock out" con polipéptido DNA98853 que presenta un gen defectuoso o alterado que codifica el polipéptido DNA98853 como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido DNA98853 y el ADN genómico alterado que codifica el polipéptido DNA98853 introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica el polipéptido DNA98853 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido DNA98853 según técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica el

polipéptido DNA98853 se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para controlar la integración.

[0147] De manera similar, se pueden utilizar homólogos del polipéptido DNA101848 no humanos para construir un animal "knock out" con polipéptido DNA101848 que presenta un gen defectuoso o alterado que codifica el polipéptido DNA101848 como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido DNA101848 y el ADN genómico alterado que codifica el polipéptido DNA101848 introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica el polipéptido DNA101848 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido DNA101848 según técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica el polipéptido DNA101848 se puede eliminar o sustituir por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede utilizar para controlar la integración.

[0148] Habitualmente, en la construcción de un animal "knock out", se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos 5' y 3') (Véase, 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 madres 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. (Véase, 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 quimeras de agregación. (Véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson ed. (IRL. Oxford, 1987), páginas 113-152). A continuación, un embrión quimérico se puede implantar en un animal criado hembra pseudopreñada adecuado y se produce un embrión para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN recombinado homológamente en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas estándar y utilizarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente. Los animales knock out se pueden caracterizar, por ejemplo, por su capacidad de defenderse contra ciertas condiciones patológicas y por su desarrollo de condiciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848.

[0149] El polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 del presente documento se pueden utilizar según la presente invención mediante la expresión de dichos polipéptidos *in vivo*, a lo que se hace referencia frecuentemente como terapia génica.

[0150] Existen dos estrategias principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente: *in vivo* y *ex vivo*. Para la liberación *in vivo* el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, habitualmente en los sitios en los que se necesita el polipéptido. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 se inyectará en el sitio de síntesis del polipéptido DNA98853, si se conoce, o en el sitio en el que se necesita la actividad biológica del polipéptido DNA98853. Por ejemplo, el ácido nucleico que codifica el polipéptido DNA98853 se inyectará en el sitio de síntesis del polipéptido DNA101848, si se conoce, o en el sitio en el que se necesita la actividad biológica del polipéptido DNA101848. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan al paciente (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.892.538 y 5.283.187).

[0151] Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro*, o transferidas *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen la utilización de liposomas, electroporación, microinyección, transducción, fusión celular, DEAE-dextrano, método de precipitación con fosfato de calcio, etc. la transducción implica la asociación de partículas viables recombinantes (preferiblemente retrovirales) defectuosas en la replicación con un receptor celular, seguido de la introducción de los ácidos nucleicos contenidos por la partícula en la célula. Un vector utilizado normalmente para la liberación *ex vivo* del gen es un retrovirus.

[0152] Entre las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* actualmente preferidas se incluyen la transfección con vectores virales o no virales (tales como adenovirus, lentivirus, virus del Herpes Simplex I, o virus adenoasociados (AAV)) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y Dc-Chol; véase, por ejemplo, Tonkinson *et al.*, *Cancer Investigation*, 14(1): 54-65 (1996)). Los vectores más preferidos para su uso en terapia génica son virus, más preferiblemente adenovirus, AAV, lentivirus, o retrovirus. Un vector viral tal como un vector retroviral incluye por lo menos un promotor/potenciador transcripcional o elemento/s que definen el locus, u otros elementos que controlan la expresión génica mediante otros medios, tales como el empalme alternativo, la exportación de ARN nuclear, o modificación post-traducciona del mensajero. Además, un vector viral tal como un vector retroviral incluye una molécula de ácido nucleico que, cuando se transcribe en presencia de un gen que codifica el polipéptido DNA98853 o de un gen que codifica el polipéptido DNA101848, se une operativamente al mismo y actúa como una secuencia de iniciación de la traducción. Dichas construcciones de vectores también incluye una señal de empaquetamiento, repeticiones terminales largas (LTR) o partes de las mismas, y sitios de unión al cebador de la hebra positivos y negativos apropiados al virus utilizado (si éstos no están presentes en el vector viral). Además, dicho vector incluye habitualmente una secuencia señal para la secreción del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 de

una célula huésped en la que se encuentra. Preferiblemente, la secuencia señal para este objetivo es una secuencia señal de mamífero, más preferiblemente la secuencia señal nativa para el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848. Opcionalmente, la construcción del vector también puede incluir una señal que dirige la poliadenilación, así como uno o más sitios de restricción y una secuencia de terminación de la traducción. A modo de ejemplo, dichos vectores incluirán habitualmente una LTR 5', un sitio de unión a ARNt, una señal de empaquetamiento, un origen de síntesis de ADN en la segunda hebra, y una LTR 3' o una parte de la misma. Se pueden utilizar otros vectores que no son virales, tales como lípidos catiónicos, polilisina y dendrímeros.

[0153] En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácidos nucleicos con un agente que se dirige a las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con endocitosis para dirigir y/o facilitar la captación, por ejemplo, de proteínas de cápside o fragmentos de los mismos trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan la internalización en el ciclo, y proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por WU et al., J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987); y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje de genes y terapia génica actualmente conocidos, véase, Anderson et al., Science, 256: 808-813 (1992). Véase también WO 93/25673 y las referencias citadas en la misma.

[0154] La terapia génica adecuada y procedimientos para fabricar partículas retrovirales y proteínas estructurales se puede encontrar en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5.681.746.

[0155] Los polipéptidos DNA98853 o DNA101848 que poseen actividad biológica, por ejemplo, tal como relacionada con la de los receptores de la muerte de necrosis tumoral conocidos, se pueden utilizar en fines terapéuticos in vivo e in vitro.

[0156] Las composiciones terapéuticas del polipéptidos DNA98853 o el polipéptido DNA101848 se pueden preparar para su almacenamiento mediante la mezcla de la molécula deseada que tiene el grado apropiado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª 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).

[0157] Entre los ejemplos adicionales de dichos portadores se incluyen intercambiadores de iones, albúmina, estearato de albúmina, lecitina, proteínas del suero, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón, tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato potásico, mezclas de glicérido parcial de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrógeno fosfato de disodio, hidrógeno fosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de zinc, sílica coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, y polietilenglicol. Los portadores para formas tóxicas o basados en gel de incluyen polisacáridos tales como carboximetilcelulosa o metilcelulosa sódica, polivinilpirrolidona, poliácridatos, polímeros en bloque de polioxietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y alcoholes de cera de madera. Para todas las administraciones, se utilizan de forma adecuada formas de envasado convencional. Dichas formas incluyen, por ejemplo, microcápsulas, nanocápsulas, liposomas, tiritas, formas de inhalación, pulverizadores nasales, pastillas sublinguales y preparaciones de liberación controlada. Los polipéptidos DNA98853 o DNA101848 se formularán normalmente en dichos vehículos en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml.

[0158] El polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 a utilizar en la administración in vivo debe ser estéril. Esto se realiza fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estéril, antes o después de la liofilización y reconstitución. El polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 se almacenarán habitualmente en forma liofilizada o en solución si se administran sistémicamente. Si están en forma liofilizada, el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 se formulan habitualmente combinados con otros ingredientes para la reconstitución con un diluyente apropiado en el momento de su uso. Un ejemplo de una formulación líquida de un polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 es una solución estéril, clara, incolora no conservada rellena de un vial con una única dosis para inyección subcutánea.

[0159] Las composiciones terapéuticas del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 se colocan en general en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica. Las formulaciones se administran preferiblemente como inyecciones repetidas intravenosa (i.v.), subcutánea (s.c.) o intramuscular (i.m.) o como formulaciones de aerosol adecuadas para la liberación intranasal o intrapulmonar (para la liberación intrapulmonar, véase, por ejemplo, EP 257.956).

[0160] El polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 también se pueden administrar en forma de preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la proteína, 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-hidroxietil-metacrilato) tal como se describe por Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 (1981) y Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919, EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., Biopolymers, 22: 547-556 (1983)), copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables (Langer et al., *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el Lupron Depot (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988).

[0161] La dosis terapéuticamente eficaz de un polipéptido DNA98853 o un polipéptido DNA101848 (o anticuerpo de los mismos) variará, naturalmente, dependiendo de factores, tales como la terapia pretendida (por ejemplo, para modular la apoptosis, las respuestas autoinmunes o proinflamatorias), la condición patológica a tratar, el método de administración, el tipo de compuesto que se utiliza en el tratamiento, cualquier coterapia implicada, la edad, peso, condición médica general, historial médico del paciente, etc. y su determinación está dentro de la capacidad del médico. Por consiguiente, será necesario para el terapeuta titular la dosificación y modificar la ruta de administración según se requiera para obtener el máximo efecto terapéutico.

[0162] Con las directrices anteriores, la dosis efectiva generalmente está en el intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 1,0 mg/kg.

[0163] La ruta de administración del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 está de acuerdo con los métodos conocidos, por ejemplo, mediante inyección o infusión por vía intravenosa, intramuscular, intracerebral, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraocular, intraarticular, intrasinoval, intratecal, oral, tópica o inhalación, o mediante sistemas de liberación controlada. El polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 también se administran de manera adecuada por vía intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como sistémicos.

[0164] La efectividad del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 que trata el trastorno se puede mejorar mediante la administración del agente activo en serie o en combinación con otro agente que es eficaz para estos fines, ya sea en la misma composición o como composiciones separadas. Ejemplos de dichos agentes incluyen agentes citotóxicos, quimioterapéuticos o inhibidores del crecimiento, citoquinas y tratamientos radiológicos (tales como que implican la radiación o administración de sustancias radiológicas).

[0165] Las cantidades eficaces de los agentes terapéuticos administrados en combinación con el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 serán a discreción del médico. La administración y ajuste de la dosis se realiza para conseguir el máximo tratamiento de las condiciones a tratar.

[0166] Los diversos métodos y composiciones terapéuticas referidas anteriormente se pueden utilizar de forma similar para el uso de los antagonistas de EDA-A2 aquí descritos.

G. Anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 y/o anti-polipéptido DNA101848

[0167] La presente invención proporciona anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 y anticuerpos anti-polipéptido DNA101848. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpo policlonales

[0168] Los anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 y anti-polipéptido 101848 de la presente invención pueden comprender anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos para el experto en la materia. Los anticuerpos policlonales se pueden desarrollar en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Habitualmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante inyecciones múltiples subcutáneas o intraperitoneales. Para los anticuerpos anti-polipéptido DNA98852, el agente inmunizante puede incluir el polipéptido DNA98853 o una proteína de fusión del mismo. Para los anticuerpos anti-polipéptido DNA101848, el agente inmunizante puede incluir el polipéptido DNA101848 o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el

agente inmunizante a una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Entre los ejemplos de dichas proteínas inmunogénicas que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Entre los ejemplos de adyuvantes que se pueden utilizar se incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). El protocolo de inmunización se puede seleccionar por un experto en la materia sin una gran experimentación.

2. Anticuerpos monoclonales

[0169] Los anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 o anti-polipéptido DNA101848 pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein, Nature, *supra*. En un procedimiento de hibridoma, se inmuniza habitualmente un ratón, un hámster u otro animal huésped apropiado con un agente inmunizante para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

[0170] Para los anticuerpos anti-polipéptido DNA98853, el agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido DNA98853 o una proteína de fusión del mismo. Para los anticuerpos anti-polipéptido DNA101848, el agente inmunizante incluirá habitualmente el polipéptido DNA101848 o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos de sangre periférica ("PLBs") si se desean células de origen humano, o células de bazo o se utilizan células de nódulos linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. A continuación, los linfocitos se fusionan con una línea celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academia Press, (1986), páginas 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son habitualmente células de mamífero transformadas, particularmente células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Habitualmente, se utilizan líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

[0171] Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, soportan un nivel de expresión elevado estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) páginas, 51-63].

[0172] A continuación, en el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede analizar la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra un polipéptido DNA98853 o un polipéptido DNA101848. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Dichas técnicas y ensayos se conocen en el estado de la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante el análisis Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107: 220 (1980).

[0173] Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar [Goding, *supra*]. Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como ascitis en un mamífero.

[0174] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulina convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía en hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[0175] Los anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden aislar fácilmente y secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante la utilización de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede situar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células COS de simio,

células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de ningún modo proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias homólogas murinas [Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al., *supra*] o uniendo covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Dicho polipéptido que no es inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la presente invención, o se pueden sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

[0176] Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos monovalentes. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes son conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de la cadena ligera y la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc para evitar la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína pertinentes se sustituyen por otro residuo de aminoácido o se eliminan para evitar la reticulación.

[0177] Los procedimientos *in vitro* también son adecuados para preparar anticuerpos monovalentes. La digestión de anticuerpos para producir fragmentos de los mismos, particularmente, fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas rutinarias conocidas en el estado de la técnica.

3. Anticuerpos humanizados

[0178] Los anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 y anti-polipéptido DNA101848 de la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. 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 los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo destinatario) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del destinatario 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, los residuos del armazón de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo destinatario ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de forma óptima también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

[0179] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en el estado de la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo de un origen que es no humano. A estos residuos de aminoácidos no humanos se les hace referencia frecuentemente como residuos "importados", que se adquieren habitualmente de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable intacto humano ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0180] Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando varias técnicas conocidas en el sector, incluyendo bibliotecas de expresión de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. Las técnicas de Cote et al. y Boerner et al. también se encuentran disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cote et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)].

4. Anticuerpos multispecíficos

[0181] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidad de unión para por lo menos dos antígenos distintos. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el polipéptido DNA98853 o para el polipéptido DNA101848, y la otra es por

cualquier otro antígeno, y preferiblemente por una proteína de la superficie celular o receptor o una subunidad de receptor.

[0182] Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en el estado de la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas ligeras/cadenas pesadas de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades distintas [Millstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)]. A causa de la distribución aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos híbridos (cuadromas) producen una potencial mezcla de diez moléculas de anticuerpo distintas, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se lleva a cabo mediante etapas de cromatografía de afinidad. Se describen procedimientos similares en el documento WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al., EMBO J., 10: 3.655-3.659 (1991).

[0183] Los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseada (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias de los dominios constantes de la inmunoglobulina. La fusión tiene lugar, preferiblemente, con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de la bisagra, CH2, y las regiones CH3. Se prefiere que tenga la primera región constante de la cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para unirse a la cadena ligera presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan a un organismo huésped adecuado. Para más detalles sobre cómo generar anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986).

5. Anticuerpos heteroconjugados

[0184] Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario hacia células no deseadas [Patente de Estados Unidos 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [documento WO 91/00360; documento WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que se pueden preparar los anticuerpos *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en química de proteínas sintéticas, incluidos aquellos que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este propósito se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 4.676.980.

H. Usos de anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 y anticuerpos anti-polipéptido DNA101848

[0185] Los anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 y los anticuerpos anti-polipéptido DNA101848 de la presente invención tienen varias utilidades. Los anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 o anticuerpos anti-polipéptido DNA101848 se pueden utilizar en terapia, utilizando técnicas y métodos de administración descritos anteriormente. Además, por ejemplo, los anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 y los anticuerpos anti-polipéptido DNA101848 se pueden utilizar en ensayos de diagnóstico para los correspondientes polipéptidos, por ejemplo, detectando la expresión en células, tejidos específicos o suero. En la técnica se pueden utilizar varias técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en el sector, tales como ensayos de unión competitiva, ensayos sándwich directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados en fases heterogéneas u homogéneas [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico se pueden marcar con un grupo detectable. El grupo detectable debe ser capaz de producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el grupo detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , o ^{125}I , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para conjugar el anticuerpo al grupo detectable, incluyendo los métodos descritos por Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982).

[0186] Los anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 también son útiles para la purificación por afinidad de los polipéptidos DNA98853 a partir de un cultivo de células recombinantes o fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos contra un polipéptido DNA98853 se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o un papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el polipéptido DNA98853 a purificar, y a continuación se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el polipéptido DNA98853, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el polipéptido DNA98853 del anticuerpo.

[0187] Los anticuerpos anti-polipéptido DNA101848 también son útiles para la purificación por afinidad de los polipéptidos DNA101848 a partir de un cultivo de células recombinantes o fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos contra un polipéptido DNA101848 se inmovilizan en un soporte adecuado, tal como una resina

Sephadex o un papel de filtro, utilizando métodos conocidos en la técnica. A continuación, el anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el polipéptido DNA101848 a purificar, y a continuación se lava el soporte con un disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material en la muestra excepto el polipéptido DNA101848, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará el polipéptido DNA101848 del anticuerpo.

I. Artículos de fabricación

[0188] Un artículo de fabricación, tal como un kit que contiene el polipéptido DNA98853, polipéptido DNA101848, o los anticuerpos contra los mismos útiles para el diagnóstico o tratamiento de los trastornos aquí descritos comprende por lo menos un recipiente y un marcador. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. 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 tratamiento de la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). El agente activo en la composición es el polipéptido DNA98853, el polipéptido DNA101848, o un anticuerpo contra los mismos. La etiqueta en el recipiente o asociado con el mismo indica que la composición se utiliza para el diagnóstico o tratamiento de la condición de elección. 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. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con las instrucciones de uso. El artículo de fabricación también puede comprender un segundo o tercer recipiente con otro agente activo tal como se ha descrito anteriormente.

[0189] Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar en ningún caso el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

[0190] Se utilizaron reactivos disponibles comercialmente referidos en los ejemplos según las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. El origen de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria, por los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia.

EJEMPLO 1: Aislamiento de clones de ADNc que codifican el polipéptido DNA98853 humano

[0191] En base a la secuencia de ADN del clon 509 1511H de Incyte (SEQ ID NO:7) mostrada en la figura 9 (de la base de datos Incyte Pharmaceuticals LIFESEQ™) se sintetizaron oligonucleótidos para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés. Estos oligonucleótidos fueron:

Cebador codificante:

5' GAGGGGGCTGGGTGAGATGTG 3' (509-1) (SEQ ID NO:8)

Cebador anticodificante:

5' TGCTTTTGTACCTGCGAGGAGG 3' (509-4AS) (SEQ ID NO:9)

[0192] Para aislar la secuencia codificante de longitud completa del polipéptido DNA98853, se llevó a cabo un procedimiento PCR de larga distancia inversa (Figura 6). Los cebadores de PCR variaban de 20 a 30 nucleótidos. Para la PCR de larga distancia inversa, se diseñaron parejas de cebadores de manera que la dirección 5' a 3' de cada cebador se dirigía en dirección contrario del otro.

[0193] Se sintetizó una pareja de cebadores de PCR de larga distancia inversa para la clonación de DNA101848:

Cebador 1 (cebador izquierdo):

5' pCATGGTGGGAAGGCCGTAACG 3' (509-P5) (SEQ ID NO:10)

Cebador 2 (cebador derecho):

5' pGATTGCCAAGAAAATGAGTACTGGGACC 3' (509-P6) (SEQ ID NO:11)

[0194] En la reacción de PCR de larga distancia inversa, la plantilla es una biblioteca de ADNc plasmídico. Como resultado, los productos PCR contienen la secuencia del vector completa en el centro con secuencias de inserción de interés en ambos extremos. Después de la reacción de PCR, la mezcla de PCR se trató con Dpn I que digiere sólo los plásmidos plantilla, seguido de purificación con gel de agarosa de productos PCR de mayor tamaño que el vector de clonación de la biblioteca. Dado que los cebadores utilizados en la PCR de larga distancia inversa también se fosforilaron en 5', a continuación los productos purificados se autounieron y transformaron en células competentes con E. Coli. Las colonias se cribaron mediante PCR utilizando un cebador dl vector 5' y un cebador específico del gen correcto para identificar clones con una secuencia 5' más larga. Se secuenciaron plásmidos

preparados a partir de clones positivos. Si es necesario, el proceso se podría repetir para obtener más secuencias 5' en base a una nueva secuencia obtenida de la ronda previa.

[0195] El objetivo de la PCR de larga distancia inversa es obtener la secuencia completa del gen de interés. El clon que contiene la región codificante de longitud completa se obtuvo a continuación mediante PCR convencional.

[0196] Se sintetizaron la pareja de cebadores utilizada para clonar la región codificante de longitud completa de DNA98853:

Cebador codificante:

5' ggaggatcgatACCATGGATTGCCAAGAAAATGAG 3' (Cla-MD-509) (SEQ ID NO:12)

Cebador anticodificante:

5' ggaggagcggccgcttaAGGGCTGGGAAGTTCAAAGGGCAC (509.TAA.not) (SEQ ID NO:13)

[0197] Para fines de clonación, se incluyeron un sitio Cla I y un sitio Not I en el cebador codificante y el cebador no codificante, respectivamente.

[0198] Para asegurar la precisión de los productos PCR, se realizaron reacciones PCR independientes y se secuenciaron varios productos clonados.

[0199] La secuenciación del ADN de los clones aislados descritos anteriormente produjo la secuencia de ADN de longitud completa para el polipéptido DNA98853 (designado en el presente documento como DNA98853-1739) y la secuencia de proteína derivada para el polipéptido DNA98853.

[0200] La secuencia de nucleótidos completa de DNA98853 se muestra en la figura 1 (SEQ ID NO:1). Se ha depositado el clon DNA98853-1739 con la ATCC y se ha asignado el depósito ATCC No. ATCC 203906. El clon DNA98853 contiene un único marco de lectura con un sitio de inicio de la traducción aparente en las posiciones de nucleótidos 4-6 y que acaba en el codón de parada en las posiciones de nucleótidos 901-903 (figura 1). El precursor de polipéptido previsto tiene 299 aminoácidos de largo (figura 2). La proteína polipéptidos DNA98853 de longitud completa mostrada en la figura 2 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 3,3 kilodaltons y un pI de aproximadamente 4,72. Existe un potencial sitio de N-glicosilación entre los aminoácidos 74 y 77 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2. Existe un potencial sitio de N-miristoilación entre los aminoácidos 24 y 29 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2. Existen potenciales sitios de fosforilación de caseína quinasa II entre los aminoácidos 123-126, 185-188, 200-203, 252-255, 257-260, 271-274, y 283-286 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2. Existe un potencial dominio transmembrana entre los aminoácidos 137 y 158 de la secuencia mostrada en la figura 2. Actualmente se cree que el polipéptido no incluye una secuencia señal.

[0201] El análisis de la secuencia de aminoácidos del polipéptido DNA98853 de longitud completa sugiere que partes de la misma poseen homología con los miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, indicando así que el polipéptido DNA98853 puede ser un nuevo miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. Existen tres dominios extracelulares ricos en cisteína aparentes característicos de la familia de TNFR [véase, Naismith y Sprang, Trends Biochem. Sci., 23:74-79 (1998)], de los cuales, los primeros dos CRD tienen 6 cisteínas, mientras que el tercer CRD tiene 4 cisteínas.

EJEMPLO 2: Aislamiento de clones de ADNc que codifica el polipéptido DNA 101848 humano

[0202] En base a la secuencia de ADN del clon 509 1511H de Incyte mostrada en la figura 9 (SEQ ID NO:7), se sintetizaron oligonucleótidos para identificar mediante PCR una biblioteca de ADNc que contenía la secuencia de interés. Estos oligonucleótidos fueron:

Cebador codificante:

5' GAGGGGGCTGGGTGAGATGTG 3' (509-1) (SEQ ID NO:8)

Cebador anticodificante:

5' TGCTTTTGTACCTGCGAGGAGG 3' (509-4AS). (SEQ ID NO:9)

[0203] Para aislar la secuencia codificante de longitud completa del polipéptido DNA101848, se llevó a cabo un procedimiento PCR de larga distancia inversa (Figura 6). Los cebadores de PCR variaban de 20 a 30 nucleótidos. Para la PCR de larga distancia inversa, se diseñaron parejas de cebadores de manera que la dirección 5' a 3' de cada cebador se dirigía en dirección contrario del otro.

[0204] Se sintetizó una pareja de cebadores de PCR de larga distancia inversa para la clonación de DNA101848:

Cebador 1 (cebador izquierdo):

5' pCATGGTGGGAAGCCGTAACG 3' (509-P5) (SEQ ID NO:10)

Cebador 2 (cebador derecho):

5' pGATTGCCAAGAAAATGAGTACTGGGACC 3' (509-P6) (SEQ ID NO:11)

[0205] En la reacción de PCR de larga distancia inversa, la plantilla es una biblioteca de ADNc plasmídico. Como resultado, los productos PCR contienen la secuencia del vector completa en el centro con secuencias de inserción de interés en ambos extremos. Después de la reacción de PCR, la mezcla de PCR se trató con Dpn I que digiere sólo los plásmidos plantilla, seguido de purificación con gel de agarosa de productos PCR de mayor tamaño que el vector de clonación de la biblioteca. Dado que los cebadores utilizados en la PCR de larga distancia inversa también se fosforilaron en 5', a continuación los productos purificados se autounieron y transformaron en células competentes con E. Coli. Las colonias se cribaron mediante PCR utilizando un cebador dl vector 5' y un cebador específico del gen correcto para identificar clones con una secuencia 5' más larga. Se secuenciaron plásmidos preparados a partir de clones positivos. Si es necesario, el proceso se podría repetir para obtener más secuencias 5' en base a una nueva secuencia obtenida de la ronda previa.

[0206] Se sintetizaron la pareja de cebadores utilizada para clonar la región codificante de longitud completa de DNA101848:

Cebador codificante:

5' ggaggatcgatACCATGGATTGCCAAGAAAATGAG 3' (Cla-MD-509) (SEQ ID NO:12)

Cebador anticodificante:

5' ggaggagcggcgcttaAGGGCTGGGAACCTCAAAGGGCAC (509.TAA.not) (SEQ ID NO:13)

[0207] Para fines de clonación, se incluyeron un sitio Cla I y un sitio Not I en el cebador codificante y el cebador no codificante, respectivamente.

[0208] Para asegurar la precisión de los productos PCR, se realizaron reacciones PCR independientes y se secuenciaron varios productos clonados.

[0209] La secuenciación del ADN de los clones aislados descritos anteriormente produjo la secuencia de ADN de longitud completa para el polipéptido DNA101848 (designado en el presente documento como DNA101848-1739) y la secuencia de proteína derivada para el polipéptido DNA101848.

[0210] La secuencia de nucleótidos completa de DNA101848 se muestra en la figura 3 (SEQ ID NO:4). Se ha depositado el clon DNA101848-1739 con la ATCC y se ha asignado el depósito ATCC No. ATCC 203907. El clon DNA101848 contiene un único marco de lectura con un sitio de inicio de la traducción aparente en las posiciones de nucleótidos 4-6 y que acaba en el codón de parada en las posiciones de nucleótidos 895-897 (figura 3). El precursor de polipéptido previsto tiene 297 aminoácidos de largo (figura 4). La proteína polipéptidos DNA101848 de longitud completa mostrada en la figura 4 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 3,28 kilodaltons y un pI de aproximadamente 4,72. Existe un potencial sitio de N-glicosilación entre los aminoácidos 74 y 77 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 4. Existe un potencial sitio de N-miristoilación entre los aminoácidos 24 y 29 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 4. Existen potenciales sitios de fosforilación de caseína quinasa II entre los aminoácidos 123-126, 185-188, 200-203, 252-255, 257-260, 271-274, y 283-286 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 4. Existe un potencial dominio transmembrana entre los aminoácidos 137 y 158 de la secuencia mostrada en la figura 4. Actualmente se cree que el polipéptido no incluye una secuencia señal.

[0211] El análisis de la secuencia de aminoácidos del polipéptido DNA101848 de longitud completa sugiere que partes de la misma poseen homología con los miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral, indicando así que el polipéptido DNA101848 puede ser un nuevo miembro de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral. Existen tres dominios extracelulares ricos en cisteína aparentes característicos de la familia de TNFR [véase, Naismith y Sprang, Trends Biochem. Sci., 23:74-79 (1998)], de los cuales, los primeros dos CRD tienen 6 cisteínas, mientras que el tercer CRD tiene 4 cisteínas.

[0212] Para demostrar adicionalmente que el DNA101848 es realmente una proteína transmembrana, se construyeron dos versiones de plásmidos de expresión etiquetados con epítipo de DNA101848 en pRK5B (véase el ejemplo 11), uno con una etiqueta Flag N-terminal (Flag-DNA101848) y el otro con la etiqueta Flag C-terminal Flag (DNA101848-Flag). Se inmunotñeron células MCF-7 (ATCC) transfectadas con cualquiera de las construcciones (utilizando el reactivo Lipofectamina; Gibco-BRL) con el anticuerpo anti-Flag M2 (Sigma) con o sin permeabilización con Triton X-100 al 0,5% en PBS. La tinción celular se visualizó mediante la incubación posterior con anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con Cy3 (Sigma). Tal como se muestra en la figura 10, sin permeabilización de membrana (figuras 10A y 10B), la tinción de la superficie celular por M2 sólo se observó en células transfectadas con Flag-DNA101848 pero con DNA101848-Flag. Cuando las células se permeabilizaron antes de la inmunotinción con anti-Flag, se observaron expresiones comparables para ambos tipos de construcciones (Figuras 10C y 10D). Este experimento claramente demostró que DNA101848 se expresa como proteína de la superficie celular con la región N-terminal fuera de las células y la región C-terminal en el interior de las células. Por lo tanto, DNA101848 representa una proteína transmembrana de tipo III.

EJEMPLO 3: Uso del ADN que codifican el polipéptido DNA98853 o ADN que codifica el polipéptido DNA101848 como sonda de hibridación

[0213] El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido DNA98853 o una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido DNA98853 como sonda de hibridación.

[0214] El ADN que comprende la secuencia codificante del polipéptido DNA98853 de longitud completa (tal como se muestra en la figura 1, SEQ ID No. 1) o un fragmento del mismo, se utiliza como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales del polipéptido DNA98853) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano. De manera similar, el ADN que comprende la secuencia codificante del polipéptido DNA101848 de longitud completa (tal como se muestra en la figura 3, SEQ ID No. 4) o un fragmento del mismo, se utiliza como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales del polipéptido DNA101848) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

[0215] La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de elevada astringencia. La hibridación de la sonda derivada del polipéptido DNA98853 o de la sonda derivada del polipéptido DNA98853 radiomarcada a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 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.

[0216] A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad secuencial deseada con el ADN que codifica el polipéptido DNA98853 de secuencia nativa y longitud completa o con el ADN que codifica el polipéptido DNA101848 de secuencia nativa y longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en el sector.

EJEMPLO 4: Expresión de los polipéptidos DNA98853 o DNA101848 en E. coli

[0217] Este ejemplo ilustra la preparación de formas de los polipéptidos DNA98853 y las formas de los polipéptidos DNA101848 mediante la expresión recombinante en E. coli.

[0218] Para la expresión del polipéptido DNA98853, la secuencia de ADN que codifica el polipéptido DNA98853 de longitud completa (SEQ ID NO:1) o un fragmento o variante de la misma se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Para la expresión del polipéptido DNA101848, la secuencia de ADN que codifica el polipéptido DNA101848 de longitud completa (SEQ ID NO:4) o un fragmento o variante de la misma se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados.

[0219] Los cebadores deben 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 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 líder de poli-His (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante del polipéptido DNA98853 o la región codificante del polipéptido DNA101848, el finalizador transcripcional lambda, y un gen argU.

[0220] 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 plasmídico se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

[0221] 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.

[0222] Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El pélet de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y el polipéptido DNA98853 solubilizado o el polipéptido DNA101848 solubilizado se pueden a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte del polipéptido.

EJEMPLO 5: Expresión de los polipéptidos DNA98853 o polipéptidos DNA101848 en células de mamífero

[0223] Este ejemplo ilustra la preparación de formas de los polipéptidos DNA98853 y los polipéptidos DNA101848 mediante la expresión recombinante en las células de mamífero.

[0224] Se utiliza el vector, pRK5 (véase EP 307,247, publicada el 15 de marzo de 1989), como el vector de expresión. Opcionalmente, el ADN que codifica el polipéptido DNA98853 se liga en pRK5 con las enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN que codifica el polipéptido DNA98853 utilizando métodos de unión, tales como los descritos en Sambrook et al., supra. El vector resultante se denomina pRK5-Polipéptido DNA98853. Opcionalmente, el ADN que codifica el polipéptido DNA101848 se liga en pRK5 con las enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN que codifica el polipéptido DNA101848 utilizando métodos de unión, tales como los descritos en Sambrook et al., supra. El vector resultante se denomina pRK5-Polipéptido DNA101848.

[0225] En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se desarrollan hasta la confluencia 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-polipéptido DNA98853 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN 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. Alternativamente, se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-polipéptido DNA101848 con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN 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 de vectores 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 fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

[0226] 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 de ³⁵S- metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio condicionado, se concentra en un filtro de centrifugación 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 DNA98853 o la presencia del polipéptido DNA101848. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos seleccionados.

[0227] En una técnica alternativa, se puede introducir el ADN del polipéptido DNA98853 o el ADN del polipéptido DNA101848 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 matraz giratorio y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-polipéptido DNA98853 o se añaden 700 µg de ADN de pRK5-polipéptido DNA101848. En primer lugar, las células se concentran a partir del matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado 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 matraz 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 condicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y restos celulares. La muestra que contiene el polipéptido DNA98853 expresado o el polipéptido DNA101848 expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

[0228] En otra realización, puede expresarse el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 en células CHO. El vector pRK5-polipéptido DNA98853 o el vector pRK5-polipéptido DNA101848 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 sustituirse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como ³⁵S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido deseado, el medio de cultivo puede sustituirse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio condicionado. A continuación, el medio que contiene el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 expresados puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

[0229] El polipéptido DNA98853 etiquetado con epítipo o el polipéptido DNA101848 etiquetado con epítipo pueden expresarse también en células CHO huéspedes. El ADN que codifica polipéptido DNA98853 o el ADN que codifica el polipéptido DNA101848 pueden subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclón puede someterse a PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta epítipo seleccionada, tal como una etiqueta de poli-His en un vector de expresión de Baculovirus. El inserto del ADN que codifica el polipéptido DNA98853 etiquetado con poli-His o el inserto del ADN que codifica el polipéptido DNA101848 etiquetado con poli-His pueden 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 como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje puede realizarse, tal como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el polipéptido DNA98853 etiquetado con poli-His expresado o el polipéptido DNA101848 etiquetado con poli-His expresado pueden a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelato con Ni²⁺.

EJEMPLO 6: Expresión de un polipéptido DNA98853 o un polipéptido DNA101848 en levadura

[0230] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de polipéptidos DNA98853 y polipéptidos DNA101848 en levadura.

[0231] En primer lugar, se construyen vectores de expresión para la producción intracelular o la secreción del polipéptido DNA98853 a partir del promotor ADH2/GADPH. El ADN que codifica el polipéptido DNA98853 de interés, un péptido señal seleccionado y el promotor se insertan en las dianas de restricción adecuadas en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular del polipéptido DNA98853. Para la secreción, el ADN que codifica el polipéptido DNA98853 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GADPH, la secuencia líder/señal secretora del factor alfa de levadura y secuencias enlazadoras (si fuera necesario) para la expresión del polipéptido DNA98853.

[0232] Alternativamente, se construyen vectores de expresión para la producción intracelular o la secreción del polipéptido DNA101848 a partir del promotor ADH2/GADPH. El ADN que codifica el polipéptido DNA101848 de interés, un péptido señal seleccionado y el promotor se insertan en las dianas de restricción adecuadas en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular del polipéptido DNA101848. Para la secreción, el ADN que codifica el polipéptido DNA101848 puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GADPH, la secuencia líder/señal secretora del factor alfa de levadura y secuencias enlazadoras (si fuera necesario) para la expresión del polipéptido DNA101848.

[0233] Las células de levadura, como la cepa de levadura AB110, puede transformarse a continuación con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y se cultivan en el medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante PAGE-SDS, seguido de una tinción de los geles con azul de Coomassie.

[0234] El polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 recombinantes posteriormente se pueden aislar y purificar mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y a continuación se concentra el medio utilizando filtros de cartuchos individuales. El concentrado que contiene el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 puede purificar adicionalmente utilizando resinas seleccionadas de cromatografía en columna.

EJEMPLO 7: Expresión del polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 en células de insecto infectadas con baculovirus

[0235] El procedimiento siguiente describe la expresión recombinante de polipéptidos DNA98853 y polipéptidos DNA101848 en células de insecto infectadas con Baculovirus.

[0236] El ADN que codifica el polipéptido DNA98853 o el ADN que codifica el polipéptido DNA101848 se fusiona en dirección 5' de una etiqueta epitópica contenida en un vector de expresión de Baculovirus. Dichas etiquetas epitópicas incluyen las etiquetas de poli-His y las etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Puede utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo los plásmidos derivados de plásmidos disponibles comercialmente como pVL1393 (Novagen). En resumen, el ADN que codifica el polipéptido DNA98853 o la parte deseada del ADN que codifica el polipéptido DNA98853 (tal como la secuencia codificante del dominio extracelular de una proteína transmembrana) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. Alternativamente, el ADN que codifica el polipéptido DNA101848 o la parte deseada del ADN que codifica el polipéptido DNA101848 (tal como la secuencia codificante del dominio extracelular de una proteína transmembrana) se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar dianas de restricción flanqueantes (seleccionadas). El producto se digiere a continuación con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

[0237] El baculovirus recombinante se genera mediante co-transfección del plásmido anterior y del ADN del virus BaculoGold™ (Pharming) en células de Spodoptera frugiperda ("Sf9") (ATCC CRL 1711) mediante la utilización de lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y utilizan para amplificaciones posteriores. La infección viral y la expresión de proteínas se realizaron tal como se describe en O'Reilly et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

[0238] A continuación, es posible purificar el polipéptido DNA98853 etiquetado con poli-His expresado o el polipéptido DNA101848 etiquetado con poli-His expresado, por ejemplo mediante cromatografía de afinidad con quelato-Ni²⁺ de la siguiente manera. Se preparan los extractos a partir de las células Sf9 infectadas con el virus recombinante tal como se describe por Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993). En resumen, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9; MgCl₂ 12,5 mM; EDTA 0,1 mM; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; KCl 0,4 M), y se sonicar dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se clarifican por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol

al 10%, pH 7,8) y se filtran a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa NTA-Ni²⁺ (disponible comercialmente por Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava al nivel basal A₂₈₀ con tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de fracciones. A continuación, se lava la columna con un segundo tampón de lavado (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína unida inespecíficamente. Después de alcanzar el nivel basal A₂₈₀ de nuevo, la columna se revela con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el segundo tampón de lavado. Se recogen fracciones de 1 l y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o transferencia de Western con NTA-Ni²⁺ conjugado con fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el polipéptido DNA98853 etiquetado con poli-His eluido o el polipéptido DNA101848 etiquetado con poli-His eluido se agrupan y dializan contra el tampón de carga.

[0239] Alternativamente, la purificación del polipéptido DNA98853 etiquetado con IgG (o Fc) o el polipéptido DNA101848 etiquetado con IgG (o Fc) puede realizarse mediante técnicas de cromatografía, incluyendo por ejemplo, columnas de cromatografía con Proteína A o proteína G.

EJEMPLO 8: Preparación de anticuerpos que se unen a polipéptidos DNA98853 y/o polipéptidos DNA101848

[0240] Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que se pueden unir específicamente a polipéptidos DNA98853 y/o polipéptidos DNA101848.

[0241] Las técnicas para la producción de los anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, *supra*. Los inmunógenos que pueden utilizarse incluyen el polipéptido DNA98853 purificado, el polipéptido DNA101848 purificado, proteínas de fusión que contienen un polipéptidos DNA98853, proteínas de fusión que contienen un polipéptidos DNA101848, células que expresan polipéptidos DNA98853 recombinante en la superficie celular y células que expresan polipéptidos DNA101848 en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse por el experto en la materia sin demasiada experimentación.

[0242] Se inmunizaron ratones, como los Balb/c, con el inmunógeno de polipéptido DNA98853, o el inmunógeno de polipéptido DNA101848, emulsionados en adyuvante completo de Freund y se inyectaron subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras de animal. Los ratones inmunizados a continuación se vuelven a reforzar 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, los ratones también pueden reforzarse con inyecciones de inmunización adicionales durante varias semanas. Es posible obtener periódicamente muestras de suero de los ratones mediante sangrado retro-orbital para los ensayos ELISA con el fin de detectar anticuerpos anti-polipéptido DNA98853 o anticuerpos contra el polipéptido DNA101848.

[0243] Después de detectar un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para los anticuerpos pueden inyectarse con una inyección intravenosa final de polipéptido DNA98853 o de polipéptido DNA101848. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se obtienen las células del bazo. Éstas se fusionan a continuación (utilizando polietilenglicol al 35%) con una línea celular de mieloma murino seleccionado, como P3X63AgU.1, disponible de ATCC No.CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que a continuación pueden sembrarse en placas de 96 pocillos con medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

[0244] Las células de hibridoma se analizarán en un ensayo ELISA para la reactividad contra el polipéptido DNA98853 o para la reactividad contra el polipéptido DNA101848. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales contra un polipéptido DNA98853 o un polipéptido DNA101848 se halla dentro del ámbito de la técnica.

[0245] Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse intraperitonealmente en ratones Balb/c singénicos para producir ascitis que contengan anticuerpos monoclonales anti- polipéptido DNA98853 o anticuerpos monoclonales anti-polipéptido DNA101848. Alternativamente, las células de hibridoma se pueden desarrollar en matraces de cultivo de tejido o botellas rotatorias. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis puede lograrse mediante la utilización la precipitación con sulfato amónico, seguido de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede utilizarse la cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o proteína G.

EJEMPLO 9: Ensayos para detectar la expresión del ARNm del polipéptido DNA101848 en células y tejidos humanos

[0246] Se realizó una transferencia Northern según los procedimientos habituales conocidos por los expertos en la materia. Brevemente, se hibridaron transferencias de tejido normal de ARN poliA+ humano o transferencias de líneas celulares tumorales (Clontech) según las instrucciones del fabricante. Se generaron sondas marcadas con ³²P utilizando fragmentos de ADN correspondientes a los nucleótidos 478-903 de DNA101848 (SEQ ID NO:4). Tal como se muestra en la figura 7, se detectaron niveles de expresión relativamente elevados en dos líneas celulares de

tumor humano, carcinoma de pulmón A549 y melanoma G361. También se hallaron niveles de expresión relativamente débiles en tejidos de próstata, testículos, ovario, tiroides, médula espinal y glándulas adrenales. De manera destacada, existía un transcrito más pequeño con un nivel de expresión relativamente elevado en el tejido de estómago.

EJEMPLO 10: Activación de NF-KB

[0247] Se realizó un ensayo para determinar si el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 induce la activación de NF-κB mediante el análisis de expresión de un gen informador impulsado por un promotor que contiene un elemento sensible a NF-κB del gen de E-selectina.

[0248] Se transfectaron de manera transitoria células 293 humanas (2×10^5) (mantenidas en HG-DMEM complementado con FBS al 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 microgramos/ml y 100 microgramos de estreptomina) mediante transfección con fosfato de calcio con 0,5 microgramos del plásmido informador de luciferasa de luciérnaga pGL3.ELAM.tk [Yang et al., Nature, 395:284-288 (1998)] y 0,05 microgramos del plásmido informador de luciferasa de Renilla (como control de transfección interna) (Promega), así como los vectores de expresión adicionales indicados para el polipéptido DNA98853 o el polipéptido DNA101848 (descritos anteriormente), y el plásmido portador pRK5D para mantener el ADN constante entre las transfecciones. Después de 24 horas, las células transfectadas se recogieron y se analizó la actividad de luciferasa según la recomendación del fabricante (Promega). Se normalizaron las actividades (promedio de los pocillos por triplicado) por las diferencias en la eficacia de la transfección mediante la división de la actividad de la luciferasa de luciérnaga por la actividad de la luciferasa de Renilla y se expresaron como la actividad relativa a la observada en ausencia de vectores de expresión añadidos.

[0249] Tal como se observa en la figura 8A, la sobreexpresión de polipéptido DNA101848 marcado con flag dio lugar a una activación significativa del gen informador. Se obtuvo una actividad similar para el polipéptido DNA98853 (datos no mostrados).

[0250] Para los siguientes experimentos, sólo se utilizó el polipéptido DNA101848.

[0251] Para examinar los mediadores intracelulares potenciales de la señalización del polipéptido DNA101848, se analizaron mutantes negativos dominantes de ciertas moléculas de señalización intracelular implicadas en los mecanismos de activación de NF-KB mediante TNF-alfa, IL-1, o LPs-Toll.

[0252] Las células 293 se transfectaron de manera transitoria (como antes) con el pGL3.ELAM.tk y vectores de expresión. Además, las células se transfectaron con los siguientes vectores de expresión de mamífero que codifican formas negativas dominantes de TRAF2-DN (aminoácidos 87-501); TRAF6-DN (aminoácidos 289-522); y NIK-DN [descrito en Cao et al., Science, 271:1128-1131 (1996); Malinin et al., Nature, 385:540-544 (1997); Muzio et al., Science, 278:1362-1365 (1997); Rothe et al., Science, 269:1424-1427 (1995); Ting et al., EMBO J., 15:6189-6196 (1996); Wesche et al., Immunity, 7:837-847 (1997)]. La actividad de luciferasa se expresó y determinó tal como se ha descrito anteriormente.

[0253] Los resultados se muestran en la figura 8B. La cotransfección de una forma mutante inactiva en quinasa de NIK, que actúa como un inhibidor dominante de la activación de NF-KB por TNF-alfa (Malinin et al., Nature, 385:540-544 (1997)), IL-1 (Malinin et al., supra), y LPs-Toll (Yang et al., Nature, 395:284-288 (1998)), bloqueó sustancialmente la activación de NF-KB a través del polipéptido DNA101848. Un TRAF2 negativo dominante o Traf-6 negativo dominante (Rothe et al., Science, 269:1424-1427 (1995); Rothe et al., Cell, 78:681-692 (1994)) que poseen una delección N-terminal también atenuó la activación de NF-KB (Figura 8C). Por consiguiente, parece que el polipéptido DNA101848 activa NF-KB predominantemente a través de TRAF-2 y TRAF-6.

EJEMPLO 11: Identificación de un ligando para el receptor de DNA101848

[0254] Se preparó una molécula quimérica, referida aquí como "AP-EDA-A2", utilizando fosfatasa alcalina de placenta humana (AP) fusionada al extremo N-terminal de un polipéptido EDA-A2 que consiste en los aminoácidos 241-389 (Bayes et al., supra). La AP se obtuvo mediante amplificación por PCR utilizando pAptag-5 (Genehunter Corporation) como plantilla, y se fusionó y clonó en el vector de expresión, pCMV-1 Flag (Sigma), con AP en el extremo N-terminal de EDA-A2. El AP-EDA-A2 se transfectó de manera transitoria (utilizando el reactivo de Lipofectamina; Gibco-BRL) y se expresó en células 293 de riñón embrionario humano (ATCC). Se prepararon de manera similar el AP-TNF-alfa (Pennica et al., infra) y AP-TALL-1 (aminoácidos 136-285; secuencia descrita en WO98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999)). Se filtró el medio acondicionado de las células 293 transfectadas (0,45 micras), se almacenó a 4°C en un tampón que contenía 20 mM de Hepes (pH 7,0) y 1 mM de azida sódica y se utilizó en los posteriores procedimientos de tinción celular. Además, se construyó una forma de EDA-A2 marcada con Flag N-terminal en un vector pCMV-1 Flag. Para inducir la trimerización de esta construcción de EDA-A2 marcada con Flag, se insertó una forma trimérica de secuencia de cremallera de leucinas [Science, 262:1401-1407 (1993)] ente el marcador de Flag y EDA-A2 (que consiste en los aminoácidos 179-389; Bayes et al., supra), y esta construcción se refirió como Flag-LZP-EDAA2. Otra forma de

EDA-A2 marcada con Flag también se produjo mediante la clonación de los aminoácidos 179-389 de EDA-A2 en el vector pCMV-1Flag, y se refirió como Flag-EDA-A2. El Flag-LZP-EDA-A2 o Flag-EDA-A2 se purificó utilizando M2-gel de agarosa (Sigma) a partir de un medio libre de suero de células 293 transfectadas con el correspondiente plásmido de expresión. Se generó de una manera similar Flag-TALL-1 (que consistía en los aminoácidos 136-285; secuencia descrita en WO98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999)).

[0255] Para identificar un potencial ligando para el receptor de DNA101848, se transfectaron de forma transitoria células COS 7 (ATCC) (utilizando reactivo de Lipofectamina) con formas de membrana de varios ligandos de la familia de TNF. Entre los ligandos analizados se encontraban APRIL, TALL-1, 4-1 BBL, CD27L, CD30L, CD40L, EDA-A2, RANKL, TNF-alfa, y Apo2L/TRAIL.

[0256] Se clonó TNF-alfa humano en el vector pRK5B (pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio Sfil; véase Holmes et al., Science, 253:1278-1280 (1991)). Para la detección de la expresión de TNF-alfa en la superficie celular, se insertó una etiqueta Flag entre el aminoácido 70 y el aminoácido 71 (utilizando la numeración según la secuencia en Pennica et al., Nature, 312:724-729 (1984)). En el sitio BamHI se clonó individualmente una región extracelular de TALL-1 (aminoácidos 75-285; secuencia descrita en WO98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999)), 4-1BBL (aminoácidos 59-254; Goodwin et al., Eur. J. Immunol., 23:2631-2641 (1993)), ligando CD27 (aminoácidos 40-193; Goodwin et al., Cell, 73:447-456 (1993)), ligando CD30 (aminoácidos 61-234; Smith et al., Cell, 73:1349-1360 (1993)), RANKL (aminoácidos 71-317; véase WO98/28426), ligando Apo-2 (aminoácidos 40-281; véase WO97/25428) o Apo-3L (aminoácidos 46-249; véase WO99/19490). Esto dio lugar a un ligando quimérico con las regiones intracelular y transmembrana de TNF-alfa y la región extracelular de los diversos ligandos. Para APRIL (Hahne et al., J. Exp. Med., 188:1185-1190 (1998)) y EDA-A2 (Bayes et al., supra), se utilizaron clones de ADNc de longitud completa sin etiqueta Flag.

[0257] Se incubaron células COS7 (ATCC) transfectadas con varios ligandos con DNA101848-ECD-hFc o TNFR1-hFc (construcciones descritas a continuación) a 1 µg/ml durante 1 hora en PBS que contenía suero de cabra al 5% (Sigma). Las células se lavaron posteriormente tres veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS. La tinción celular se visualizó mediante incubación con anticuerpo anti-humano de cabra biotinilado (Jackson Labs, a una dilución 1:200) seguido de Cy3-estreptavidina (Jackson Labs, a una dilución 1:200). Entre todos los ligandos analizados, DNA101848-ECD-hFc sólo se unió a células transfectadas con EDA-A2. Tal como se muestra en la figura 11, DNA 101848-hFc, pero no TNFR-hFc, se unió a células transfectadas con EDA-A2.

[0258] Para demostrar la unión de EDA-A2 soluble a la forma unida a la membrana celular de DNA101848, se transfectaron células COS 7 con 1 microgramo de DNA101848 (clonado en el vector pRK5B) o vector plasmídico vacío (pRK5B). 18-24 horas después de la transfección, las células se incubaron con medio acondicionado que contenía AP-EDA-A2; AP-TNF-alfa; o AP-TALL-1 durante 1 hora a temperatura ambiente y se tiñó para la actividad de AP in situ tal como se describe en Tartaglia et al., Cell, 83:1263-1271 (1995). Tal como se muestra en la figura 12, AP-EDA-A2, pero no AP-TNF-alfa o AP-TALL-1, se unían específicamente a células transfectadas con DNA101848.

[0259] Para demostrar la unión de EDA-A2 soluble a ECD de DNA101848-hFc, se incubó un mg del Flag-LZPEP EDA-A2 o Flag-EDA-A2 purificados con 1 mg de inmunoadhesina humana purificada que contenía la fusión con Fc de IgG1 del ECD de DNA101848 (DNA101848-ECD-hFc) o TNFR1-hFc durante la noche a 4°C por duplicado. Las inmunoadhesinas de DNA101848-ECDhFc se prepararon mediante los métodos descritos en Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88:10535-10539 (1991). Las construcciones de inmunoadhesina consistían en los aminoácidos 2-154 del polipéptido DNA 101848 humano (véase la figura 4). Las construcciones DNA101848-ECD se expresaron en las células CHO utilizando una secuencia señal heteróloga (preprotripsina de aminoácidos 1-17 de pCMV-1 Flag (Sigma)) y que codifican la región Fc de IgG1 humana en dirección 3' de la secuencia de DNA101848 y, a continuación, se purificaron mediante cromatografía de afinidad de proteína A. Se preparó la construcción TNFR1-hFc tal como se describe en Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 88:10535-10539 (1991)). La TNFRSF19-hFc humano que contiene los aminoácidos 1-169 (Hu et al., Genomics, 62:103-107 (1999)) se preparó como para TNFR1-hFc. El complejo ligando-receptor se sometió a inmunoprecipitación a través del receptor-inmunoadhesina con proteína A-agarosa (Repligen). A continuación, se analizaron inmunoprecipitados mediante transferencia Western utilizando mAb anti-Flag M2 (Sigma).

[0260] Los datos muestran que Flag-LZP-EDA-A2 o Flag-EDA-A2 se unían a DNA101848-hFc, pero no a TNFR1-hFc o TNFRSF19-hFc (Figura 13).

EJEMPLO 12: Interacción entre DNA101848 y EDA-A2. Resultados en la activación de NF-κB

[0261] Se cultivaron células 293 (ATCC) 24 horas antes de la transfección a 1×10^5 células/pocillo en placas de 12 pocillos y se transfectaron con 0,25 µg de plásmido de gen informador de ELAM-luciferasa, 25 ng pRL-TK (Promega) y las cantidades indicadas de cada construcción de expresión (véase la figura 14). La cantidad total de ADN transfectado se mantuvo constante a 1 µg mediante complementación con vector pRK5B vacío (véase el Ejemplo 11). En algunos pocillos de ensayo, se añadieron ligandos marcados con Flag (preparados tal como se describe en el ejemplo 11) a las concentraciones indicadas 4 horas después de la transfección. En otros pocillos de ensayo, las

células se cotransfectaron con EDA-A2 de longitud completa (Bayes et al., supra) o TALL-1 (secuencia descrita en WO98/18921 publicada el 7 de mayo de 1998; Moore et al., Science, 285:260-263 (1999)). Las células se recogieron 20-24 horas después de la transfección y se determinó la actividad del gen informador con el sistema de ensayo dual de informador y luciferasa (Promega).

[0262] Se observó únicamente una activación mínima de NF- κ B cuando se expresó DNA101848 solo a niveles bajos (tales como 0,1 ng). Sin embargo, la activación de NF- κ B, aumentó considerablemente mediante la adición de Flag-EDA-A2 o mediante la cotransfección con EDA-A2 de longitud completa (Figura 14).

[0263] El tratamiento de células 293E no transfectadas (Invitrogen) con Flag-EDA-A2 (0,2 μ g/ml) también dio lugar a la activación del mecanismo de NF- κ B (véase la figura 15A). Ésta se midió mediante transferencia Western utilizando anti-fosfo-IKB-a (New England BioLabs). La preincubación con 20 mg/ml de DNA101848-ECD-hFc (véase el ejemplo 11) anuló la fosforilación de IKB-a inducida por Flag-EDA-A2 (Figura 15B). Estos resultados sugieren que una consecuencia fisiológica de la interacción de DNA101848 y EDA-A2 es la activación del mecanismo de NF- κ B.

Depósito de material

[0264] Los siguientes materiales se han depositado con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manasssas, Virginia, Estados Unidos (ATCC):

Material	ATCC Dep. No.	Fecha del depósito
DNA98853-1739	203906	6 de abril de 1999
DNA101848-1739	203907	6 de abril de 1999

[0265] Este depósito se realizó 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 el Comisionario de Patentes y Marcas de Estados Unidos para tener el derecho a la misma de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas del Comisionario según las mismas (incluyendo 37 CFR § 1.14 con referencia concreta a 886 OG 638).

[0266] 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.

[0267] La memoria escrita anterior se considera que es suficiente para permitir a un experto en la materia realizar la invención. La presente invención no está limitada 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, 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.

Listado de secuencias

[0268]

<110> Genentech, Inc.

<120> HOMÓLOGOS DE RECEPTORES DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL Y ÁCIDOS NUCLEICOS QUE LOS CODIFICAN

<130> P1739R1PCT

<141> 2000-04-12

<150> US 60/128,849

<151> 1999-04-12

<160> 13

<210> 1

<211> 905

<212> ADN

ES 2 421 720 T3

<213> Humana
<400> 1

```

5      accatggatt gccaaagaaaa tgagtactgg gaccaatggg gacgggtgtgt 50
      cacctgccaa cgggtgtgggc ctggacagga gctatccaag gattgtgggt 100
10     atggagagagg tggagatgcc tactgcacag cctgccctcc tcgcagggtac 150
      aaaagcagct gggggccacca cagatgtcag agttgcatca cctgtgctgt 200
15     catcaatcgt gttcagaagg tcaactgcac agctacctct aatgctgtct 250
      gtgggggactg tttgcccagg ttctaccgaa agacacgcat tggaggcctg 300
20     caggaccaag agtgcattccc gtgcacgaag cagaccccca cctctgaggt 350
      tcaatgtgcc ttccagttga gcttagtgga ggcagatgca cccacagtgc 400
25     cccctcagga ggccacactt gttgcactgg tgagcagcct gctagtgggtg 450
      tttaccctgg ccttcctggg gctcttcttc ctctactgca agcagttctt 500
30     caacagacat tgccagcgtg ttacaggagg tttgctgcag tttgaggctg 550
      ataaaacagc aaaggaggaa tctctcttcc ccgtgccacc cagcaaggag 600
35     accagtgcctg agtcccaagt gagtgagaac atctttcaga cccagccact 650
      taaccctatc ctcgaggacg actgcagctc gactagtggc tccccacac 700
40     aggagtccct taccatggcc tcctgcacct cagagagcca ctcccactgg 750
      gtccacagcc ccatcgaatg cacagagctg gacctgcaaa agttttccag 800
45     ctctgcctcc tatactggag ctgagacctt ggggggaaac acagtgcgaaa 850
      gcactggaga caggctggag ctcaatgtgc cctttgaagt tcccagccct 900
      taagc 905

```

50

<210> 2
<211> 905
<212> ADN
55 <213> Humana
<400> 2

60

65

5 gcttaagggc tgggaacttc aaagggcaca ttgagctcca gcctgtctcc 50
 agtgcttttcg actgtgtttc cccccaaggt ctcagctcca gtataggagg 100
 cagagctgga aaacttttgc aggtccagct ctgtgcattc gatggggctg 150
 10 tggacccagt gggagtggct ctctgaggtg caggaggcca tggtaaagga 200
 ctctgtgtg ggggaagccac tagtcgagct gcagtcgtcc tcgaggatag 250
 15 ggttaagtgg ctgggtctga aagatgttct cactcacttg ggactcagca 300
 ctgggtctcct tgctgggttg cacggggaag agagattcct cctttgctgt 350
 20 tttatcagcc tcaaactgca gcaaactcc tgtaacacgc tggcaatgtc 400
 tgttgaagaa ctgcttgacg tagaggaaga agagccccag gaaggccagg 450
 25 gtaaacacca ctagcaggct gctcaccagt gcaacaagtg tggcctcctg 500
 aggggggcact gtgggtgcat ctgcctccac taagctcaac tgggaaggcac 550
 30 attgaacctc agaggtgggg gtctgcttcg tgcacgggat gcactcttgg 600
 tcttgacaggc ctccaatgcg tgtctttcgg tagaacctgg gcaaacagtc 650
 35 cccacagaca gcattagagg tagctgtgca gttgaccttc tgaacacgat 700
 tgatgacagc acaggtgatg caactctgac atctgtggtg gccccagctg 750
 40 cttttgtacc tgcgaggagg gcaggctgtg cagtaggcat ctccaccctc 800
 tccataacca caatccttgg atagctcctg tccaggacca caccgttggc 850
 45 aggtgacaca ccgtcccat tggteccagt actcattttc ttggcaatcc 900
 atggt 905

50 <210> 3
 <211> 299
 <212> PRT
 <213> Humana
 <400> 3

55

60

65

ES 2 421 720 T3

	Met	Asp	Cys	Gln	Glu	Asn	Glu	Tyr	Trp	Asp	Gln	Trp	Gly	Arg	Cys	
	1				5					10					15	
5	Val	Thr	Cys	Gln	Arg	Cys	Gly	Pro	Gly	Gln	Glu	Leu	Ser	Lys	Asp	
					20					25					30	
	Cys	Gly	Tyr	Gly	Glu	Gly	Gly	Asp	Ala	Tyr	Cys	Thr	Ala	Cys	Pro	
					35					40					45	
10	Pro	Arg	Arg	Tyr	Lys	Ser	Ser	Trp	Gly	His	His	Arg	Cys	Gln	Ser	
					50					55					60	
	Cys	Ile	Thr	Cys	Ala	Val	Ile	Asn	Arg	Val	Gln	Lys	Val	Asn	Cys	
15					65					70					75	
	Thr	Ala	Thr	Ser	Asn	Ala	Val	Cys	Gly	Asp	Cys	Leu	Pro	Arg	Phe	
					80					85					90	
20	Tyr	Arg	Lys	Thr	Arg	Ile	Gly	Gly	Leu	Gln	Asp	Gln	Glu	Cys	Ile	
					95					100					105	
	Pro	Cys	Thr	Lys	Gln	Thr	Pro	Thr	Ser	Glu	Val	Gln	Cys	Ala	Phe	
25																
					110					115					120	
	Gln	Leu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Ala	Pro	Thr	Val	Pro	Pro	Gln	
30					125					130					135	
	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Ala	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Phe	
					140					145					150	
35	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Leu	Phe	Phe	Leu	Tyr	Cys	Lys	Gln	Phe	
					155					160					165	
	Phe	Asn	Arg	His	Cys	Gln	Arg	Val	Thr	Gly	Gly	Leu	Leu	Gln	Phe	
40					170					175					180	
	Glu	Ala	Asp	Lys	Thr	Ala	Lys	Glu	Glu	Ser	Leu	Phe	Pro	Val	Pro	
					185					190					195	
45	Pro	Ser	Lys	Glu	Thr	Ser	Ala	Glu	Ser	Gln	Val	Ser	Glu	Asn	Ile	
					200					205					210	
	Phe	Gln	Thr	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ile	Leu	Glu	Asp	Asp	Cys	Ser	
					215					220					225	
50	Ser	Thr	Ser	Gly	Phe	Pro	Thr	Gln	Glu	Ser	Phe	Thr	Met	Ala	Ser	
					230					235					240	
	Cys	Thr	Ser	Glu	Ser	His	Ser	His	Trp	Val	His	Ser	Pro	Ile	Glu	
55					245					250					255	
	Cys	Thr	Glu	Leu	Asp	Leu	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr	
					260					265					270	
60	Thr	Gly	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Gly	Asn	Thr	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	
					275					280					285	
	Asp	Arg	Leu	Glu	Leu	Asn	Val	Pro	Phe	Glu	Val	Pro	Ser	Pro		
65					290					295					299	

<210> 4

ES 2 421 720 T3

<211> 899
<212> ADN
<213> Humana
<400> 4

```

5      accatggatt gccaaagaaaa tgagtactgg gaccaatggg gacgggtgtgt 50
      cacctgccaa cgggtgtggtc ctggacagga gctatccaag gattgtgggtt 100
10     atggagaggg tggagatgcc tactgcacag cctgccctcc tcgcaggtac 150
      aaaagcagct gggggccacca cagatgtcag agttgcatca cctgtgctgt 200
15     catcaatcgt gttcagaagg tcaactgcac agctacctct aatgctgtct 250
      gtgggggactg tttgcccagg ttctaccgaa agacacgcat tggaggcctg 300
20     caggaccaag agtgcateccc gtgcacgaag cagaccccca cctctgaggt 350
      tcaatgtgcc ttccagttga gcttagtgga ggcagatgca cccacagtgc 400
25     ccctcagga ggccacactt gttgcactgg tgagcagcct gctagtgggtg 450
      tttaccctgg ccttcctggg gctcttcttc ctctactgca agcagttctt 500
30     caacagacat tgccagcgtg gaggtttgct gcagtttgag gctgataaaa 550
      cagcaaagga ggaatctctc ttccccgtgc caccagcaa ggagaccagt 600
      gctgagtcctc aagtgagtga gaacatcttt cagaccagc cacttaacct 650
40     tatectcgag gacgactgca gctcgactag tggtctcccc acacaggagt 700
      cctttaccat ggctcctgc acctcagaga gccactecca ctgggtccac 750
45     agccccatcg aatgcacaga gctggacctg caaaagtttt ccagctctgc 800
      ctctatact ggagctgaga ccttgggggg aaacacagtc gaaagcactg 850
50     gagacaggct ggagctcaat gtgccctttg aagttcccag cccttaagc 899

```

<210> 5
<211> 899
<212> ADN
<213> Humana
<400> 5

60

65

gcttaagggc tgggaacttc aaagggcaca ttgagctcca gcctgtctcc 50
 5 agtgcttttcg actgtgtttc cccccaaggt ctcagctcca gtataggagg 100
 cagagctgga aaacttttgc aggtccagct ctgtgcattc gatggggctg 150
 10 tggacccagt gggagtggct ctctgaggtg caggaggcca tggtaaagga 200
 ctctgtgtg ggggaagccac tagtcgagct gcagtcgtcc tcgaggatag 250
 15 ggttaagtgg ctgggtctga aagatgttct cactcacttg ggactcagca 300
 ctgggtctcct tgctgggtgg cacggggaag agagattcct cctttgctgt 350
 20 tttatcagcc tcaaactgca gcaaacctcc acgctggcaa tgtctgttga 400
 agaactgctt gcagtagagg aagaagagcc ccaggaaggc cagggtaaac 450
 25 accactagca ggctgctcac cagtgcaca agtggtggcct cctgaggggg 500
 cactgtgggt gcatctgcct ccactaagct caactggaag gcacattgaa 550
 30 cctcagaggt gggggtctgc ttcgtgcacg ggatgcactc ttggtcctgc 600
 aggccctcaa tgcgtgtctt tcggtagaac ctgggcaaac agtccccaca 650
 35 gacagcatta gaggtagctg tgcagttgac cttctgaaca cgattgatga 700
 cagcacaggt gatgcaactc tgacatctgt ggtggcccca gctgcttttg 750
 40 tacctgcgag gagggcaggc tgtgcagtag gcatctccac cctctccata 800
 accacaatcc ttggatagct cctgtccagg accacaccgt tggcaggtga 850
 45 cacaccgtcc ccattgggtcc cagtactcat tttcttggca atccatggt 899

<210> 6
 <211> 297
 <212> PRT
 50 <213> Humana
 <400> 6

Met Asp Cys Gln Glu Asn Glu Tyr Trp Asp Gln Trp Gly Arg Cys
 55 1 5 10 15
 Val Thr Cys Gln Arg Cys Gly Pro Gly Gln Glu Leu Ser Lys Asp

60

65

ES 2 421 720 T3

					20					25					30
5	Cys	Gly	Tyr	Gly	Glu	Gly	Gly	Asp	Ala	Tyr	Cys	Thr	Ala	Cys	Pro
					35					40					45
10	Pro	Arg	Arg	Tyr	Lys	Ser	Ser	Trp	Gly	His	His	Arg	Cys	Gln	Ser
					50					55					60
	Cys	Ile	Thr	Cys	Ala	Val	Ile	Asn	Arg	Val	Gln	Lys	Val	Asn	Cys
					65					70					75
15	Thr	Ala	Thr	Ser	Asn	Ala	Val	Cys	Gly	Asp	Cys	Leu	Pro	Arg	Phe
					80					85					90
20	Tyr	Arg	Lys	Thr	Arg	Ile	Gly	Gly	Leu	Gln	Asp	Gln	Glu	Cys	Ile
					95					100					105
	Pro	Cys	Thr	Lys	Gln	Thr	Pro	Thr	Ser	Glu	Val	Gln	Cys	Ala	Phe
					110					115					120
25	Gln	Leu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Asp	Ala	Pro	Thr	Val	Pro	Pro	Gln
					125					130					135
30	Glu	Ala	Thr	Leu	Val	Ala	Leu	Val	Ser	Ser	Leu	Leu	Val	Val	Phe
					140					145					150
	Thr	Leu	Ala	Phe	Leu	Gly	Leu	Phe	Phe	Leu	Tyr	Cys	Lys	Gln	Phe
35					155					160					165
	Phe	Asn	Arg	His	Cys	Gln	Arg	Gly	Gly	Leu	Leu	Gln	Phe	Glu	Ala
					170					175					180
40	Asp	Lys	Thr	Ala	Lys	Glu	Glu	Ser	Leu	Phe	Pro	Val	Pro	Pro	Ser
					185					190					195
45	Lys	Glu	Thr	Ser	Ala	Glu	Ser	Gln	Val	Ser	Glu	Asn	Ile	Phe	Gln
					200					205					210
	Thr	Gln	Pro	Leu	Asn	Pro	Ile	Leu	Glu	Asp	Asp	Cys	Ser	Ser	Thr
					215					220					225
50	Ser	Gly	Phe	Pro	Thr	Gln	Glu	Ser	Phe	Thr	Met	Ala	Ser	Cys	Thr
					230					235					240
55	Ser	Glu	Ser	His	Ser	His	Trp	Val	His	Ser	Pro	Ile	Glu	Cys	Thr
					245					250					255
	Glu	Leu	Asp	Leu	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Tyr	Thr	Gly
					260					265					270
60	Ala	Glu	Thr	Leu	Gly	Gly	Asn	Thr	Val	Glu	Ser	Thr	Gly	Asp	Arg
					275					280					285
65	Leu	Glu	Leu	Asn	Val	Pro	Phe	Glu	Val	Pro	Ser	Pro			
					290					295		297			

<210> 7
 <211> 292
 <212> ADN
 5 <213> Humana
 <400> 7

10 ggaggggggct gggtgagatg tgtgctctgc gctgaggtgg atttgtaccg 50
 gagtcccatt tgggagcaag agccatctac tegtccgtta cgggccttcc 100
 15 caccatggat tgccaagaaa atgagtactg ggaccaatgg ggacgggtgtg 150
 tcacctgcca acgggtgtggt cctggacagg agctatccaa ggattgtggt 200
 20 tatggagagg gtggagatgc ctactgcaca gcctgccctc ctgcgaggta 250
 caaaagcagc tggggccacc acaaattgtca gagttgcac ac 292

25
 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <221> Secuencia artificial
 <222> 1-21
 <223> La secuencia está sintetizada
 35 <400> 8
 gagggggctg ggtgagatgt g 21
 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <221> Secuencia artificial
 <222> 1-22
 <223> La secuencia está sintetizada
 45 <400> 9
 tgcttttga cctgcgagga gg 22
 <210> 10
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> Artificial
 <220>
 <221> Secuencia artificial
 <222> 1-22
 <223> La secuencia está sintetizada
 55 <400> 10
 catggtggga aggccggtaa cg 22
 <210> 11
 <211> 28
 <212> ADN
 60 <213> Artificial
 <220>
 <221> Secuencia artificial
 <222> 1-28
 <223> La secuencia está sintetizada
 65 <400> 11
 gattgccaag aaaatgagta ctgggacc 28

<210> 12
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <221> Secuencia artificial
 <222> 1-35
 <223> La secuencia está sintetizada
 <400> 12
 10 ggaggatcga taccatggat tgccaagaaa atgag 35
 <210> 13
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <221> Secuencia artificial
 <222> 1-41
 <223> La secuencia está sintetizada
 <400> 13
 20 ggaggagcgg ccgcttaagg gctgggaact tcaaaggga c 41

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo aislado que se une específicamente a un polipéptido DNA101848 que comprende los residuos de aminoácidos 1 a 297 de la SEQ ID NO: 6 y es capaz de inhibir la unión de EDA-A2 a dicho polipéptido DNA101848.
2. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
3. Anticuerpo, según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo está humanizado.
- 10 4. Anticuerpo, según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es capaz de inhibir una actividad biológica de EDA-A2 que es la activación de NF-KB.
- 15 5. Anticuerpo, según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, que es capaz de inhibir la unión de EDA-A2 a dicho polipéptido DNA101848 en por lo menos un 50%, en comparación con una molécula de control negativa.
6. Anticuerpo, según la reivindicación 5, que es capaz de inhibir la unión de EDA-A2 a dicho polipéptido DNA101848 en por lo menos un 90%, en comparación con una molécula de control negativa.
- 20 7. Composición que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y, opcionalmente, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.
- 25 8. Método *in vitro* de inhibición de la actividad biológica del polipéptido EDA-A2 que es la activación de NF-KB en células de mamífero, que comprende exponer dichas células de mamífero a un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
9. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para utilizar en un método de inhibición de la actividad biológica del polipéptido EDA-A2 que es la activación de NF-KB en células de mamífero.
- 30 10. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para utilizar en un método de tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer en un mamífero.
- 35 11. Utilización de un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad relacionada con el sistema inmunitario o el cáncer en un mamífero.

1 ACCATGGATT GCCAAGAAAA TGAGTACTGG GACCAATGGG GACGGTGTGT CACCTGCCAA CGGTGTGGTC CTGGACAGGA GCTATCCAA GATGTGGTT
 TGGTACCTAA CGGTTCTTTT ACTCATGACC CTGGTTACCC CTGCCACACA GTGGACGGTT GCCACACCAG GACCTGTCTT CGATAGGTTT CTAACACCAA
 ^ORF^ empieza aquí
 ^ repetición 1 rica en cisteínas

101 ATGGAGAGGG TGGAGATGCC TACTGCACAG CTTGCCCTCC TCGCAGGTAC AAAGCAGCT GGGGCCACCA CAGATGTCAG AGTTGCATCA CCTGTGCTGT
 TACCTCTCCC ACCTCTACGG ATGACGTGTC GGACGGGAGG AGCGTCCATG TTTTCGTGCA CCCCGTGGT GTCTACAGTC TCAACGTA GTGACAGACA
 ^ repetición 2 rica en cisteínas

201 CATCAATCGT GTTCAGAAGG TCAACTGCAC AGCTACCTCT AATGCTGTCT GTGGGGACTG TTTGCCCAGG TTCTACCGAA AGACACGCAT TGGAGGCCCTG
 GTAGTTAGCA CAAGTCTTCC AGTTGACGTG TCGATGGAGA TTACGACAGA CACCCCTGAC AAACGGGCTT AAGATGGCTT TCTGTGCGTA ACCTCCGGAC
 ^ repetición 3 rica en cisteínas

301 CAGGACCAAG AGTGCATCCC GTGCACGAAG CAGACCCCCA CCTCTGAGGT TCAATGTGCC TTCCAGTTGA GCTTAGTGGA GGC AGATGCA CCCACAGTGC
 GTCTGTGTTT TCACGTAGGG CACGTGCTTC GTCTGGGGGT GGAGACTCCA AGTTACACGG AAGTCAACT CGATCACCT CCGTCTACGT GGGTGTACAG

401 CCCCTCAGGA GGCCACACTT GTTGCACTGG TGAGCAGCCT GCTAGTGGT TTTACCTGG CCTTCCTGG GCTCTCTCTC CTCTACTGCA AGCAGTTCTT
 GGGGAGTCTT CCGGTGTGAA CAACGTGACC ACTCTCGGA CGATCACCAC AAATGGGACC GGAAGGACCC CGAGAAGAAG GAGATGACGT TCGTCAAGAA
 ^ dominio transmembrana

501 CAACAGACAT TGCCAGCGTG TTACAGGAGG TTTGTGTCAG TTTGAGGCTG ATAAACAGC AAAGGAGG... TCTCTCTTCC CCGTGCCACC CAGCAAGGAG
 GTTGTCTGTA ACGGTGCGAC AATGTCTTCC AAACGACGTC AACTCCGAC TATTTTGTG TTTCTCTCTT AGAGAGAAGG GGCACGGTGG GTCGTTCTCT

601 ACCAGTGCTG AGTCCCAAGT GAGTGAGAAC ATCTTTCAGA CCCAGCCACT TAACCTATC CTCGAGGAGC ACTGCAGCTC GACTAGTGGC TTCCCCACAC
 TGGTCACGAC TCAGGGTTCA CTCACTCTTG TAGAAAGTCT TAGAAAGTCT GGGTCCGGTGA ATTGGGATAG GAGTCTCTGC TGACGTGAG CTGATCACCG AAGGGGTGTG

701 AGGAGTCTT TACCATGGCC TCCTGCACCT CAGAGAGCCA CTCCCACTGG GTCCACAGCC CCATCGAATG CACAGAGCTG GACCTGCAA AGTTTTCAC
 TCCTCAGGAA ATGGTACCGG AGGACGTGGA GTCTCTCGGT GAGGTGACC CAGGTGTCGG GTTAGCTTAC GTGTCTGAC CTGGACGTTT TCATAAGGTC

801 CTCTGCCTCC TATACTGGAG CTGAGACCTT GGGGGGAAAC ACAGTCGAAA GCACCTGGAGA CAGGCTGGAG CTCATATGTC CCTTTGAAGT TCCCAGCCCT
 GAGACGGAG ATATGACCTC GACTCTGGAA CCCCCCTTG TGTACGCTT CGTGACCTCT GTCCGACCTC GAGTTACAG GGAACCTCA AGGGTCGGGA

901 TAAGC
 ATTCG

Figura 1

```

      10      20      30      40      50
MDCQENEYWDQWGRVCVTCQRCGPGQELSKDCGYGEGGDAYCTACPPRRYK

      60      70      80      90     100
SSWGHHRQCSCITCAVINRVQKVNCTATSNVCGDCLPRFYRKTRIGGLQ

     110     120     130     140     150
DQECIPCTKQTPTSEVQCAFQLSLVEADAPTVPPEATLVALVSSLLVVF

     160     170     180     190     200
TLAFLGLFFLYCKQFFNRHCQRVTGGLLQFEADKTAKEESLFPVPPSKET

     210     220     230     240     250
SAESQVSENIQFTQPLNPILEDDCSSTSGFPTQESFTMASCTSESHSHWV

     260     270     280     290
HSPIECTELDLQKFSSSASYTGAETLGGNTVESTGDRLELNVPFEVPSP
  
```

Figura 2

```

      10      20      30      40      50
MDCQENEYWDQWGRVCVTCQRCGPGQELSKDCGYGEGGDAYCTACPPRRYK

      60      70      80      90     100
SSWGHHRQCSCITCAVINRVQKVNCTATSNVCGDCLPRFYRKTRIGGLQ

     110     120     130     140     150
DQECIPCTKQTPTSEVQCAFQLSLVEADAPTVPPEATLVALVSSLLVVF

     160     170     180     190     200
TLAFLGLFFLYCKQFFNRHCQRGGLLQFEADKTAKEESLFPVPPSKETSA

     210     220     230     240     250
ESQVSENIQFTQPLNPILEDDCSSTSGFPTQESFTMASCTSESHSHWVHS

     260     270     280     290
PIECTELDLQKFSSSASYTGAETLGGNTVESTGDRLELNVPFEVPSP
  
```

Figura 4

1 ACCATGGATT GCCAAGAAA TGAGTACTGG GACCAATGGG GACGGTGTGT CACCTGCCAA CGGTGTGGTC CTGGACAGGA GCTATCCAAG GATTGTGGTT
 TGGTACCTAA CGGTTCTTTT ACTCATGACC CTGGTTACCC CTGCCACACA GTGGACGGTT GCCACACCAG GACCTGTCTT CGATAGGTTT CTAACACCAA
 ^ORF empieza aquí
 ^repetición 1 rica en cisteínas
 101 ATGGAGAGGG TGGAGATGCC TACTGCACAG CCTGCCCTCC TCGCAGGTAC AAAAGCAGCT GGGGCCACCA CAGATGTCAG AGTTGCATCA CCTGTGCTGT
 TACCTCTCCC ACCTCTACGG ATGACGTGTC GGACGGGAGG AGCTCCATG TTTTCGTGCA CCCCGTGGT GTCTACAGTC TCAACGTAGT GGACACGACA
 ^repetición 2 rica en cisteínas
 201 CATCAATCGT GTTCAGAAGG TCAACTGCAC AGCTACCTCT AATGCTGTCT GTGGGGACTG TTTGGCCAGG TTCTACCGAA AGACACGCAT TGGAGGGCCTG
 GTAGTTAGCA CAAGTCTTCC AGTTGACGTG TCGATGGAGA TTACGACAGA CACCCCTGAC AAACGGGTCC AAGATGGCTT TCTGTGCGTA ACCTCCGGAC
 ^repetición rica en cisteínas
 301 CAGGACCAAG AGTGCATCCC GTGCACGAAG CAGACCCCCA CCTCTGAGT TCAATGTGCC TTCCAGTTGA GCTTAGTGA GGCAGATGCA CCCACAGTGC
 GTCTGTGGTT TCACGTAGGG CACGTGCTTC CAGTGGGTTT GTCTGGGGGT GGAGACTCCA AGTTACACGG AAGTCAACT CGATCACCT CCGTCTACGT GGGTGTACCG
 401 CCCCTCAGGA GGCCACACTT GTTGCACTGG TGAGCAGCCT GCTAGTGGTG TTTACCCTGG CCTCCCTGGG GCTCTCTTTC CTCTACTGCA AGCAGTTCTT
 GGGGAGTCCT CCGGTGTGAA CAACGTGACC ACTCGTCGGA CGATCACCAC AAATGGGACC GGAAGGACCC CGAGNAGAAG GAGATGACGT TCGTCAAGAA
 ^dominio transmembrana
 501 CAACAGACAT TGCCAGCGTG GAGGTTTGTCT GCAGTTTGAG GCTGATAAAA CAGCAAAGGA GGAATCTCTC TTCCCCGTGC CACCCAGCAA GGAGACCAGT
 GTTGTCTGTA ACGGTGCGAC CTCCAAACGA CGTCAAACTC CGACTATTTT GTCGTTTCTT CCTTAGAGAG AAGGGGCACG GTGGGTCTGT CCTCTGGTCA
 601 GCTGAGTCCC AAGTGAGTGA GAACATCTTT CAGACCCAGC CACTTAACCC TATCCTCGAG GACGACTGCA GCTCGACTAG TGGCTTCCCC ACACAGGAGT
 CGACTCAGGG TTCACTCACT CTGTGAGAAA GTCTGGGTCTG GTGAATGGG ATAGGAGCTC CTGCTGACGT CGAGCTGATC ACCGAAGGGG TGTGTCTCTCA
 701 CCTTTACCAT GGCCTCCTGC ACCTCAGAGA GCCACTCCA CTGGGTCCAC AGCCCCATCG AATGCACAGA GCTGGACCTG CAAAAGTTT CCAGCTCTGC
 GGAAATGGTA CCGGAGGACG TGGAGTCTCT TGGAGTCTCT CGGTGAGGCT GACCCAGGTG TCGGGGTAGC TTACGTGTCT CGACCTGGAC GTTTTCAAAA GGTGAGACG
 801 CTCCTATACT GGAGCTGAGA CCTTGGGGGG AAACACAGTC GAAAGCACTG GAGACAGGCT GGAGCTCAAT GTGCCCTTTG AAGTTCCAG CCCTTAAGC
 GAGGATATGA CCTCGACTCT GGAACCCCCC TTTGTGTCTG CTTTGTGAC CTCTGTCCGA CCTCGAGTTA CACGGGAAAC TTCAAGGGTC GGGAAATTCG

Figura 3

<297 emparejamientos en un solapamiento de 299: 99,3 % de similitud
 <espacios en la primera secuencia: 1 (2 residuos), espacios en la segunda secuencia: 0
 <valoración: 1598 (matriz Dayhoff PAM 250, penalización por espacios = 8 + 4 por residuo)
 <espacios finales no penalizados

	10	20	30	40	50
DNA101848	MDCQENEYWDQWGRCVTCQRCGPGQELSKDCGYGEGGDAYCTACPPRRYK				

DNA98853	MDCQENEYWDQWGRCVTCQRCGPGQELSKDCGYGEGGDAYCTACPPRRYK				
	10	20	30	40	50
	60	70	80	90	100
DNA101848	SSWGHHRQCSCITCAVINRVQKVNCTATSNVCGDCLPRFYRKTRIGGLQ				

DNA98853	SSWGHHRQCSCITCAVINRVQKVNCTATSNVCGDCLPRFYRKTRIGGLQ				
	60	70	80	90	100
	110	120	130	140	150
DNA101848	DQECIPCTKQTPTSEVQCAFQLSLVEADAPTVPPEATLVALVSSLLVVF				

DNA98853	DQECIPCTKQTPTSEVQCAFQLSLVEADAPTVPPEATLVALVSSLLVVF				
	110	120	130	140	150
	160	170	180	190	
DNA101848	TLAFLGLFFLYCKQFFNRHCQR--GLLQFEADKTAKEESLFPVPPSKET				

DNA98853	TLAFLGLFFLYCKQFFNRHCQRVTGLLQFEADKTAKEESLFPVPPSKET				
	160	170	180	190	200
	200	210	220	230	240
DNA101848	SAESQVSENIQTQPLNPILEDDCSSTSGFPTQESFTMASCTSESHSHWV				

DNA98853	SAESQVSENIQTQPLNPILEDDCSSTSGFPTQESFTMASCTSESHSHWV				
	210	220	230	240	250
	250	260	270	280	290
DNA101848	HSPLECTELDLQFSSSASYTGAETLGGNTVESTGDRLELNVPFEVPSP				

DNA98853	HSPLECTELDLQFSSSASYTGAETLGGNTVESTGDRLELNVPFEVPSP				
	260	270	280	290	

Figura 5

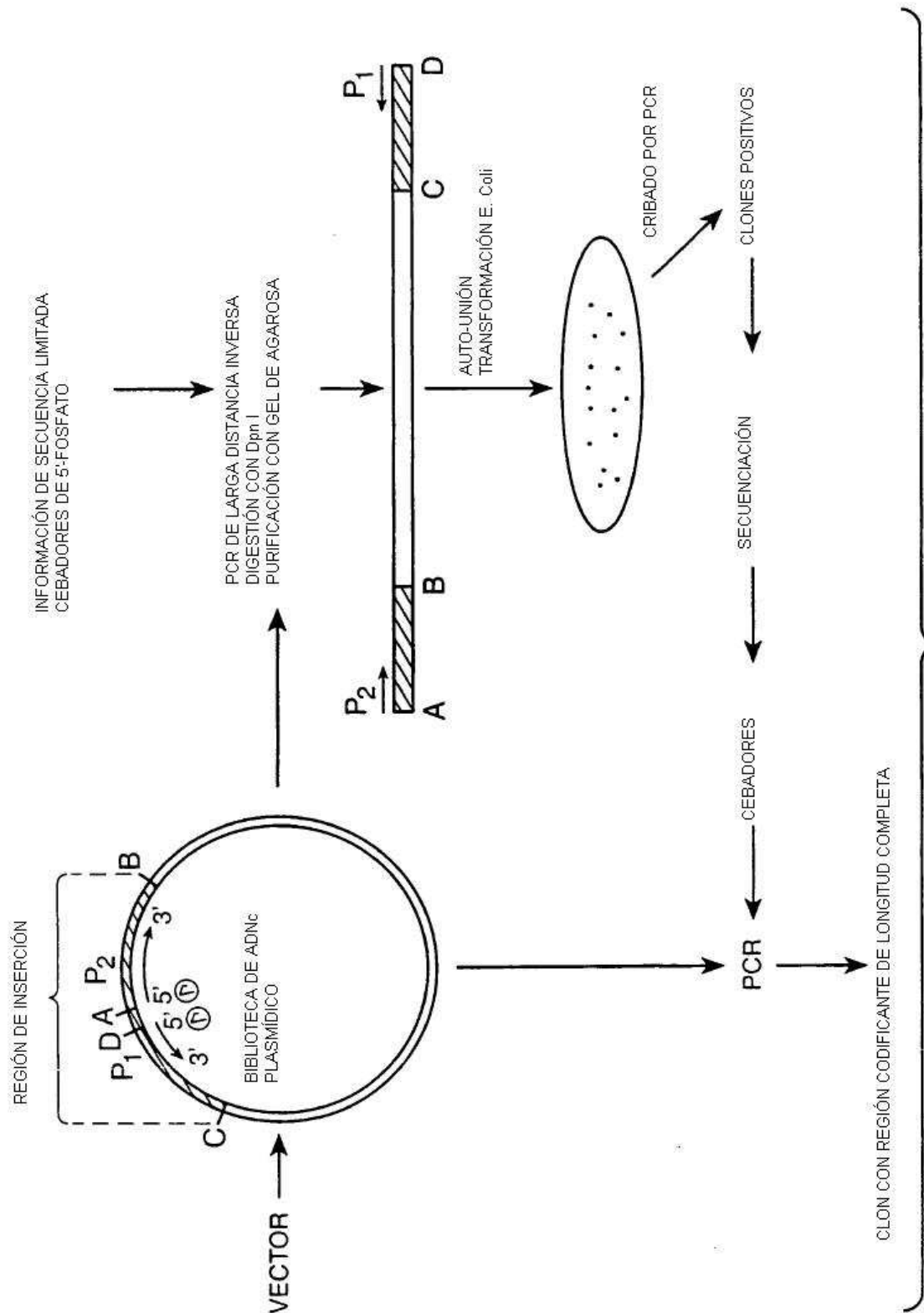


Figura 6

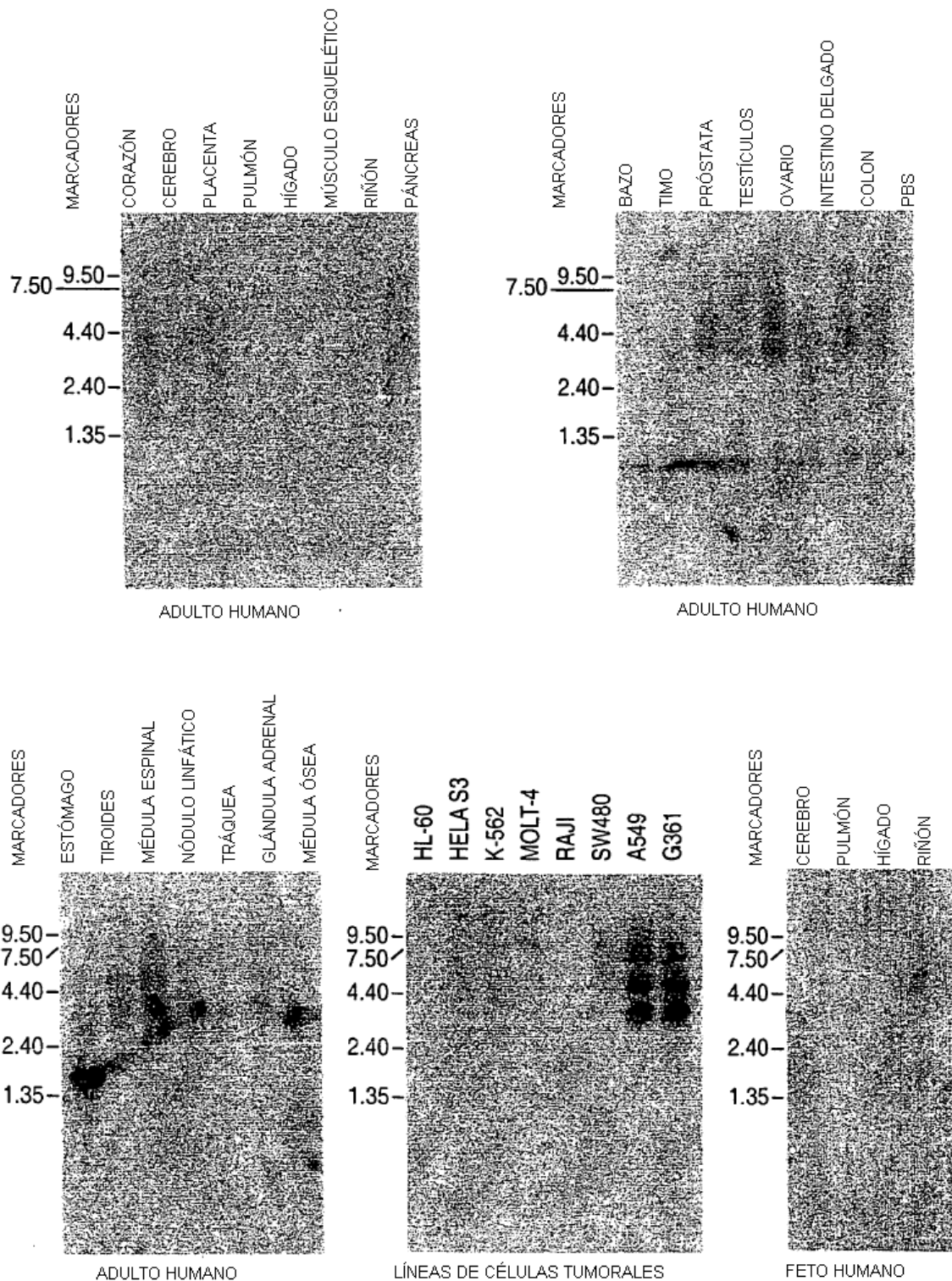


Figura 7

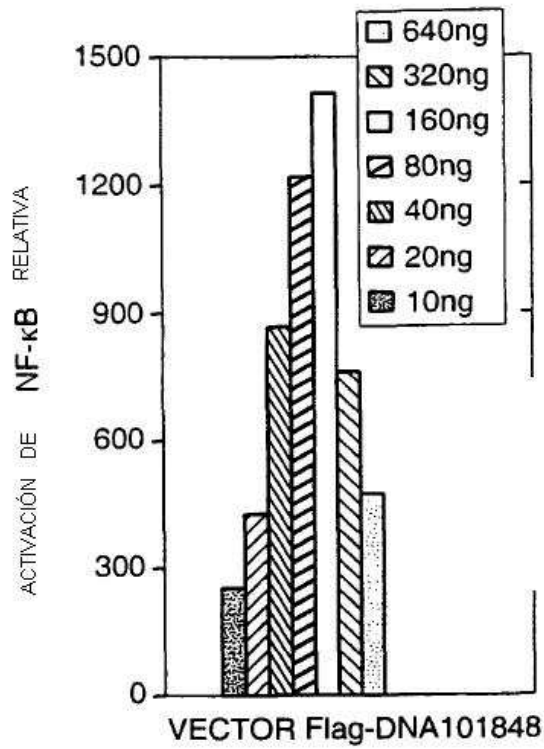


Figura 8A

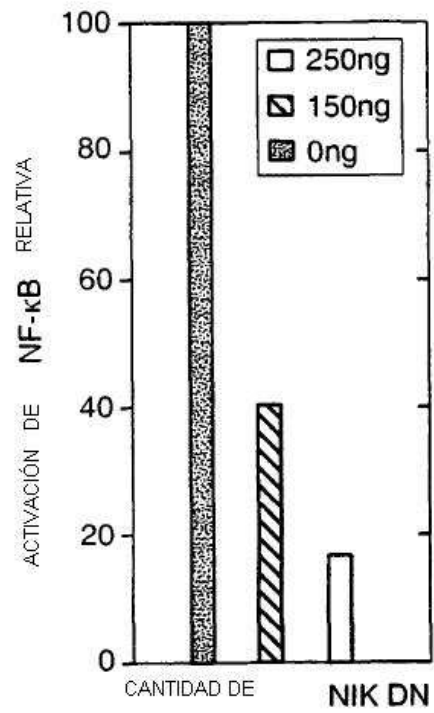


Figura 8B

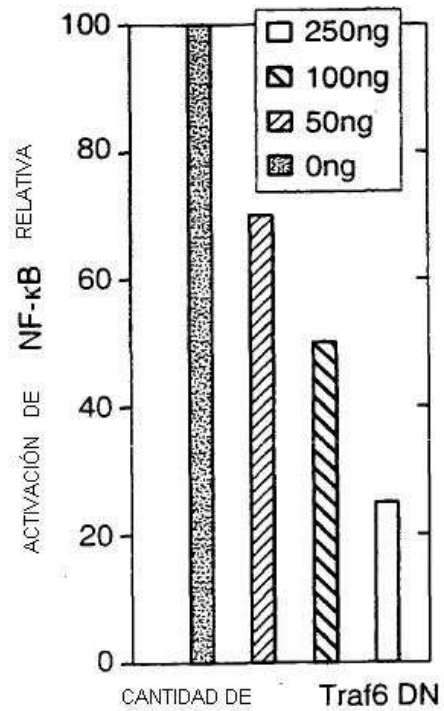
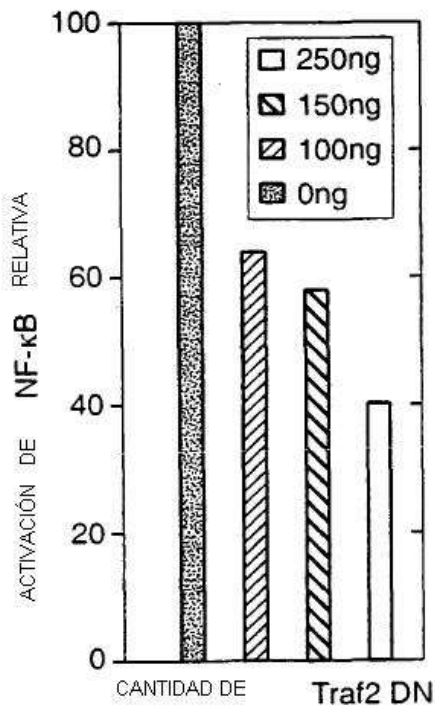


Figura 8C

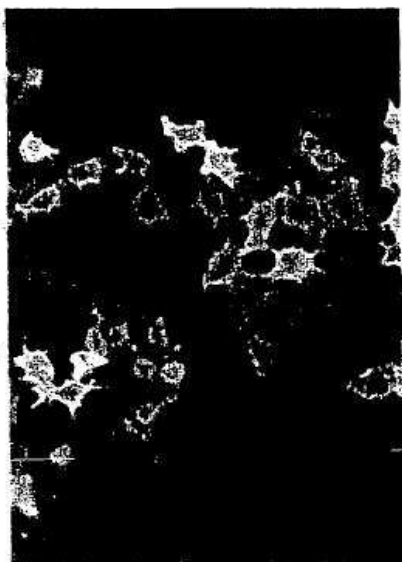
1 GGAGGGGGCT GGGTGAGATG TGTGCTCTGC GCTGAGGTGG ATTGTACCG GAGTCCCATT TGGGAGCAAG AGCCATCTAC TCGTCGGTTA CCGGCCCTTCC
CCTCCCCCGA CCCACTCTAC ACACGAGCG CGACTCCACC TAAACATGGC CTCAGGGTAA ACCCTCGTTC TCGGTAGATG AGCAGGCAAT GGCCTGGGAGG
^cebador codificante 509-1 ^cebador izquierdo 1: 509-p5

101 CACCATGGAT TGCCNAGAAA ATGAGTACTG GGACCAATGG GGACGGGTGG TCACCTGCCA ACGGTGTGGT CCTGGACAGG AGCTATCCAA GGATTGTGGT
GTGGTACCTA ACGGTTCTTT TACTCATGAC CCTGTTTACC CCTGCCACAC AGTGGACGGT TGCCACACCA GGACCTGTCC TCGATAGGTT CCTAACACCA
^cebador derecho 2: 509-p6

201 TATGGAGAGG GTGGAGATGC CTACTGCACA GCCTGCCCTC CTCGCAGGTA CAAAAGCAGC TGGGGCCACC ACAATGTCA GAGTTGCATC AC
ATACCTCTCC CACCTCTACG GATGACGTGT CGGACGGGAG GAGCGTCCAT GTTTTCGTCTG ACCCCGGTGG TGTTTACAGT CTCAACGCTAG TG
^cebador codificante 509-4AS

Figura 9

Flag-DNA101848



DNA101848-Flag

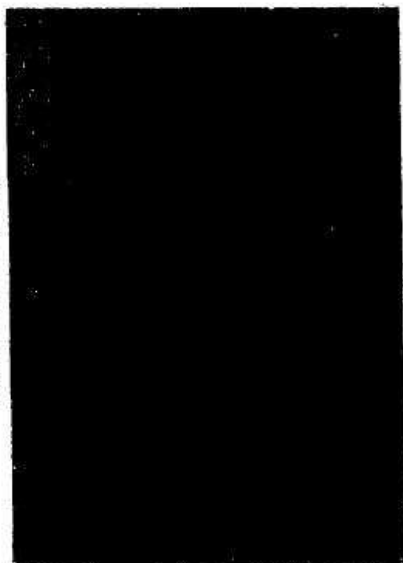


Figura 10A

Figura 10B

Flag-DNA101848



DNA101848-Flag



Figura 10C

Figura 10D

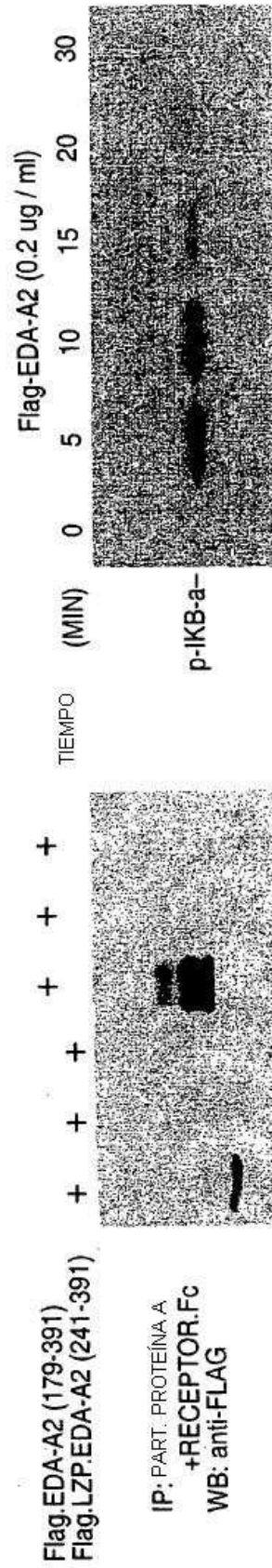
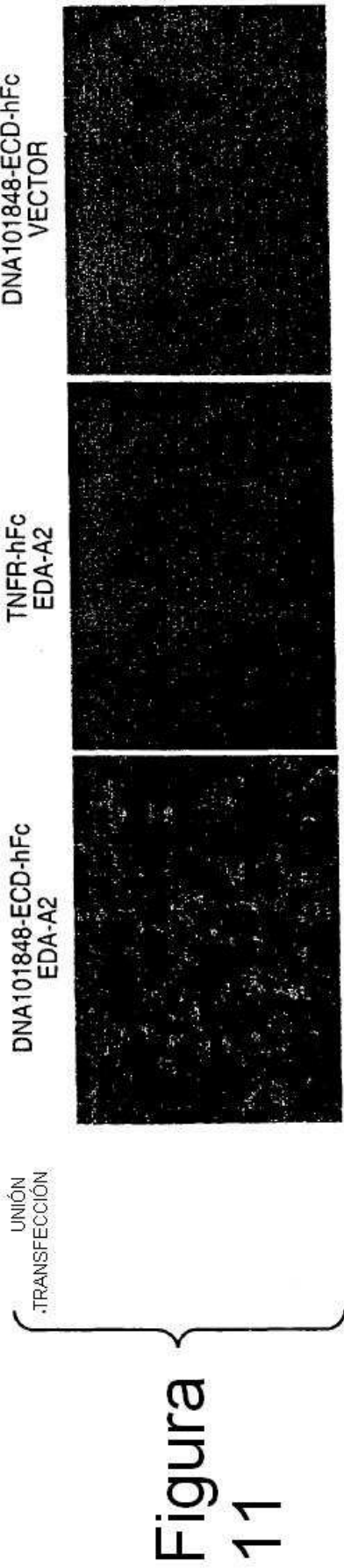


Figura 15A

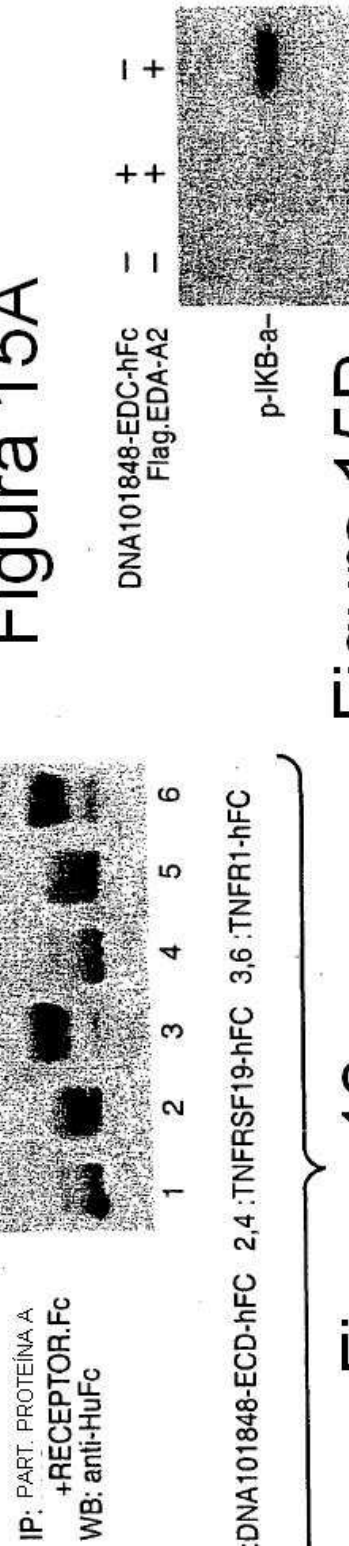


Figura 15B

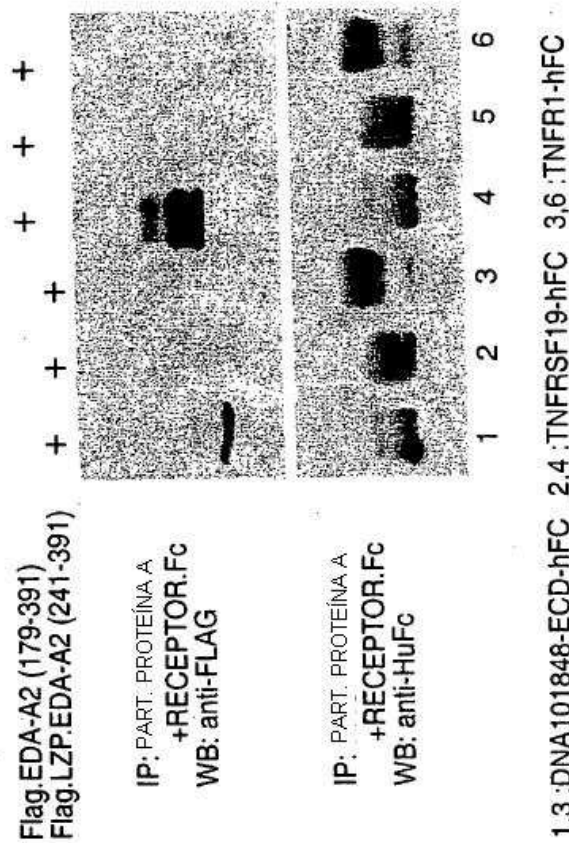


Figura 13

UNIÓN : Δ P-EDA-A2
TRANSFECCIÓN: DNA101848

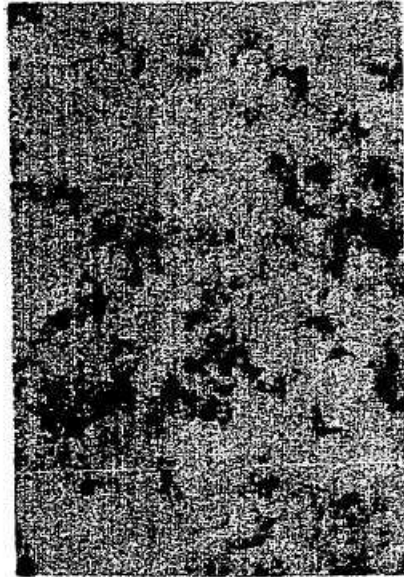


Figura 12A

UNIÓN : AP-EDA-A2
TRANSFECCIÓN: VECTOR

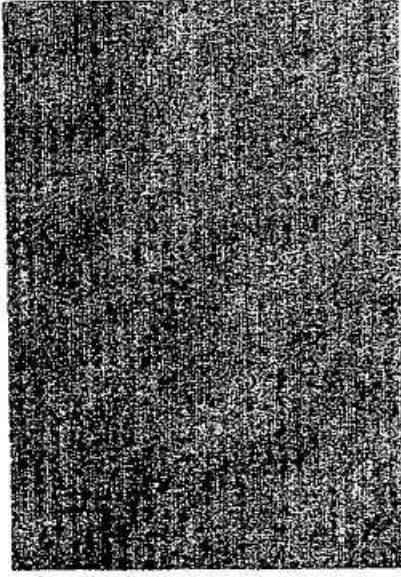


Figura 12B

UNIÓN : AP-TNF α
TRANSFECCIÓN: DNA101848

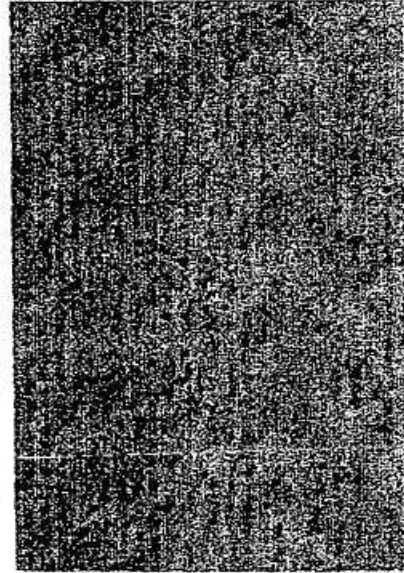


Figura 12C

UNIÓN : AP-TALL-1
TRANSFECCIÓN: DNA101848

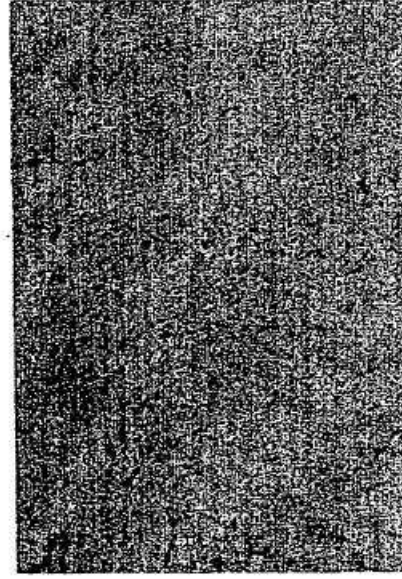


Figura 12D

