(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 472 690**

(51) Int. CI.:

C07K 16/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2004 E 10010044 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014 EP 2295073**

(54) Título: **Anticuerpo contra CD22 para el tratamiento de tumores de origen hematopoyético**

(30) Prioridad:

17.11.2003 US 520842 P
24.12.2003 US 532426 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2014

(73) Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080-4990, US

(72) Inventor/es:

CROWLEY, CRAIG;
DESAUVAGE, FREDERIC;
EATON, DAN;
EBENS, ALLEN;
POLSON, ANDREW y
SMITH, VICTORIA

(74) Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

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

Anticuerpo contra CD22 para el tratamiento de tumores de origen hematopoyético

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de materia para utilizar en el tratamiento de tumores hematopoyéticos en mamíferos y a procedimientos de utilización de estas composiciones de materia para los mismos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] Los tumores malignos (cáncer) son la segunda causa de muerte en los Estados Unidos, después de las enfermedades del corazón (Boring et al., CA Cancer J Clin., 43:7 [(1993]). El cáncer se caracteriza por el incremento en el número de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión de tejidos adyacentes por estas células tumorales neoplásicas, y la generación de células malignas que finalmente se extienden a través de la sangre o el sistema linfático hasta nódulos linfáticos regionales y hasta puntos distantes a través de un proceso denominado metástasis. En un estado canceroso, una célula prolifera bajo condiciones en las que no crecerían células normales. El cáncer se manifiesta en una gran variedad de formas, caracterizadas por diferentes grados de invasión y agresividad.

[0003] Los cánceres que implican células generadas durante la hematopoyesis, un proceso mediante el cual se generan elementos celulares de la sangre, tales como linfocitos, leucocitos, plaquetas, eritrocitos y células asesinas ("killers") naturales, se refieren como cánceres hematopoyéticos. Los linfocitos que se pueden encontrar en la sangre y el tejido linfático y que son críticos para la respuesta inmune se clasifican en dos clases principales de linfocitos: linfocitos B (células B) y linfocitos T (células T), que median en la inmunidad humoral y medida por células, respectivamente.

[0004] Las células B maduran en la médula ósea y dejan que la médula exprese un anticuerpo de unión a antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B intacta encuentra primero el antígeno para el que su anticuerpo unido a membrana es específico, la célula empieza a dividirse rápidamente y su progenie a diferenciarse en células B de memoria y células efectoras denominadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen una esperanza de vida más larga y continúan expresando el anticuerpo unido a membrana con la misma especificidad que la célula parenteral original. Las células plasmáticas no producen el anticuerpo unido a membrana, pero en cambio producen el anticuerpo en una forma que se puede secretar. Los anticuerpos secretados son la molécula efectora principal de la inmunidad humoral.

[0005] Las células T maduran en el timo que proporciona un ambiente para la proliferación y diferenciación de células T inmaduras. Durante la maduración de células T, las células T realizan el reajuste de genes que producen el receptor de células T y la selección positiva y negativa que ayuda a determinar el fenotipo de la superficie celular de la célula T madura. Los marcadores característicos de la superficie celular de células T maduras son el complejo CD3:receptor de célula T y uno de sus correceptores, CD4 o CD8.

[0006] En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para la terapia contra el cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana u otros polipéptidos asociados a membranas que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a membrana se expresan de manera más abundante en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de polipéptidos antígenos de la superficie celular asociados a tumores ha proporcionado la capacidad de reconocer específicamente células cancerosas para la destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos. En este aspecto, cabe indicar que la terapia basada en anticuerpos se ha demostrado muy eficaz en el tratamiento de ciertos tumores. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambas de Genentech Inc, South San Francisco, California) son anticuerpos que se han utilizado satisfactoriamente para tratar el cáncer de mama y el linfoma de no Hodgkin, respectivamente. Más específicamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Se observa la sobreexpresión de la proteína HER2 en el 25-30% de cánceres de mama primarios. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales u malignos. Estos anticuerpos se producen recombinantemente en células CHO.

[0007] En otros intentos por descubrir dianas celulares eficaces para la terapia contra el cáncer, los investigadores han buscado identificar (1) polipéptidos no asociados a membrana que son producidos específicamente por uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación a por uno o más tipos particulares de células normales no cancerosas, (2) polipéptidos que son producidos por células cancerosas en un nivel de expresión que es significativamente más elevado que el de una o más células normales no cancerosas, o (3) polipéptidos cuya expresión está limitada específicamente a sólo un tipo de tejido (o a un número muy limitado de diferentes tejidos)

tanto en estado canceroso como no canceroso (por ejemplo, tejido de próstata normal y de tumor de próstata). Dichos polipéptidos pueden permanecer localizadas intracelularmente o se puede secretar por la célula cancerosa. Además, dichos polipéptidos pueden expresarse no por la propia célula cancerosa, sino por células que producen y/o secretan polipéptidos que tienen un efecto potenciador o un efecto de aumento del crecimiento en células cancerosas. Dichos polipéptidos secretados son a menudo proteínas que proporcionan células cancerosas con una ventaja de crecimiento sobre las células normales e incluyen cosas, tales como factores angiogénicos, factores de adhesión celular, factores de crecimiento, y similares. Se esperaría que la identificación de antagonistas de dichos polipéptidos no asociados a membrana sirviera como agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de dichos cánceres. Además, la identificación del patrón de expresión de dichos polipéptidos sería útil para el diagnóstico de cánceres particulares en mamíferos.

[0008] A pesar de los avances identificados anteriormente en la terapia contra el cáncer en mamíferos, existe una gran necesidad de agentes terapéuticos adicionales capaces de detectar la presencia de tumores en un mamífero y para inhibir de manera eficaz el crecimiento de células neoplásicas, respectivamente. Por consiguiente, un objetivo de la presente solicitud es identificar polipéptidos, polipéptidos asociados a membrana, secretados o intracelulares, cuya expresión está limitada específicamente a un único tipo de tejido (o un número muy limitado de diferentes tipos de tejido), tejidos hematopoyéticos, tanto en estado canceroso o no canceroso, y utilizar estos polipéptidos, y sus ácidos nucleicos codificantes, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico para la detección de cáncer hematopoyético en mamíferos.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

A. Realizaciones

[0009] En la presente memoria, los solicitantes describen por primera vez la identificación de varios polipéptidos celulares (y sus ácidos codificantes o fragmentos de los mismos) que son expresados específicamente tanto por células tumorales como normales de un tipo de célula específico, por ejemplo, células generadas durante la hematopoyesis, es decir, linfocitos, leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Todos los polipéptidos anteriores se refieren aquí como polipéptidos Antígenos tumorales de Origen Hematopoyético (polipéptidos “TAHO”) y se espera que sirvan como dianas eficaces para la terapia contra el cáncer en mamíferos.

[0010] Por consiguiente, el presente documento describe una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antígeno tumoral de origen hematopoyético (un polipéptido “TAHO”) o un fragmento del mismo.

[0011] En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido TAHO de longitud completa que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se ha descrito aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se ha descrito aquí o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0012] En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menso aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, con (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificante de un ADNc del polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí, la secuencia codificante de un polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, la secuencia codificante de un dominio extracelular de un polipéptido TAHO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o la secuencia codificante de cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0013] En aspectos adicionales, el presente documento describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por la región codificante de longitud completa de cualquiera de los ADNcs de proteína humana depositados con la ATCC tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0014] Otro aspecto del presente documento describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una

secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAHO que presenta el dominio transmembrana eliminado o inactivado, o es complementaria a dicha secuencia codificante, donde el dominio o dominios transmembrana de dicho polipéptido o polipéptidos se describen aquí. Por lo tanto, se contemplan los dominios extracelulares solubles de los polipéptidos TAHO descritos aquí.

[0015] En otros aspectos, la presente solicitud describe moléculas de ácido nucleico aisladas que se hibridan a (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAHO que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a). En este aspecto, los fragmentos de una secuencia codificante del polipéptido TAHO de longitud completa, o el complemento de la misma, tal como se describe aquí, pueden ser útiles como, por ejemplo, sondas de hibridación útiles como, por ejemplo, sondas de detección, sondas de oligonucleótidos no codificante, o para codificar fragmentos de un polipéptido TAHO de longitud completa que pueden codificar opcionalmente un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti-polipéptido TAHO, un oligopéptido de unión TAHO u otra molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAHO. Dichos fragmentos de ácidos nucleicos tienen normalmente por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 83, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término “aproximadamente” significa la longitud de la secuencia de nucleótidos referenciada más o menos un 10% de la longitud referenciada. Cabe indicar que se pueden determinar fragmentos novedosos de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAHO de manera rutinaria mediante la alineación de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAHO con otras secuencias de nucleótidos conocidas utilizando cualquiera de un conjunto de programas de alineación de secuencias bien conocidos y determinando qué fragmento o fragmentos de la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido TAHO son nuevos. Se contemplan en la presente invención todos estos fragmentos nuevos de secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido TAHO. También se contemplan los fragmentos de polipéptido TAHO codificados por estos fragmentos de moléculas nucleótidos, preferiblemente aquellos fragmentos de polipéptido TAHO que comprenden un sitio de unión por un anticuerpo anti-TAHO, un oligopéptido de unión a TAHO u otra molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAHO.

[0016] También se describen en el presente documento polipéptidos TAHO aislados codificados por cualquier de las secuencias de ácidos nucleicos aisladas identificadas anteriormente aquí.

[0017] En un cierto aspecto, el presente documento describe un polipéptido TAHO aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de aminoácidos, con un polipéptido TAHO que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de una proteína polipéptido TAHO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas aquí o cualquier otro fragmento de específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí.

[0018] En un aspecto adicional, , el presente documento describe un polipéptido TAHO aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNcs de proteína humana depositados con la ATCC tal como se describe aquí.

[0019] En un aspecto específico, el presente documento describe un polipéptido TAHO aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o sin la metionina de iniciación y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos descrita anteriormente en la presente invención. Los procesos para producir el mismo también se describen en la presente invención, donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAHO y recuperar el polipéptido TAHO del cultivo celular.

[0020] También se describe un polipéptido TAHO aislado que presenta el dominio transmembrana eliminado o inactivado. Los procesos para producir el mismo también se describen aquí, donde estos procesos comprenden

cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAHO y recuperar el polipéptido TAHO del cultivo celular.

[0021] También se describen vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos aquí. También se describen las células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células E. coli, o células de levadura. Se describe también un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos aquí y comprende cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

[**0022**] También se describen polipéptidos quiméricos aislados que comprende cualquiera de los polipéptidos TAHO descritos aquí fusionados a un polipéptido heterólogo (no TAHO). Ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos TAHO descritos aquí fusionados a un polipéptido heterólogo, tal como, por ejemplo, una secuencia epítopo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

[**0023**] La presente invención proporciona un anticuerpo que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 51, con o sin su secuencia señal asociada, para su uso según las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido TAHO a su epítopo antigénico respectivo. Los anticuerpos para utilizar de la presente invención se conjugan a un agente inhibidor del crecimiento o a un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o caliquemicina, un anticuerpo, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similar. Los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para el objetivo de la detección, los anticuerpos se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido o similar.

[0024] También se describen vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos aquí. También se comprende la célula huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células E. coli, o células de levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los anticuerpos descritos aquí y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y recuperar el anticuerpo deseado del cultivo celular.

[**0025**] También se describen oligopéptidos ("oligopéptidos de unión a TAHO") que se unen, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos TAHO descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similar. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas e inducen preferiblemente la muerte de una célula a la que se unen. Para el objetivo de la detección, los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar.

[0026] También se describen vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los oligopéptidos de unión a TAHO descritos aquí. También se comprende la célula huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células E. coli, o células de levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los oligopéptidos de unión a TAHO descritos aquí y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del oligopéptido deseado y recuperar el oligopéptido deseado del cultivo celular.

[**0027**] También se describen moléculas orgánicas pequeñas ("moléculas orgánicas de unión a TAHO") que se unen, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos TAHO descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, las moléculas orgánicas de unión a TAHO se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similar. Las moléculas orgánicas de unión a TAHO inducen preferiblemente la muerte de una célula a la que se unen. Para el objetivo de la detección, las moléculas orgánicas de unión a TAHO se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar.

[0028] También se describe una composición de material que comprende un polipéptido TAHO tal como se describe aquí, un polipéptido TAHO quimérico tal como se describe aquí, un anticuerpo anti-TAHO tal como se describe aquí, un oligopéptido de unión a TAHO tal como se describe aquí, o una molécula orgánica de unión a TAHO tal como se describe aquí, en combinación con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

[**0029**] También se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición de materia

contenida en el recipiente, donde la composición de materia puede comprender un polipéptido TAHO quimérico tal como se describe aquí, un anticuerpo anti-TAHO tal como se describe aquí, un oligopéptido de unión a TAHO tal como se describe aquí, o una molécula orgánica de unión a TAHO tal como se describe aquí. El artículo puede comprender opcionalmente un marcador fijado al recipiente, o un prospecto incluido en el recipiente, que se refiere al uso de la composición de materia para el tratamiento terapéutico.

[0030] Una realización de la presente invención se dirige al uso de un anticuerpo anti-polipéptido TAHO para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad que es sensible al anticuerpo anti-polipéptido TAHO, tal como se define en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0031]
La figura 50 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID NO: 50) de un ADNc de TAHO26 (PRO2177), en la que la SEC ID NO: 50 es un clon designado en el presente documento como "DNA88116" (también referido aquí como "CD22").
La figura 51 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 51) derivada de la secuencia codificante de SEC ID NO. 50 mostrada en la figura 50.

[0032] Las figuras 91A-91D muestran datos de microarrays que muestran la expresión de TAHO26 en muestras normales y en muestras enfermas, tales como la expresión significativa en células B normales. Las abreviaturas utilizadas en las figuras se designan de la siguiente manera: Linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL), nódulo de linfoma normal (NLN), células B normales (NB), células de mieloma múltiple (MM), intestino delgado (intestino d.), hígado fetal (hígado f.), músculo liso (músculo l.), cerebro fetal (cerebro f.), células asesinas (“killer”) naturales (NK), neutrófilos (N’phil), dendrocitos (DC), células B de memoria (mem B), células plasmáticas (PC), células plasmática de médula ósea (BM PC).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

I. Definiciones

[0033] Los términos “polipéptido TAHO” y “TAHO” tal como se utilizan aquí y cuando va seguida inmediatamente por una designación numérica, se refieren a varios polipéptidos, en los que la designación completa (es decir, TAHO/número) se refiere a secuencias de polipéptidos específicas tal como se describen aquí. Los términos “polipéptido TAHO/número” y “TAHO/número” donde el término “número” se proporciona como una designación numérica real tal como se utiliza aquí, comprenden polipéptidos de secuencia nativa, variantes de polipéptidos y fragmentos de polipéptidos de secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que se definen posteriormente aquí). Los polipéptidos TAHO descritos en la presente invención se pueden aislar de un conjunto de fuentes, tales como de tipos de tejido humano y de otras fuentes, o se pueden preparar mediante procedimientos recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido TAHO” se refiere a cada polipéptido TAHO/número individual descrito aquí. Todas las descripciones en esta memoria que se refieren al “polipéptido TAHO” se refieren a cada uno de los polipéptidos individualmente, así como de manera conjunta. Por ejemplo, las descripciones de la preparación, purificación, derivación, formación de anticuerpos a o contra, la formación de oligopéptidos de unión a TAHO a o contra, la formación de moléculas orgánicas de unión a TAHO a o contra, la administración de composiciones que contienen, el tratamiento de una enfermedad con, etc., se refieren a cada polipéptido de la invención individualmente. El término “polipéptido TAHO” también incluye variantes de polipéptidos TAHO/número descritos aquí.

[0034] "TAHO1" también se refiere aquí como "RP105", "CD180" o "LY64". "TAHO2" también se refiere aquí como "CD20" o "MS4A1". "TAHO3" también se refiere aquí como "FcRH2" o "SPAP1". "TAHO4" también se refiere aquí como "CD79A". "TAHO5" también se refiere aquí como "CD79B". "TAHO6" también se refiere aquí como "CR2" o "CD21". "TAH07" también se refiere aquí como "CCR6". "TAHO8" también se refiere aquí como "CD72". "TAHO9" también se refiere aquí como "P2RX5" o "UNQ2170". "TAHO10" también se refiere aquí como "HLA-DOB". "TAHO11" también se refiere aquí como "CXCR5" o "BLR1". "TAHO12" también se refiere aquí como "FCER2" o "CD23". "TAHO13" también se refiere como "GPR2" o "UNQ12100". "TAHO14" también se refiere como "BTig". "TAHO15" también se refiere como "NAG14" o "LRRC4". "TAHO16" también se refiere como "SLGC16270". "TAHO17" también se refiere como "FcRH1" o "IRTA5". "TAHO18" también se refiere como "IRTA2" o "FcRH5". "TAHO19" también se refiere como "ATWD578". "TAHO20" también se refiere como "FcRH3" o "IRTA3". "TAHO21" también se refiere como "IRTA1" o "FcRH4". "TAHO22" también se refiere como "FcRH6" o "FAIL". "TAHO23" también se refiere como "BCMA". "TAHO24" también se refiere como "239287_at". "TAHO25" también se refiere como "CD19". "TAHO26" también se refiere como "CD22". "TAHO27" también se refiere como "CXCR3" o "UNQ8371". "TAHO28" también se refiere como "SILV" o "UNQ1747". "TAHO29" también se refiere como "KCNK4" o "UNQ11492". "TAHO30" también se refiere como "CXorf1 " o "UNQ9197". "TAH031" también se refiere como "LRRN5" o "UNQ256". "TAHO32" también se refiere como "UNQ9308". "TAH033" también se refiere como "IGSF4B" o "UNQ225". "TAHO34" también se refiere como "BC021 178" o "UNQ13267". "TAHO35" también se refiere como "FLJ12681" o "UNQ6034". "TAHO36" también se refiere como "I_928646" o "UNQ12376".

[0035] Un “polipéptido TAHO de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido TAHO derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos TAHO de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido TAHO de secuencia nativa” abarca específicamente las formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido TAHO específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas (“spliced”) alternativamente) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En varias realizaciones de la solicitud, los polipéptidos TAHO de secuencia nativa descritos aquí son polipéptidos de secuencia nativa madura o de longitud completa que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud completa que se muestran en las figuras acompañantes. Los codones de inicio y parada (si se indican) se muestran en negrita y subrayados en las figuras. Los residuos de ácidos nucleicos indicados como una “N” en las figuras acompañantes son cualquier residuo de ácido nucleico. Sin embargo, mientras que el polipéptido TAHO descrito en las figuras acompañantes se inicia con los residuos de metionina denominados aquí como aminoácido en la posición 1 en las figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina localizados cadena arriba o cadena abajo de la posición 1 de aminoácidos en las figuras puedan utilizarse como el residuo de aminoácido de partida de los polipéptidos TAHO.

[0036] El “dominio extracelular” o “ECD” del polipéptido TAHO se refiere a una forma del polipéptido TAHO que está libre esencialmente de los dominios transmembrana y citoplasmático. Generalmente, un ECD del polipéptido TAHO tendrá menos del 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y preferiblemente, tendrá menos del 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos TAHO de la presente invención se identifican siguiendo los criterios utilizados habitualmente en la técnica para la identificación de ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero más probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio tal como inicialmente se identificó aquí. Opcionalmente, por tanto, se contemplan un dominio extracelular de un polipéptido TAHO que puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier extremo de los límites del dominio transmembrana/dominio extracelular tal como se identifica en los Ejemplos o la memoria y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica.

[0037] La localización aproximada de los “péptidos señal” de los diversos polipéptidos TAHO descritos aquí se puede mostrar en la presente memoria y/o las figuras acompañantes. Se ha de remarcar, sin embargo, que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero más probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del límite C-terminal del péptido señal tal como se identificó inicialmente aquí, donde el límite C-terminal del péptido señal puede identificarse según el criterio utilizado de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y et al., Prot Eng, 10:1-6 (1997) y von Heinje y et al., Nucl Acids Res, 14:4683-4690 (1986)). Además, también se ha reconocido, que, en algunos casos, la división de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es totalmente uniforme, dando como resultado más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, cuando su péptido señal se corta en no más de aproximadamente 5 aminoácidos por cualquier extremo del límite C-terminal del péptido señal identificado aquí, y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados por la presente invención.

[0038] “Variante de polipéptido TAHO” significa un polipéptido TAHO, preferiblemente un polipéptido TAHO activo, tal como se define aquí que tiene por lo menos aproximadamente el 80% de identidad en la secuencia con una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido TAHO de longitud completa). Dichas variantes de polipéptido TAHO incluyen, por ejemplo, los polipéptidos TAHO en donde uno o más residuos de aminoácido se añaden, o eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Generalmente, una variante de polipéptido TAHO tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de un polipéptido TAHO de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí. Generalmente, los polipéptidos variantes de TAHO tienen una longitud de por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos, alternativamente de por lo menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 1170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, los polipéptidos variantes de TAHO tendrá no más de una sustitución de aminoácido conservativo en comparación con la secuencia de polipéptido TAHO nativa, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10 sustituciones de aminoácido conservativo en comparación con la secuencia de polipéptido TAHO nativa.

[0039] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del

polipéptido TAHO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido TAHO específica, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0040] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para la secuencia de aminoácidos, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de aminoácidos determinada A que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de aminoácidos a, con, o contra una secuencia de aminoácidos determinada B) se calcula tal y como se indica a continuación:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad en la secuencia de aminoácidos de B a A. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizando este procedimiento, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada “Proteína de comparación” a la secuencia de aminoácidos denominada “TAHO”, donde “TAHO” representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el que el polipéptido “TAHO” de interés que se compara, y “X”, “Y” y “Z” cada uno representa residuos de aminoácidos hipotéticos diferentes. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad en la secuencia de aminoácidos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

[0041] El “polinucleótido variante de TAHO” o “secuencia de ácidos nucleicos variante de TAHO” significa una molécula de ácido nucleico que codifica una polipéptido TAHO, preferiblemente un polipéptido TAHO activo, tal y como se define a continuación y que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa y de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAHO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido TAHO de longitud completa). Habitualmente, un polinucleótido variante de TAHO tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa y longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAHO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

[0042] Habitualmente, los polinucleótidos variantes de TAHO tienen por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60,65,70,75,80, 85, 90, 95, 100,105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980,

990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término “aproximadamente” significa la longitud de la secuencia de nucleótidos referenciada más o menos un 10% de esa longitud referenciada.

[0043] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el TAHO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica TAHO de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0044] En las situaciones en as que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencia de ácidos nucleicos, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

100 veces la fracción W/Z

donde W es el número de nucleótidos identificados como emparejamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en dicha alineación del programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se comprenderá que cuando la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos D, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de C a D no será igual al % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de D a C. Como ejemplos de los cálculos del % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizando este procedimiento, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos denominada “ADN de comparación” a la secuencia de ácidos nucleicos denominada “TAHO-DNA”, donde “TAHO-DNA” representa una secuencia de ácidos nucleicos hipotética que codifica TAHO de interés, “ADN de comparación”, representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico contra la que se compara la molécula de ácido nucleico “TAHO-DNA” de interés, y “N”, “L” y “V” cada uno representa nucleótidos hipotéticos. A menos que se afirme específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos utilizados aquí se obtienen tal como se describe en párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

[0045] En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de TAHO son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido TAHO y que son capaces de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado astringentes, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido TAHO de longitud completa mostrado tal como se describe aquí. Los polipéptidos variantes de TAHO pueden ser aquéllos codificados por un polinucleótido variante de TAHO.

[0046] El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico que codifica un polipéptido TAHO se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAHO de longitud completa de la solicitud (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan). El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico depositado en ATCC se refiere a la parte del ADNc que codifica el polipéptido TAHO que se inserta en el vector depositado con la ATCC (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan (codones de inicio y parada están en negrita y subrayados en las figuras)).

[0047] El término “aislado”, cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos TAHO descritos en la presente invención, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del polipéptido TAHO no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por

lo menos una etapa de purificación.

[0048] Un ácido nucleico “aislada” que codifica un polipéptido TAHO o un ácido nucleico que codifica otro polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislada es una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido se diferencian de la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0049] 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.

[0050] 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.

[0051] La “astringencia” de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0052] “Condiciones astringentes” o “condiciones de astringencia elevada”, tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50^{o}C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42^{o}C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 μg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42^{o}C, con un lavado de 10 min a 42^{o}C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) seguido de un lavado de astringencia elevada de 10 min que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55^{o}C.

[0053] Las “condiciones moderadamente astringentes” se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37^{o}C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50^{o}C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

[0054] El término “epítopo etiquetado”, cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido TAHO o un anticuerpo anti-TAHO fusionado a un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítopo contra el que se puede fabricar un

anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0055] "Activo" o "actividad" para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de un polipéptido TAHO que retiene una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido TAHO nativo o natural, donde la actividad "biológica" se refiere a una función (inhibidora o estimuladora) provocada por un polipéptido TAHO nativo o natural que es diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que se encuentra en un polipéptido TAHO nativo o natural y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que se encuentra en un polipéptido TAHO nativo o natural.

[0056] El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo TAHO descrito aquí. De manera similar, el término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que mimetiza una actividad biológica de un polipéptido TAHO nativo descrito aquí. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes en la secuencia de aminoácidos de polipéptidos TAHO nativos, péptidos, oligonucleótidos no codificante, moléculas orgánicas pequeñas, etc., agonistas o antagonistas. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido TAHO pueden comprender poner en contacto un polipéptido TAHO con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido TAHO.

[0057] "Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refieren a tanto un tratamiento terapéutico como con medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico reconocido. Los necesitados del tratamiento incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno, así como aquéllos propensos a padecer el trastorno o aquéllos a los que debe prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero es "tratado" satisfactoriamente para una cáncer que expresa el polipéptido TAHO si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO según los procedimientos descritos en el presente documento, el paciente muestra una reducción observable y/o medible o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo la extensión del cáncer a tejido blando y hueso; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio, en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en cuestiones de calidad de vida. Siempre que el anticuerpo anti-TAHO o el oligopéptido de unión a TAHO puedan prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, pueden ser citostáticos o citotóxicos. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser sentida por el paciente.

[0058] Los parámetros anteriores para evaluar una tratamiento satisfactorio y una mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos de rutina familiares para el médico. Para la terapia contra el cáncer, se puede medir la eficacia, por ejemplo, mediante la valoración del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la velocidad de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante tests de estadificación y media escaneo óseo y tests de los niveles de calcio y otras enzimas para determinar la expansión hacia los huesos. Los escaneos CT también se pueden realizar para buscar la expansión hacia la pelvis y los nódulos linfáticos en el área. Los rayos X del pecho y la medición de los niveles de enzimas hepáticas mediante procedimientos conocidos se utilizan para buscar metástasis hacia pulmones e hígado, respectivamente. Otros procedimientos de rutina para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia con aguja transrectal (TRNB).

[0059] Para el cáncer de vejiga, que es un cáncer más localizado, los procedimientos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen la evaluación citológica urinaria mediante citoscopía, monitorización de la presencia de sangre en la orina, visualización del tracto urotelial mediante monografía o un pielograma intravenoso, tomografía computerizada (CT) e imagen por resonancia magnética (MRI). La presencia de metástasis distantes se puede evaluar mediante CT del abdomen, rayos X del pecho u obtención de imágenes por radionucleidos del esqueleto.

[0060] Administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutica inicial durante un periodo de tiempo largo. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es cíclico por naturaleza.

[0061] El término "mamífero" con el propósito de tratamiento, o alivio de los síntomas del cáncer, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo el hombre, animales domésticos y de granja, y animales

del zoo, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos etc. Preferiblemente, el mamífero es el hombre.

[0062] La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (a la vez) y la administración consecutiva en cualquier orden.

[0063] “Portadores”, tal como se utiliza aquí, incluyen los potadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos a la célula o al mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones utilizadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Ejemplos de portadores aceptables fisiológicamente incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácido orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferiores a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN^{TM}, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS^{TM}.

[0064] Por "fase sólida" o “soporte sólido” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir o unir un anticuerpo, un oligonucleótido de unión a TAHO o una molécula orgánica de unión a TAHO de la presente solicitud. Ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente invención incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), de polisacáridos (por ejemplo, agarosa), de poliacrilamidas, de poliestireno, de polivinil alcohol y de siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la patente de Estados Unidos no. 4.275.149.

[0065] Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido TAHO o anticuerpo para el mismo o un oligopéptido de unión a TAHO) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0066] Una molécula “pequeña” o molécula orgánica “pequeña” se define en la presente invención por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

[0067] Una “cantidad eficaz” de un polipéptido, anticuerpo, oligopéptido de unión a TAHO, molécula orgánica de unión a TAHO o un agonista o antagonista de los mismos tal como se describe aquí, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un objetivo específicamente indicado. Una “cantidad eficaz” puede determinarse empíricamente y de forma rutinaria, en relación al objetivo indicado.

[0068] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, oligopéptido de unión a TAHO, molécula orgánica de unión a TAHO u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio, en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de “tratamiento” en la presente invención. Siempre que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, puede ser citostático o citotóxico.

[0069] Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un anticuerpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un anticuerpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.

[0070] Una “cantidad citotóxica” de un anticuerpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad citotóxica” de un anticuerpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.

[0071] El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-TAHO individuales (incluyendo agonista, antagonista, y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-TAHO con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-TAHO de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-TAHO (ver a continuación), siempre y cuando muestren la

actividad biológica o inmunológica deseadas. El término “inmunoglobulina” (Ig) se utiliza indistintamente con el anticuerpo de la presente invención.

[0072] Un “anticuerpo aislado” es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) en más de un 95% en peso del anticuerpo determinado por el procedimiento de Lowry, y aún más preferiblemente en más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0073] La unidad básica del anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de la unidad heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y, por tanto, contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente de 150.00 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también está regularmente presenta puentes disulfuro intracatenarios regularmente separados. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas a y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristam G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

[0074] La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen las cadenas pesadas designadas α, δ, ε, γ, y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H, por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

[0075] El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo del tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones armazón (“framework”) (FRs) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas “regiones hipervariables” que tienen cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0076] El término “región hipervariable” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión a antígeno. La región hipervariable comprende generalmente residuos de aminoácidos de una “región determinante de complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L y aproximadamente 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en V_H; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el V_L y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el V_H; Chothia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)).

[0077] El término “anticuerpo monoclonal” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador “monoclonal” no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones, se pueden fabricar mediante el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, animales o vegetales eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature,* 352: 624-628 (1991) y Marks et al, *J. Mol. Biol.,* 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

[0078] Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (véase, Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos “primatizados” que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del viejo Mundo, Simio, etc) y secuencias de la región constante humana.

[0079] Un anticuerpo “intacto” es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un C_L y por lo menos dominios constantes de cadena pesada C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes en la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

[0080] Los “fragmentos de anticuerpos” comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen los fragmentos Fab, Fab’, $F(ab')_2$ y Fv; diabodies; anticuerpos lineales (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0081] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos “Fab” y un fragmento “Fc” residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento de Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, presenta un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ grande único que corresponde aproximadamente a dos fragmentos de Fab unidos por puentes disulfuro que tienen una actividad de unión a antígeno divalente y aún es capaz de reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab’ difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_H1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab’-SH es la denominación en la presente invención para Fab’ en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan por lo menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab’ que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0082] El fragmento Fc comprende las partes carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

[0083] “Fv” es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. A partir del pliegue de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de las cadenas H y L) que contribuyen con los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y que confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0084] “Fv de cadena única”, también abreviado como “sFv” o “scFv” son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo conectados en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido

sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

[0085] El término “diabodies” se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de manera que se consigue el emparejamiento de los dominios V entre cadenas, pero no intracadenas, dando lugar a un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos de sFv “ de entrecruce”, donde los fragmentos V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

[0086] Las formas “humanizadas” de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón (“framework”) (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[0087] Un “anticuerpo dependiente de especie”, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE humana de mamífero, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie “se une específicamente” a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} y lo más preferible no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero presenta una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

[0088] Un "polipéptido de unión a TAHO” es un oligopéptido que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden sintetizar químicamente utilizando una metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TAHO tienen habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas bien conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,1.43; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991). J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668).

[0089] Una "molécula orgánica de unión a TAHO” es una molécula orgánica diferente de un oligopéptido o anticuerpo tal como se define aquí, que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Las moléculas orgánicas de unión a TAHO se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas

orgánicas de unión a TAHO tienen habitualmente menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí, se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas bien conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585).

[0090] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, un polipéptido antígeno diana asociado a un tumor, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad, de manera que el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica es útil como agente terapéutico en el reconocimiento de una célula o tejido que expresan el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una proteína "no diana" será inferior a aproximadamente un 10% de la unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a su proteína diana particular tal como se determina mediante un análisis mediante separador celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula diana, el término "unión específica" o "que se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un polipéptido diana particular significa una unión que es diferente de forma medible de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por un exceso de diana no marcada. El término "unión específica" o "que se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítopo en un polipéptido diana particular tal como se utiliza aquí se pueden mostrar, por ejemplo, mediante una molécula que tiene una Kd para la diana de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10-9 M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o un epítopo en un polipéptido particular sin unirse específicamente a cualquier otro polipéptido o epítopo en polipéptido.

[0091] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que"inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido TAHO" o un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "inhibidora del crecimiento" son aquellos que dan lugar a una inhibición de crecimiento medible de las células cancerosas que expresan o sobreexpresan el polipéptido TAHO apropiado. El polipéptido TAHO puede ser un polipéptido transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido o secretado por una célula cancerosa. Los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos o moléculas orgánicas inhibidoras del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células tumorales que expresan TAHO en más de un 20%, preferiblemente de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 50% e incluso, más preferiblemente, en más de un 50%, por ejemplo, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%), en comparación con el control apropiado, siendo habitualmente el control células tumorales no tratadas con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a analizar. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 μg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células tumorales in vivo se puede determinar de varias maneras, tales como las descritas en la sección de Ejemplos Experimentales siguiente. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-TAHO a aproximadamente 1 μg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción en el tamaño tumoral o proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en aproximadamente 5 a 30 días.

[0092] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que "induce apoptosis" es aquel que induce la muerte celular programada determinada mediante la unión de annexina V, la fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente aquella que sobreexpresa un polipéptido TAHO. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula hematopoyética, tal como una célula B, célula T, basófilo, eosinófilo, neutrófilo, monocito, plaqueta o eritrocito. Existen varios procedimientos disponibles para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante la unión a annexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través del "laddering" del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se pueden evaluar mediante cualquier aumento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica que induce la apoptosis es aquel que da lugar a de aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y aún más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a annexina en relación a célula no tratada en un ensayo de unión a annexina.

[0093] Las “funciones efectoras” de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de una variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B(); y la activación de células B.

[0094] “Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo” o “ADCC” se refieren a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas (“killer”) naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y, posteriormente, destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha destrucción. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. PNAS (USA), 95:652-656 (1998).

[0095] Los términos “receptor Fc” y “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR humana de secuencia nativa. Además, una FcR preferida es aquella que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas (“spliced”) de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor de activación”) y FcγRIIB (un “receptor de inhibición”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término “FcR” aquí. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol., 117:587 (1976); y Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)).

[0096] “Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

[0097] “Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo de del complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

[0098] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no se limitan a, cánceres hematopoyéticos o cánceres relacionados con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o tumores linfoides, pero también cánceres del bazo y cánceres de los nódulos linfáticos. Ejemplos más particulares de dichos cánceres asociados a células B incluyen, por ejemplo, linfomas de grado alto, intermedio y bajo (incluyendo linfomas de células B tales como, por ejemplo, linfoma de células B de tejido linfoide asociado a mucosa y linfoma que no es de Hodgkin, linfoma de células de manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas, linfoma folicular y linfoma de Hodgkin y linfomas de células T) y leucemias (incluyendo leucemia secundario, leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de células B (linfocitos B CD5+), leucemia de mieloma, tal como leucemia mieloide aguda, leucemia de mieloma crónica, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástico agudo y mielodisplasia), mieloma múltiple, tal como tumores de células plasmáticas y otros cánceres hematológicos y/o asociados a células B o células T. También se incluyen cánceres de células hematopoyéticas adicionales, incluyendo leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y células asesinas naturales. Los orígenes de los cánceres de células B son los siguientes: el linfoma de células B de zona marginal se origina en células B de memoria en la zona marginal, el linfoma folicular y el linfoma de células B grandes difusas se origina en centrocitos en la zona clara de los centros germinales, el mieloma múltiple se origina en las células plasmáticas, la

leucemia linfocítica crónica y la leucemia linfocítica pequeña se originan en células B1 (CD5+), el linfoma de células de manto se origina en células B intactas en la zona del manto y el linfoma de Burkitt se origina en centroblastos en la zona oscura de los centros germinales. Los tejidos que incluyen células hematopoyéticas referidos en la presente invención como “tejidos de células hematopoyéticas” incluyen el timo y la médula ósea y tejidos linfoides periféricos, tales como el bazo, nódulos linfáticos, tejidos linfoides asociados con mucosa, tales como los tejidos linfoides asociados a intestino, amígdalas, parches de Peyer y apéndice y tejidos linfoides asociados con otra mucosa, por ejemplo, los recubrimientos bronquiales.

[0099] Los términos “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación de células anormales. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

[0100] “Tumor”, tal como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, tanto malignas como benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

[0101] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “induce la muerte celular” es aquel que provoca que una célula viable se convierta en no viable. La célula es aquella que expresa un polipéptido TAHO y es de un tipo celular que específicamente expresa o sobreexpresa un polipéptido TAHO. La célula puede ser una célula cancerosa o normal del tipo de célula particular. El polipéptido TAHO puede ser un polipéptido transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido y secretado por una célula cancerosa. La célula puede ser una célula cancerosa, por ejemplo, una célula B o una célula T. La muerte celular in vitro se puede determinar en ausencia de complemento y de células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). De este modo, el ensayo por la muerte celular se puede realizar utilizando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica es capaz de inducir la muerte celular, la pérdida de la integridad de membrana evaluada mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore et al. Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) o 7AAD se puede evaluar en relación con las células no tratadas. Los anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que inducen la muerte celular preferidas son aquellos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

[0102] Una "célula que expresa TAHO" es una célula que expresa un polipéptido TAHo endógeno o transfectado en la superficie celular o en una forma secretada. Un “cáncer que expresa TAHO” es un cáncer que comprende células que tienen un polipéptido TAHO presente en la superficie celular o que producen y secretan un polipéptido TAHO. Un “cáncer que expresa TAHO” produce opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TAHO en la superficie de células del mismo, de manera que un anticuerpo anti-TAHO, un oligopéptido u otra molécula orgánica se pueden unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. En otra realización, un “cáncer que expresa TAHO” produce y secreta opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TAHO, de manera que un anticuerpo anti-TAHO, un oligopéptido u otra molécula orgánica antagonistas se pueden unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Con respecto a esto último, el antagonista puede ser un oligonucleótido no codificante que reduce, inhibe o evita la producción y la secreción del polipéptido TAHO secretado mediante células tumorales. Un cáncer que “sobreexpresa” un polipéptido TAHO es aquel que tiene niveles significativamente más elevados de polipéptido TAHO en la superficie celular del mismo, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o mediante el aumento de la transcripción o la traducción. La sobreexpresión de polipéptido TAHO se puede determinar en un ensayo de detección o pronóstico mediante la evaluación de niveles incrementados de la proteína TAHO presente en la superficie de una célula, o secretada por la célula, (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-TAHO preparados contra un polipéptido TAHO aislado que se puede preparar utilizando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido TAHo; análisis FACS, etc.). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el polipéptido TAHO o ARNm en la célula, por ejemplo, a través de hibridación in situ fluorescente utilizando una sonda basada en ácidos nucleicos correspondiente a un ácido nucleico que codifica TAHO o el complemento del mismo; (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre 1998), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del polipéptido TAHO midiendo el antígeno escindido en un fluido biológico, tal como suero, por ejemplo, utilizando ensayos basados en anticuerpos (véase, también por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4,933,294 concedida el 12 de junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; la Patente de estados unidos 5,401,638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). A parte de los ensayos anteriores, existen varios ensayos in vivo para el técnico experto. Por ejemplo, se pueden exponer células en el cuerpo del paciente a un anticuerpo que es opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, mediante rastreo externo para la radioactividad o mediante en análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

[0103] 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 se componen de la fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada y 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 a 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.

[0104] La palabra "marcador", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica para generar anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "marcados". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso del marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato detectables.

[0105] 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, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, vinca, alcaloides (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina, u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticos, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a continuación. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

[0106] Un “agente inhibidor del crecimiento” cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa TAHO, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan TAHO 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), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorrubicina, epirrubicina, daunorrubicina, 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. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis en células.

[0107] “Doxorrubicina” es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorrubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi-α-L-lixo-hexapiranosil) oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

[0108] 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; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteínica (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF-β; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF-α y TGF-β, factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón-α, β, y γ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como TNF-α o TNF-β, y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0109] El término “prospecto” se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosis, administración, contraindicaciones y/o avisos con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

Tabla 1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define  _M        -8         /* value of a match with a stop */

int        _day[26][26] = {
/*      A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */    { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */    { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */    {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */    { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */    { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */    {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */    { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */    {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */    {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */    {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */    {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */    {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */    { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */    {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M, 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */    { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */    { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */    {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */    { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */    { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */    { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */    {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */    { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */    {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */    { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define  MAXJMP          16      /* max jumps in a diag */
#define  MAXGAP          24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define  JMPS            1024    /* max jmps in an path */
#define  MX              4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define  DMAT            3       /* value of matching bases */
#define  DMIS            0       /* penalty for mismatched bases */
#define  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  PINS1           4       /* penalty per residue */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short  x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                      /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int             score;          /* score at last jmp */
        long            offset;         /* offset of prev block */
        short           ijmp;           /* current jmp index */
        struct jmp      jp;             /* list of jmps */
};

struct path {
        int     spc;            /* number of leading spaces */
        short   n[JMPS];/* size of jmp (gap) */
        int     x[JMPS];/* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;                 /* output file name */
char            *namex[2];              /* seq names: getseqs() */
char            *prog;                  /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];               /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                   /* best diag: nw() */
int             dmax0;                  /* final diag */
int             dna;                    /* set if dna: main() */
int             endgaps;                /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;             /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;             /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;           /* total size of gaps */
int             smax;                   /* max score: nw() */
int             *xbm;                   /* bitmap for matching */
long            offset;                 /* current offset in jmp file */
struct  diag    *dx;                    /* holds diagonals */
struct  path    pp[2];                  /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static    _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static    _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                                          main
        int     ac;
        char    *av[];
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

        endgaps = 0;                    /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";            /* output file */

        nw();                   /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps();             /* get the actual jmps */
        print();                /* print stats, alignment */

        cleanup(0);             /* unlink any tmp files */}
```

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;
        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
```

...nw

```
        id = xx - yy + len1 - 1;
        if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                col1[yy] = mis;
```

```
                    else if (delx >= dely[yy]) {
                            col1[yy] = delx;
                            ij = dx[id].ijmp;
                            if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                    dx[id].ijmp++;
                                    if (++ij >= MAXJMP) {
                                            writejmps(id);
                                            ij = dx[id].ijmp = 0;
                                            dx[id].offset = offset;
                                            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                    }
                            }
                            dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                            dx[id].jp.x[ij] = xx;
                            dx[id].score = delx;
                    }
                    else {
                            col1[yy] = dely[yy];
                            ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                    dx[id].ijmp++;
                                    if (++ij >= MAXJMP) {
                                            writejmps(id);
                                            ij = dx[id].ijmp = 0;
                                            dx[id].offset = offset;
                                            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                    }
                            }
                            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                            dx[id].jp.x[ij] = xx;
                            dx[id].score = dely[yy];
                    }
                    if (xx == len0 && yy < len1) {
                            /* last col
                             */
                            if (endgaps)
                                    col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                            if (col1[yy] > smax) {
                                    smax = col1[yy];
                                    dmax = id;
                            }
                    }
            }
            if (endgaps && xx < len0)
                    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
            if (col1[yy-1] > smax) {
                    smax = col1[yy-1];
                    dmax = id;
            }
            tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;                    }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);                              }
```

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC     3
#define P_LINE  256     /* maximum output line */
#define P_SPC   3       /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()                                                          print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
        pr_align();             }
```

getmat

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;
        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

...getmat

```
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static          nm;             /* matches in core -- for checking */
static          lmax;           /* lengths of stripped file names */
static          ij[2];          /* jmp index for a path */
static          nc[2];          /* number at start of current line */
static          ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static          siz[2];
static char     *ps[2];         /* ptr to current element */
static char     *po[2];         /* ptr to next output char slot */
static char     out[2][P_LINE]; /* output line */
static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
```

pr_align

```
pr_align()
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;
                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                po[i] = out[i];                 }
```

...pr_align

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;
                        more++;
                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;
                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()                                                          dumpblock
{
        register  i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
```

nums

```
nums(ix)
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;
        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
```

putline

```
putline(ix)
        int     ix;                     {
```

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[] is current element (from 1)
         * nc[] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}


/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                                                 stars
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
           !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

stripname

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;
int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                   getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;
        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
char    *
g_calloc(msg, nx, sz)                                                                   g_calloc
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                                                              readjmps
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register        i, j, xx;
        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
                if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
        }
        for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
                while (1) {
                        for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                                ;
```

...readjmps

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;                                    }
                else
                        break;                  }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;
                        /* id = xx - yy + len1 - 1                                   */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
}
/* reverse the order of jmps    */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
}                                       }
```

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                                    writejmps
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

Tabla 2

TAHO	XXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad en la secuencia de aminoácidos =
(el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido TAHO) =
5 dividido por 15 = 33,3%

Tabla 3

TAHO	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXYYYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad en la secuencia de aminoácidos =
(el número de residuos de aminoácidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de polipéptidos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido TAHO) =
5 dividido por 10 = 50%

Tabla 4

TAHO-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =
(el número de nucleótidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de TAHO-DNA) =
6 dividido por 14 = 42,9%

Tabla 5

TAHO-DNA	NNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =
(el número de nucleótidos que se emparejan de forma idéntica entre las dos secuencias de ácidos nucleicos según se determina mediante ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos de TAHO-ADN) =
4 dividido por 12 = 33,3%

II. Composiciones y procedimientos de la invención

A. Anticuerpos anti-TAHO

[0110] En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-TAHO para utilizar como agentes terapéuticos, tal como se establece en las reivindicaciones. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

[0111] Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se utilizan péptidos sintéticos) a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar a la hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de

suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, $SOCl_2$, o $R^1N=C=NR$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

[0112] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se ensaya para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como el alumbre, se utilizan de forma adecuada para potenciar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos monoclonales

[0113] Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante procedimientos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

[0114] En el procedimiento del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aislan y se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,* páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

[0115] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también referidas como compañero de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

[0116] Las células de mieloma de compañero de fusión preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio que se selecciona contra las células parentales no fusionadas. Entre las líneas de células de mieloma preferidas están las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 y derivadas, por ejemplo X63-Ag8-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,* páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0117] Se ensaya el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

[0118] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.,* 107:220 (1980).

[0119] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante procedimientos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice,* páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en los ratones.

[0120] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

[0121] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.,* 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol Revs.,* 130:151-188 (1992).

[0122] En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature,* 352: 624-628 (1991) y Marks et al, *J. Mol. Biol.,* 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.,* 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0123] El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos anticuerpo quiméricos o de fusión, por ejemplo, mediante la sustitución de las secuencias de los dominios constantes de cadena pesada y ligera (C_H y C_L) humanos por las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante la fusión de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptidos que no son inmunoglobulinas se pueden sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0124] Los anticuerpos anti-TAHO para utilizar según 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 receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") 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 receptor 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 consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente 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)].

[0125] Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen 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); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de CDRs o CDR por las secuencias correspondientes 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 humano intacto se ha 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.

[0126] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón de humano) cuando el anticuerpo pretende utilizarse para uso terapéutico humano. Según el procedimiento denominado "mejor-ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. Se identifica el dominio V humano de la secuencia humana que está más próxima a la del roedor y se acepta la región de armazón (FR) humana en el mismo para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.,* 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.,* 196: 901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una región de armazón particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región de armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immnol.,* 151: 2623 (1993)).

[0127] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias receptoras e importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

[0128] Se contemplan varias formas de un anticuerpo anti-TAHO humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

[0129] Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., Nature 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7: 33 (1993); y las Patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.547.807; y WO 97/17852.

[0130] Alternativamente, la tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., Nature 348, 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De este modo, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), o Griffith et al., EMBO J. 12, 725-734 (1993). Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

[0131] Tal como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vivo* (véase las Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

[0132] En ciertas circunstancias, existen ventajas al utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos

completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una depuración rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

[0133] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) y Brennan et al., Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv se pueden todos expresar en y secretarse de E. coli, permitiendo así la producción simple de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos $F(Ab')_2$ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con una mayor vida media in vivo que comprenden residuos de epítopo de unión a receptor salvaje se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intacta carentes de regiones constantes; de este modo, son adecuadas para una unión específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión con sFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. Véase, Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0134] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína TAHO. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a TAHO con un sitio de unión por otra proteína. Alternativamente, un brazo anti-TAHO puede combinarse con un brazo que se une a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD3) o receptores Fc para IgG (FCγR), tales como FCγRI (CD64), FCγRII (CD32) y FCγRIII (CD16) con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa TAHO. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan TAHO. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAHO y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

[0135] WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la Patente de Estados Unidos 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. En WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα. La Patente de Estados Unidos No. 5.821.337 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

[0136] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos específicos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO J.,* 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

[0137] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con una dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan el rendimientos óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo en el rendimiento de la

combinación de cadena deseadas.

[0138] En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0139] Según otra estrategia descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.731.168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio C_H3. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0140] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

[0141] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science,* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se descomponen proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0142] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli.*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med,* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico $F(ab')_2$ completamente humanizada. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos. Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994).

[0143] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

[0144] Los anticuerpos heteroconjugados tal como se definen en las reivindicaciones también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360: WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

[0145] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de a los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región fc. El anticuerpo multivalente preferido de la presente invención comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente invención comprende preferiblemente además por lo menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además, comprenden un dominio CL.

8. Diseño de la función efectora

[0146] Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de aumentar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el residuo o residuos de cisteínas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.,* 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.,* 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf et al. *Cancer Research,* 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis complementaria y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media del suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítopo de unión al receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,739,277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término “epítopo de unión al receptor salvaje” se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4) que son responsables del incremento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula IgG.

9. Inmunoconjugados

[0147] La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0148] Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de

Pseudomonas aeruginosa), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Existe un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos son ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y y ^{186}Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitella *et al., Science*, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

[0149] También se contemplan en la presente invención conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, péptidos de auristatina, tales como monometil auristatina (MMAE) (análogo sintético de dolastatina), maitansinoides, tales como DM1, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tiene actividad de toxina.

Maitansina y maitansinoides

[0150] En una realización preferida, se conjuga un anticuerpo anti-TAHO (longitud completa o fragmentos) a una o más moléculas maitansinoides.

[0151] Los maitansinoides, tales como DM1, son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto Maytenus serrata del África del este (Patente de Estados Unidos No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos No. (4,151,042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; and 4,371,533.

Conjugados maitansinoide-anticuerpo

[0152] En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado a anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. Se observó que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumores in vivo. Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en lkos que se conjugó un maitansinoide a través de un enlace disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado Ta.1-maitansinoide se ensayó in vitro en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3 x 10^5 antígenos de la superficie de HER-2 por célula. El fármaco conjugado consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podía incrementar mediante el incremento del número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Conjugados anticuerpo anti-polipéptido TAHO-maitansinoide

[0153] Los conjugados anticuerpo anti-TAHO-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo anti-TAHO a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado una eficacia en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar significativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras publicaciones de patente y no patente referidas anteriormente aquí. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

[0154] Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, y Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, o grupos lábiles peptidasa o grupos lábiles esterasa, tal como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter.

[0155] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como, dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como, bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]), sulfosuccinimidil maleimidometil ciclohexano carboxilato (SMCC) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro. Otros enlazadores disulfuro incluyen cys-MC-vc-PAB (un reactivo enlazador dipéptido valina-citrulina (vc) que tiene un componente maleimida y un componente auto-inmolador para-aminobencilcarbamoílo (PAB).

[0156] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede estar formado por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada don hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

[0157] Otro inmunoconjugado de particular interés comprende un anticuerpo anti-TAHO conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,773,001; y 5,877,296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, γ_1^1, α_2^1, α_3^1, N-acetil-γ_1^1, PSAG, y θ_1^1 (Hinman et al, CancerRes 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancerres 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral preferido al que el anticuerpo se puede conjugar es QFA, un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[0158] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos anti-TAHO de la presente invención incluyen BCNU, estrepzoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5,877,296).

[0159] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

[0160] La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desorribonucleasa; ADNasa).

[0161] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos anti-TAHO radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo tc^{99m} o I^{123}, o un marcador de spin para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, fluor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0162] Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de varias maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, fluor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como, tc^{99m} o I^{123}, Re^{186}, Re^{188} y In^{111} se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El ytrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. El procedimiento de IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

[0163] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 [1992]; Patente de Estados Unidos No. 5,208,020).

[0164] Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-TAHO y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

10. Inmunoliposomas

[0165] Los anticuerpos anti-TAHO descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuesto habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Pat. De Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y WO97/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

[0166] Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el procedimiento de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente solicitud se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. En el liposoma está contenido opcionalmente un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

B. Oligopéptidos de unión a TAHO

[**0167]** Los oligopéptidos de unión a TAHO son oligopéptidos que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden sintetizar químicamente utilizando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TAHO tiene habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985);

Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin, Biotechnol., 2: 668).

[0168] En este aspecto, la expresión en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite cribar bibliotecas grandes de oligopéptidos para identificar el miembro o miembros de estas bibliotecas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión en fago es una técnica por la cual se expresan variantes de polipéptidos como proteínas de fusión a la proteína de recubrimiento en la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science, 249: 386). La utilidad de la expresión en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas seleccionadas al azar (o ADNcs clonados al azar) se pueden separar rápida y eficazmente para las secuencias que se unen a una molécula diana con gran afinidad. La expresión de bibliotecas de péptido (Cwirla, S. E. et al. (1990Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o proteína (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363) en fagos se ha utilizado para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos para aquellos con propiedades de unión específicas (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La separación de la bibliotecas en fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad utilizando el receptor diana, y un medio de evaluación de los resultados de enriquecimientos de unión. Patentes de Estados Unidos nos. 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, y 5,663,143.

[0169] Aunque la mayoría de procedimientos de expresión en fago han utilizado sistemas de expresión en fago filamentoso, también son conocidos los sistemas de expresión en fago lamboide (WO 95/34683; U.S. 5,627,024), sistema de expresión fago T4 (Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al., Cancer Research, 58 (15): 3209-3214 (1998); Jiang et al., Infection & Immunity, 65 (11): 4770-4777 (1997); Ren et al., Gene, 195 (2): 303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de expresión en fago T7 (Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 5,766,905) .

[0170] Actualmente se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión en fagos. Estas mejoras aumentan la capacidad de los sistemas de expresión para cribar bibliotecas de péptidos para unirse a moléculas diana seleccionadas y para expresar proteínas funcionales con el potencial de cribar estas proteínas por las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para las reacciones de expresión en fagos (WO 98/14277) y se han utilizado bibliotecas de expresión en fagos para analizar y controlar interacciones bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales obligados (WO 98/20036). WO 97/35196 describe un procedimiento para aislar un ligando de afinidad en el que se pone en contacto una biblioteca de expresión en fagos con una solución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula diana, para aislar selectivamente los ligandos de unión. WO 97/46251 describe un procedimiento para la bioadsorción de una biblioteca de expresión en fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y a continuación el aislamiento del fago de unión, seguido de un proceso de microadsorción utilizando pocillos de microplacas para aislar el fago de unión con afinidad elevada. También se ha descrito el uso de proteína A de Staphlylococcus aureus como etiqueta de afinidad (Li et al. (1998) Mol Biotech., 9: 187). WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir las especificidades de enzima utilizando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión en fagos. En WO 97/094446 se describe un procedimiento para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes utilizando la expresión en fagos. Procedimientos adicionales de selección de proteínas de unión específica se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,498,538,5,432,018, y WO 98/15833.

[0171] Los procedimientos de generación de bibliotecas de péptidos y cribado de estas bibliotecas también se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, y 5,723,323.

C. Moléculas orgánicas de unión a TAHO

[0172] Las moléculas orgánicas de unión a TAHO son moléculas orgánicas diferentes de oligopéptidos o anticuerpos tal como se definen aquí que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Las moléculas orgánicas de unión a TAHO se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TAHO tienen habitualmente menos de aproximadamente 200 daltons de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente a un polipéptido tal como se describe aquí, se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido diana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas de orgánicas de unión a TAHO pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas,

oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, amino alcoholes, oxazolidinas, oxazolinas, tiazolidinas, tiazolinas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazo, cloruros de ácido o similares.

D. Cribado de anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos de unión a TAHO y moléculas orgánicas de unión a TAHO con las propiedades deseadas.

[0173] Las técnicas para generar anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas que se unen a polipéptidos TAHO se han descrito anteriormente. Se pueden seleccionar además anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, según se desee.

[0174] Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido u otra molécula orgánica de la solicitud se pueden valorar mediante los procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando células que expresan un polipéptido TAHO endógenamente o tras la transfección con el gen de TAHO. Por ejemplo, las líneas de células tumorales y las células transfectadas con TAHO apropiadas se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal anti-TAHO, oligopéptido u otra molécula orgánica de la solicitud a varias concentraciones durante unos días (por ejemplo, 2-7 días) y se pueden teñir con violeta cristal o MTT o analizarse mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro procedimiento de medición de la proliferación sería mediante la comparación de la captación de ^{3}H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO de la solicitud. Después del tratamiento, las células se recogen y se cuantifica la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibidor el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de las células tumorales in vivo se puede determinar de varias maneras conocidas en la técnica. La célula tumoral puede ser la que sobreexpresa un polipéptido TAHO. El anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO inhibirán la proliferación celular de una célula tumoral que expresa TAHO in vitro o in vivo en aproximadamente 25-100% en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferiblemente, en aproximadamente 30-100%, e incluso más preferiblemente en aproximadamente 50-100% ó 70-100%, en una realización, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 μg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 μg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-TAHO de aproximadamente 1 μg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción del tamaño tumoral o la reducción de la proliferación del tumor dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

[0175] Para seleccionar un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO que induce la muerte celular, se puede valorar la pérdida de integridad de la membrana indicada mediante, por ejemplo, la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD en relación al control. Se puede realizar un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y células efectoras inmunes. Las células tumorales que expresan el polipéptido TAHO se incuban con medio solo o medio que contiene anticuerpo anti-TAHO (por ejemplo, a aproximadamente 10 μg/ml), un oligopéptido de unión a TAHO o una molécula orgánica de unión a TAHO. Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Tras cada tratamiento, las células se lavan y se fraccionan en tubos 12x 75 de tapón colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de grupos de células. A continuación, los tubos reciben PI (10 μg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo PACSCAN® y el software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos de unión a TAHO o moléculas de unión a TAHO que inducen estadísiticamente niveles significativos de la muerte celular determinada mediante la captación de PI se pueden seleccionar como anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos de unión a TAHO o moléculas orgánicas de unión a TAHO inductoras de la muerte celular.

[0176] Para cribar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que se unen a un epítopo en un polipéptido TAHO unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Este ensayo se puede utilizar para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de prueba se une al mismo sitio o epítopo que un anticuerpo anti-TAHO conocido. Alternativa o adicionalmente, la localización del epítopo se realiza mediante procedimientos conocidos en el sector. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo se puede mutagenizar mediante, por ejemplo, rastreo de alanina, para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante se analiza inicialmente por su unión con anticuerpo policlonal para asegurar el pliegue correcto. En un procedimiento diferente, se pueden utilizar péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido TAHO en ensayos de competición con los anticuerpos de prueba o con un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con un epítopo caracterizado o conocido.

E. Terapia de profármaco mediada por enzimas dependiente de anticuerpo (ADEPT)

[0177] Los anticuerpos también se pueden utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidilo, véase WO 81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

[0178] El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

[0179] Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento se incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluoroacilo; proteasas, tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que que dividen los carbohidratos, tales como β-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β-lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasas, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como “abzimas” se pueden utilizar para convertir los profármacos de la solicitud en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey *Nature* 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal y como se ha descrito en la presente invención para la liberación de la abzima a una población de células tumorales.

[0180] Las enzimas de la presente invención se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-TAHO mediante técnicas bien conocidas en el sector, tal como la utilización de los reactivos de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente solicitud unida a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la solicitud se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el sector (véase, por ejemplo, Neuberger et al., *Nature* 312: 604-608 (1984)).

F. Polipéptidos TAHO de longitud completa

[0181] La presente solicitud también describe secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos TAHO. En particular, se han identificado y aislado los ADNc (parciales y de longitud completa) que codifican varios polipéptidos TAHO, tal y como se describe con mayor detalle en los posteriores ejemplos.

[0182] Tal y como se describe en los Ejemplos posteriores, se han depositado clones de ADNc con el ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de los clones se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia mediante la secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos rutinarios en la técnica. Las secuencias de aminoácidos previstas se pueden determinar a partir de las secuencias de nucleótidos utilizando la técnica rutinaria. Para los polipéptidos TAHO y los ácidos nucleicos codificantes descritos en la presente invención, en algunos casos, los solicitantes han identificado lo que se cree que son los mejores marcos de lectura identificables con la información de la secuencia disponible en el momento.

G. Variantes de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO

[0183] Además de los anticuerpos anti-TAHO y los polipéptidos TAHO de secuencia nativa y de longitud completa descritos en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO. Las variantes de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante y/o mediante la síntesis del polipéptido o anticuerpo deseados. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO, 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.

[0184] Las variaciones en los anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o el polipéptido que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido 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 anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad

deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO 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 tiene 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 probando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

[0185] En la presente invención se proporcionan fragmentos de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO.

[0186] Los fragmentos del anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO se pueden preparar mediante cualquiera de un conjunto de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de anticuerpo o polipéptido mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos concretos o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores de los extremos 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO nativos descritos aquí.

[0187] En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales denominados "ejemplos de sustituciones" en la Tabla 6 o, tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y se criban los productos.

Tabla 1

Residuo original	Ejemplos de sustituciones	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (U)	glu;	glu
Cys(C)	ser;	ser
Gln(Q)	asn;	asn
Glu(E)	asp	asp
Gly(G)	pro; ala	ala
His(H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile(I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu(L)	Norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys(K)	arg; gln; asn	arg
Met(M)	leu; phe; ile	leu
Phe(F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro(P)	ala	ala
Ser(S)	thr	thr
Thr(T)	ser	ser
Trp(W)	tyr; phe	tyr
Tyr(Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val(V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

[0188] Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO se realizan mediante la selección de substituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

(1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
(2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr;
(3) ácido: asp, glu;
(4) básico: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y
(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0189] Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados)

[0190] 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 del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO 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.

[0191] El análisis de aminoácido 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 [Cunninghan y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. 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.

[0192] También se puede sustituir, generalmente por serina, cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. En cambio, se pueden añadir el enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

[0193] Un tipo particularmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetados en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe en la presente invención. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido TAHO humano. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente invención. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente invención y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo posterior.

[0194] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAHO se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-TAHO.

H. Modificaciones de anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO

[0195] Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-TAHO están incluidas en la presente solicitud. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-TAHO, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-

ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

[0196] 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.

[0197] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-TAHO incluido en la presente solicitud comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del anticuerpo o polipéptido. Por “alteración del patrón de glicosilación nativo” para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

[0198] La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos es habitualmente por unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0199] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se puede realizar convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contiene una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO original (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0200] Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO 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).

[0201] La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO 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).

[0202] Otro tipo de modificación covalente de anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO comprende la unión del anticuerpo o 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. El anticuerpo o polipéptido pueden también encapsularse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacilato) respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington’s Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

[0203] El anticuerpo anti-TAHO de la presente solicitud también se puede modificar de una manera que forme moléculas quiméricas que comprenden un anticuerpo anti-TAHO fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

[0204] Dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO con un

polipéptido etiqueta que proporciona un epítopo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítopo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO. La presencia de dichas formas epítopo etiquetadas del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se pueden detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, la disposición del epítopo etiqueta permite que el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítopo etiqueta. En la técnica se conocen varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Entre los ejemplos se incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta de gripe HA y su anticuerpo 12C45 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y la etiqueta de gliproteína 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 epítopo KT3 [Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epítopo 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)].

[0205] Alternativamente, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como “inmunoadhesina”), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH y CH_3, o la bisagra, regiones CH_1, CH_2 y CH_3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

I. Preparación de anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO

[0206] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico codifica anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar los anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado varias partes del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO deseado.

1. Aislamiento del ADN que codifica un anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO

[0207] El ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

[0208] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO es utilizar la metodología de PCR [Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0209] Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca que se minimizan los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ^{32}P, biotinilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook et al., supra.

[0210] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicos, tales como el Banco de Genes u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de secuencia (a nivel de aminoácido o nucleótido) en las regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando procedimientos conocidos en la técnica y tal y como se describen en la presente invención.

[0211] El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook et al., supra, para detectar precursores y procesando intermedios de ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

[0212] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente invención para la producción del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., supra.

[0213] Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, $CaCl_2$, $CaPO_4$, mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook et al., supra, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policationes, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown et al., Methods in enzymology, 185:527-537 (1990) y Manssur et al., Nature, 336. 348-352 (1988).

[0214] Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli.* Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y cepa de *E. coli* K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli, Enterobacter, Erwinia, Klebsiella, Proteus, Salmonella,* por ejemplo, *Salmonella typhimurium, Serratia,* por ejemplo, *Serratia marcescans,* y *Shigella,* así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La Cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa de huésped habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticos. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *ton*A; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *ton*A *ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *ton*A *ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kon'*; la cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *ton*A *ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan'*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

[0215] El anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de la célula tumoral. Los anticuerpos de longitud completa presentan

una vida media mayor en la circulación. La producción en E. coli es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5,648,237 (Carter et. al.), la Patente de Estados Unidos 5,789,199 (Joly et al.), y la Patente de Estados Unidos 5,840,523 (Simmons et al.) que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y secreción, estas patentes se incorporan en la presente por referencia. Después de la expresión, se aisla el anticuerpo de la pasta celular de E: coli en un fracción soluble y se puede purificar a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado en, por ejemplo, células CHO.

[0216] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican que codifican el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt et al. J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans y K. marxianus*; *yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma recia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces,* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilbum et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. Niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotrópicas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionada del género que consiste en *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis,* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

[0217] Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como Drosophila S2 y Spodoptera Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han modificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huéspedes de insecto permisivas de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Droshophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una serie de cepas víricas para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como el virus del presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0218] Sin embargo, el mayor interés ha estado en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.,* 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10; células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO. Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.,* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0219] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO y se cultivan en un medio con nutrientes habituales modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección e utilización de un vector replicable

[0220] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO 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 el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente,

pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un experto en la materia.

[0221] El polipéptido TAHO se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división 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 anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, lpp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo las secuencias líder del 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 secretoras virales.

[0222] Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido 2μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

[0223] Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli.*

[0224] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje 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)].

[0225] Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO para dirigir la síntesis de ARNm. Son conocidos promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales. 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 promotor de triptófano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor tac [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgamo (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHo o polipéptido TAHO.

[0226] 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, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

[0227] Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas 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 en detalle en EP 73.657.

[0228] La transcripción del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO a partir de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus del polioma, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0229] Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO por eucariotas superiores 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. Actualmente se conocen muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la cara tardía del origen de replicación, y los 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 anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' con respecto al promotor.

[0230] 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 ADNs o ADNcs eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO.

[0231] 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 del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

4. cultivo de células huésped

[0232] Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se pueden cultivar en un conjunto de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enz., 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patente de Estados Unidos Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la Patente de Estados Unidos Re. 30,985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINA™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el rango micromolar) y la glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en las concentraciones apropiadas que serían conocidas por un experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y será evidente para el experto en la materia.

5. Detección de la amplificación/expresión de los genes

[0233] La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, dobles cadenas híbridas de ADN-ARN o dobles cadenas de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la doble cadena está unida a una superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la doble cadena.

[0234] La expresión génica, alternativamente, se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y el ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido TAHO

de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de TAHO que codifica un epítopo de anticuerpo específico.

6. Purificación de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO

[0235] Las formas de anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisados de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión del anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar células.

[0236] Se puede desear purificar el anticuerpo anti-TAHO y el polipéptido TAHO 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 sefarosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítopo del anticuerpo anti-TAHO y el polipéptido TAHO. 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 anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO concreto producido.

[0237] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o se secreta directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se elimina el debris particulado, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de E. coli. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonil (PSMF) durante aproximadamente 30 minutos. La debris celular se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran en primer lugar utilizando un filtrador de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes extraños.

[0238] La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adeqüidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas γ1, γ2 o γ4 humanas (Lindmark et al., J, Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para γ3 humana (Guss et al., EMBO J. 5: 1565-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más elevadas y tiempos de procesado más cortos que los conseguidos con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX^{Tm} (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE^{TM}, cromatografía en una resina de intercambio aniónica o catiónica (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque ("chromatofocusing"), SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

[0239] Tras la etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente se realiza a concentraciones bajas de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

J. Formulaciones farmacéuticas

[0240] Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos de unión a TAHO, moléculas orgánicas de unión a TAHO y/o polipéptidos TAHO utilizados según el presente documento se preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica que tienen el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en

las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como acetato, Tris, 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, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; tonificantes, tales como terhalosa y cloruro sódico; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensoactivos, tales como polisorbato; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferiblemente el anticuerpo a una concentración entre 5 y 200 mg/ml, preferiblemente entre 10 y 100 mg/ml.

[0241] La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, además del anticuerpo anti-TAHO puede ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-TAHO que se une a un epítopo diferente en el polipéptido TAHO, o un anticuerpo para alguna otra diana, tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer concreto. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente anti-hormonal, y/o un cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

[0242] Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16ª Edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0243] Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilácticos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[0244] Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

K. Tratamiento con anticuerpos Anti-TAHO, oligopéptidos de unión a TAHO y moléculas orgánicas de unión a TAHO

[0245] Para determinar la expresión de TAHO en el cáncer, están disponibles varios ensayos de detección. En una realización, la sobreexpresión del polipéptido TAHO puede analizarse mediante immunohistoquímica (IHC). Las secciones de tejido bañadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo IHC y acordarse unos criterios de intensidad de tinción de la proteína TAHO tal y como se indica a continuación:
Valoración 0 – no se observa tinción o tinción de membrana en menos del 10% de células tumorales.
Valoración 1+ - se detecta una tinción de membrana débil/apenas perceptible en más del 10% de las células tumorales. Las células sólo se tiñen en parte de sus membranas.
Valoración 2+ - se observa una tinción de membrana completa de débil a moderada en más del 10% de las células tumorales.
Valoración 3+ - se observa una tinción de membrana completa de moderada a fuerte en más del 10% de las células tumorales.

[0246] Los tumores con una valoración 0 ó 1+ para la expresión de polipéptido TAHO pueden caracterizarse como que no sobreexpresan TAHO, mientras que los tumores con resultados 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan TAHO.

[0247] Alternativamente, o adicionalmente, pueden realizarse ensayos FISH tal como el INFORM® (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) en tejido tumoral fijado a formalina y bañado en parafina para determinar el grado (si la hay) de sobreexpresión de TAHO en el tumor.

[0248] Puede evaluarse la amplificación o la sobreexpresión de TAHO utilizando un ensayo de detección *in vivo*, por ejemplo, mediante la administración de una molécula (como un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica) que une a la molécula a detectar y que está marcado con una etiqueta detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo o una marca fluorescente) y escaneando externamente el paciente para la localización de la marca.

[0249] Tal y como se describe anteriormente, los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos y moléculas orgánicas tienen varias aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos y moléculas orgánicas pueden ser útiles para destacar los cánceres que expresan los polipéptidos TAHO (por ejemplo, en radioimagen). Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas también son útiles para la purificación o la inmunoprecipitación de polipéptido TAHO a partir de células, para la detección y la cuantificación de polipéptido TAHO *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western, para matar o eliminar células que expresan TAHO de una población de células mezcladas como una etapa en la purificación de las otras células.

[0250] Actualmente, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento del cáncer implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, radioterapia, y quimioterapia. La terapia con anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica puede ser deseable especialmente en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en enfermedad metastásica donde la radioterapia tiene una utilidad limitada. Los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos y moléculas orgánicas que reconocen el tumor son útiles para paliar los cánceres que expresan TAHO tras su diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-TAHO puede utilizarse solo, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogenes, o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia, y/o radioterapia. El tratamiento con anticuerpo anti-TAHO puede administrarse conjuntamente con otras formas de terapia convencional, ya sea consecutivamente con, terapia pre- o post-convencional. Se utilizan fármacos quimioterapéuticos como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona en el tratamiento del cáncer, en concreto, en pacientes con riesgo. En los medicamentos actuales de la aplicación para tratar o paliar el cáncer, a los pacientes de cáncer se les puede administrar anticuerpo anti-TAHO conjuntamente con el tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriores. En concreto, se contempla la terapia de combinación con paclictaxel y derivados modificados (ver, por ejemplo, EP0600517). Se administrará el anticuerpo anti-TAHO con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra realización, se administra el anticuerpo anti-TAHO conjuntamente con quimioterapia para potenciar la actividad y la eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. La Physicians' Desk Reference (PDR) describe dosis de estos agentes que han sido utilizados en el tratamiento de varios cánceres. La pauta de dosificación y las dosis de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son efectivas terapéuticamente dependerán del cáncer concreto que se trata, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares para los médicos con experiencia y pueden ser determinados por el médico.

[0251] En una ejemplo particular, se administra al paciente un conjugado que comprende un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inmunoconjugado unido a la proteína TAHO es internalizado por la célula, dando lugar a una eficacia terapéutica incrementada del inmunoconjugado en la eliminación de la célula cancerosa a la que se une. En un ejemplo preferido, el agente citotóxico reconoce o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Anteriormente se han descrito ejemplos de dichos agentes citotóxicos y se incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

[0252] Se administran a un paciente humano anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos, moléculas orgánicas o conjugados con toxinas de los mismos, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerobrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica.

[0253] Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica. La administración combinada incluye co-administración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente hay un periodo de tiempo a la vez que ambos (o todos) los agentes activos simultáneamente ejercen sus actividades biológicas. Preferiblemente dicha terapia combinada da lugar a un efecto terapéutico sinérgico.

[0254] También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos o moléculas orgánicas, con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno de tumor asociado con el cáncer concreto.

[0255] En otro ejemplo, los métodos de tratamiento terapéutico implican la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti-TAHO, oligopéptidos o moléculas orgánicas y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Entre los agentes quimioterapéuticos se incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalano, ciclofosfamida, hidroxiurea e hidroxiureataxanos (tales como paclitaxel y doxitaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones de los fabricantes o tal como se determina

empíricamente por el técnico en la materia. La preparación y pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & wilkins, Baltimore, MD (1992).

[0256] El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se puede combinar con un compuesto anti-hormonal, por ejemplo, un compuesto anti-estrógeno, tal como tamoxifeno; una anti-progesterona, tal como onapristona (véase, EP 616 812); o un anti-andrógeno, tal como flutamida, en dosis conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer a tratar es un cáncer independiente de andrógeno, el paciente puede haber sido sometido previamente a terapia anti-andrógeno y, después de que el cáncer se convierta en independiente de andrógeno, se puede administrar al paciente el anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica (y opcionalmente otros agentes tal como se describen en el presente documento).

[0257] A veces, puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para evitar o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a una extracción quirúrgica de células cancerosas y/o terapia de radiación, antes, simultáneamente o posteriormente a la terapia con anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgáncias. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son aquellas utilizadas actualmente y pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica.

[0258] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis y el modo de administración serán elegidos por el médico según criterios conocidos. La dosis apropiada de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal y como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica, y el criterio del médico responsable. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Preferiblemente, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra mediante perfusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 μg/kg hasta 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, mediante, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una pauta de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-TAHO. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. Una dosis diaria habitual podría variar desde, aproximadamente, 1 μg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar la desaparición deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se puede monitorizar fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales y en base a criterios conocidos para el médico u otras personas expertas.

[0259] A parte de la administración de la proteína anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Dicha administración de ácido nucleico que codifica el anticuerpo esta comprendida por la expresión “administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo”. Véase, por ejemplo, WO96/07321 publicada el 14 de marzo de 1996 que se refiere al uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

[0260] 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, normalmente en el punto donde se necesita el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y se administran las células modificadas al paciente, ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.892.538 y 5.283.187). Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector utilizado normalmente para la liberación *ex vivo* del gen es un retrovirus.

[0261] Entre las técnicas actuales de transferencia de ácido nucleico *in vivo* preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simplex I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico 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.

[0262] Los anticuerpos anti-TAHO útiles en la presente invención pueden estar en las diferentes formas comprendidas por la definición de “anticuerpo” del presente documento. De este modo, los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa o intactos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpo o aminoácidos de

secuencia nativa, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, se fusiona una secuencia de anticuerpo a una secuencia de polipéptido heterólogo. Los anticuerpos se pueden modificar en la región Fc para proporcionar las funciones efectoras deseadas. Tal como se describe en detalle en las secciones del presente documento, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido en la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o mediante el reclutamiento de complemento en citotoxicidad dependiente de complemento, o algún otro mecanismo. Alternativamente, se pueden utilizar algunas otras regiones Fc cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora para minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas.

[0263] En una realización, el anticuerpo compite por la unión o por unirse sustancialmente al mismo epítopo que los anticuerpos útiles en la presente invención. También se contemplan los anticuerpos que tienen características biológicas de los presentes anticuerpos anti-TAHO útiles en la presente invención, específicamente incluyendo el reconocimiento de tumores in vivo y cualquier inhibición de proliferación celular o carácterísticas citotóxicas.

[0264] Los procedimientos para producer los anticuerpos anteriores se describen en detalle aquí.

[0265] Los presentes anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos y moléculas orgánicas son útiles para tratar cáncer que expresa TAHO o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Dicho cáncer incluye, pero sin limitación, cánceres hematopoyéticos o cánceres relacionados con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o tumores linfoides, pero también cánceres del bazo y cánceres de los nódulos linfáticos. Ejemplos más particulares de dichos cánceres asociados a células B incluyen, por ejemplo, linfomas de grado alto, medio y bajo (incluyendo linfomas de células B, tales como, por ejemplo, linfoma de células B de tejido linfoide asociado a la mucosa y linfoma no de Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de la zona marginal, linfoma difuso de célula grande, linfoma folicular, y linfoma de Hodgkin y linfomas de células T), y leucemias (incluyendo leucemia secundaria, leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de células B (linfocitos B CD5+), leucemia mieloide, tal como leucemia mieloide agudo, leucemia mieloide crónica, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástica aguda y mielodisplasia), mieloma múltiple, tal como tumores de células plasmáticas, y otros cánceres hematológicos y/o asociados con células B o células T. Los cánceres comprenden cánceres metastáticos de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es capaz de unirse a por lo menos una parte de las células cancerosas que expresan el polipéptido TAHO en el mamífero. En un ejemplo preferido, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es eficaz para destruir o matar células tumorales que expresan TAHO o para inhibir el crecimiento de dichas células tumorales, in vitro o in vivo, tras la unión al polipéptido TAHO en la célula. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo anti-TAHO desnudo (no conjugado a ningún agente). Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento se pueden emplear con un agente citotóxico para hacerlos incluso más potentes en la destrucción de células tumorales. Las propiedades citotóxicas se pueden conferir a un anticuerpo anti-TAHO mediante, por ejemplo, la conjugación del anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado tal como se describe en el presente documento. El agente citotóxico o el agente inhibidor del crecimiento es preferiblemente una molécula pequeña. Son preferibles las toxinas, tales como caliqueamicina o un maitansinoide y análogos o derivados de los mismos.

[0266] También se describe en el presente documento una composición que comprende un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica y un portador, y un portador. Para los objetivos del tratamiento del cáncer, las composiciones se pueden administrar al paciente con necesidad de dicho tratamiento, en el que la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti-TAHO presentes como un inmunoconjugado o como el anticuerpo desnudo. En una ejemplo adicional, las composiciones pueden comprender estos anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo agentes quimioterapéuticos. También se describen en el presente documento formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica de la invención y un portador. En un ejemplo, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

[0267] También se describen en el presente documento ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-TAHO. Se comprenden ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L y especialmente los residuos de la región hipervariable, cadenas que codifican el anticuerpo de secuencia nativa, así como variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

[0268] También se describen procedimientos útiles para tratar un cáncer que expresa el polipéptido TAHO o que alivia uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se pueden administrar a corto plazo (agudo) o crónico, o intermitente según indique el médico. Además, se proporcionan procedimientos de inhibición del crecimiento y citólisis de una célula que expresa el polipéptido TAHO.

[0269] También se describen kits y artículos de fabricación que comprenden por lo menos un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica. Los kits que contienen anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos o moléculas

orgánicas son útiles, por ejemplo, para ensayos de citólisis de células TAHO, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido TAHO a partir de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y purificación de TAHO, el kit puede contener un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica acoplados a esferas (por ejemplo, esferas de sefarosa). Los kits se pueden disponer conteniendo anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de TAHO in vitro, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica útil para la detección se pueden disponer con un marcador, tal como un fluorescente o radiomarcador.

L. Artículos de fabricación y kits

[0270] También se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento del cáncer que expresa anti-TAHO. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. 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 tratamiento del cáncer 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). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica de la solicitud. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para el tratamiento del cáncer. La etiqueta o prospecto comprenderán además instrucciones para administrar una composición con el anticuerpo, el oligopéptido o la molécula orgánica al paciente con cáncer. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), 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 y jeringas.

[0271] También se proporcionan kits que son útiles para varios objetivos, por ejemplo, para ensayos para matar células que expresan TAHO, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido TAHO a partir de células. Para el aislamiento y purificación de polipéptido TAHO, el kit puede contener un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica acoplada a esferas (por ejemplo, esferas de sefarosa). Los kits se pueden disponer conteniendo los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de polipéptido TAHO in vitro, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociados con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica de la solicitud. Se pueden incluir recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes, tampones y anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso in vitro pretendido o de uso.

M. Usos de polipéptidos TAHO y ácidos nucleicos que codifican polipéptidos TAHO

[0272] Las secuencias de nucleótidos (o sus complementos) que codifican los polipéptidos TAHO tienen diferentes aplicaciones en el campo de biología molecular, incluyendo usos tales como sondas de hibridación, en la localización en cromosomas y genes y en la generación de sondas de ARN y ADN no codificante. El ácido nucleico que codifica TAHO también será útil para la preparación de los polipéptidos TAHO mediante técnicas recombinantes descritas aquí, donde estos polipéptidos TAHO pueden ser útiles, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos anti-TAHO tal como se describen aquí.

[0273] Se puede usar el gen de TAHO de secuencia nativa y longitud completa, o partes del mismo, como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de TAHO de longitud completa o para aislar otros ADNcs (por ejemplo, aquellos que codifican variantes naturales de TAHO o TAHO de otras especias) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de TAHO nativa descrita aquí. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente entre 20 y aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivar de regiones por lo menos parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud nativa, donde estas regiones pueden determinarse sin una experimentación excesiva o partir de las secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos potenciadores e intrones de la secuencia nativa de TAHO. A modo de ejemplo, un procedimiento de cribado comprenderá aislar la región codificante del gen de TAHO usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Se puede marcar las sondas de hibridación con una variedad de marcadores, incluyendo radionucleótidos tales como ^{32}P o ^{35}S o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda mediante sistemas de acoplamiento avidita/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen de TAHO de la presente solicitud se pueden usar para cribar las bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ANRm para determinar a qué miembros de estas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen detalladamente en los Ejemplos más abajo. De manera similar se puede emplear como sonda cualquiera de las secuencias EST descritas en la presente solicitud usando los procedimientos descritos aquí.

[0274] Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican TAHO incluyen oligonucleótidos codificantes o no codificantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o ARN o ADN) de cadena única capaz de unirse

a las secuencias diana de ARNm de TAHO (codificante) o de ADN de TAHO (no codificante). Los oligonucleótidos no codificantes o codificantes, según la presente solicitud, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de TAHO. Dicho fragmento generalmente comprende por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente entre 14 y 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido codificante o no codificante, en base a una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se describe, por ejemplo, en Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) y Van der Krol et al. (Bio Techniques 6:958, 1988).

[0275] La unión de oligonucleótidos codificantes o no codificantes a las secuencias de ácido nucleico diana da lugar a la formación de cadenas dobles que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno de una serie de medios, incluyendo la mayor degradación de las cadenas dobles, la terminación prematura de la trascripción o la traducción, o mediante otros medios. Dichos procedimientos se describen en la presente solicitud. Los oligonucleótidos no codificantes se pueden usar por tanto para bloquear la expresión de proteínas TAHO, donde dichas proteínas TAHO pueden jugar un papel en la inducción del cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos codificantes o no codificantes comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones a azúcares, tales como las descritos en WO 91/06629) y donde dichas uniones a azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones a azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática), pero retienen la especificidad de secuencia para poder unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

[0276] Las zonas intragénicas preferidas para la unión no codificante incluyen la región que incorpora el codón de inicio/comienzo de la traducción (5'-AUG, 5'-ATG) o el codón de terminación/parada (5'-UAA, 5'-UAG y 5-UAG/5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA) del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Estas regiones se refieren a una parte del ANRm o gen que abarca aproximadamente entre 25 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio o terminación de la traducción. Otras regiones preferidas para la unión no codificante incluyen: intrones; exones; uniones intrón-exón; el marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que es la zona entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción; la caperuza ("cap") en 5' de un ARNm que comprende un residuo de guanosina de metilado en N7 unido al residuo 5' del ANRm a través de una unión de trifosfato 5'-5' e incluye la propia estructura de caperuza en 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la caperuza; la región 5' no traducida (5'UTC); la parte de un ANRm en la dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción, y de este modo incluyendo nucleótidos entre el sitio de la caperuza en 5' y el codón de inicio de la traducción de un ANRm o los nucleótidos correspondientes en el gen; y la región 3' no traducida (3'UTR), la parte de un ANRm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y de este modo incluyendo los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ANRm o los nucleótidos correspondientes en el gen.

[0277] Entre los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles para inhibir la expresión de proteínas TAHO se incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o uniones entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que presentan esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los objetivos de esta memoria, y tal como se hace referencia a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto entre nucleósidos también pueden considerarse como oligonucleósidos. Entre los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos se incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosofnatos de metilo y otros alquilos, incluyendo 3'-alquileno fosfonatos, 5'-alquileno fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos que tienen uniones normales 3'-5', análogos de estos unidos por 2'-5', y los que tienen una polaridad invertida, donde una o más uniones entre nucleótidos son una unión 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden una única unión 3' a 3'en la unión entre nucleótidos en 3', es decir un residuo de nucleódiso invertido único que puede ser abásico (falta la nucleobaseo tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de uniones que contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 y 5,625,050.

[0278] Los esqueletos de oligonucleótidos preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos presentan esqueletos que están formados por uniones ente nucleósidos con alquilos de cadena corta o cicloalquilo, heteroátomos mezclados y uniones entre nucleósidos con alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones entre nucleósidos heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estas incluyen aquellas que tienen uniones morfolino (formadas en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes con componentes N, O, S y CH_2 mezclados. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,034,506;

5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,5 62; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 y 5,677,439.

[0279] En otros oligonucleótidos no codificantes preferidos, la unión de tanto del azúcar como ente nucleósidos, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de las bases se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácidos nucleicos diana apropiado. A uno de dichos compuestos oligoméricos, un oligonucléotido mimético que se ha observado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se hace referencia como ácido nucleico de péptido (PNA). En los compuestos PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se mantienen y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos PNa incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262. Más sobre los compuestos PNA se puede encontrar en Nielsen et al, Science, 1991, 254, 1497-1500.

[0280] Los oligonucleótidos no codificantes preferidos incorporan esqueletos de fosforotioato y/o esqueletos de heteroátomos, y en particular, -CH_2-NH-O-CH_2-, -CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-[conocido como esqueleto metilen (metilimino) o MMI], -CHO-N(CH_3)-CH_2-, -CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2- y -O-N(CH)-CH_2-CH_2- [donde el esuqeleto de fosfodiéster nativo está representado como -O-P-O-CH_2-] descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5,489,677 indicada anteriormente, y los esqueletos de amida de la Patente de Estados Unidos No. 5,602,240 indicada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos no codificantes que tienen estructuras de esqueeto de morfolino de la Patente de Estados Unidos No. 5,034,506 indicada anteriormente.

[0281] los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más grupos azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquil, S-alquil, o N-alquil; O-alquenil, S-alquenil, o N-alquenil; O-alquinil, S-alquinil o N-alquinil; o O-alquil-O-alquil, donde el alquil, alquenil y alquinil pueden ser alquilo C_1 a C_{10} o alquenilo y alquinilo C_2 a C_{10} sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son O[$(CH_2)_n$O]$_m$$CH_3$, O$(CH_2)_n$$OCH_3$, O$(CH_2)_n$$NH_2$, O$(CH_2)_n$$CH_3$, O$(CH_2)_n$$ONH_2$, y O$(CH_2)_n$ON[$(CH_2)nCH_3$)]$_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos no codificantes preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior de C_1 a C_{10}, alquilo inferior sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2 CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, silil sustituido, un grupo divisor de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxi group. Una modificación adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir un grupo O$(CH_2)_2$ON$(CH_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos siguientes, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2).

[0282] Una modificación preferida adicional incluye Ácidos Nucleicos Cerrados (LNAs) en los que el grupo 2'-hidroxilo se une al átomo de carbono 3' ó 4' del anillo de azúcar formando así un grupo de azúcares bicíclicos. La unión es preferiblemente un grupo metileno (-CH_2-)n que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', donde n es 1 ó 2. Los LNAs y la preparación de los mismos se describen en WO 98/39352 y WO 99/14226.

[0283] Otras modificaicones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH_3), 2'-aminopropoxi (2'-$OCH_2CH_2CH_2$ NH_2), 2'-alil (2'-CH_2-CH=CH_2), 2'-O-alil (2'-O-CH_2-CH=CH_2) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación en 2' puede ser en la posición arabino (arriba) o la posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arabino preferida es 2'-F. También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótidos 3' terminal o en oligonucleótidos unidos 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares, tales como grupos ciclobutilo en lugar de azúcares pentofuranosilo. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcares modificados incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; y 5,700,920.

[0284] Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo referidos en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se utiliza aquí, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases primidínicas timina (T), citosina (C) y uracil (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracil, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5- halouracil y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH_3 o -CH_2-C≡CH) uracil y cytosine y otros derivados alquinilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracil, citosina y timina, 5-uracil (pseudouracil), 4-tiouracil, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxil y otras adeninas y guaninas 8-sustitutidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uraciles y

citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas, tales como fenoxazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas G, tales como una fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido [5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrol[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purínica o pirimidínica se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Más nucleobases incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos No. 3,687,808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la solicitud. Enter éstas se incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracil y 5-propinilcitosina. Se ha observado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de las dobles cadenas de ácido nucleico en 0,6-1,2 grados C. (Sanghvi et al, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de los ázucares 2'-O-metoxietil. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de nucleobases modificadas incluyen, pero sin limitación, Patente de Estados Unidos No. 3,687,808, así como las Patentes de estados Unidos No.: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,583; 6,005,096; 5,681,941 y 5,750,692.

[0285] Otra modificación de oligonucleótidos no codificantes que se unen químicamente a uno o más grupos del oligonucleótido o conjugados que aumentan la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la solicitud pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la solicitud incluyen intercaladotes, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas de oligómeros y grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y colorantes. Los grupos que aumentan las propiedades farmacodínámicas, en este contexto de la solicitud, incluye grupos que mejoran la captación del oligómero, aumentan la resistencia del oligómero a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas, en este contexto de la solicitud, incluyen grupos que mejoran la capatación, distribución, metabolismo o excreción de oligómero. Los grupos conjugados incluyen, pero sin limitación, grupos lipídicos, tales como un grupo colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o residuos undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un grupo palmitil (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un grupo octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la solicitud también se pueden conjugar a sustancias farmacológica activas, por ejemplo, aspirina, warfarin, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, cetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los cojugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de Patente de Estados Unidos Ser. No. 09/334,130 (presentada el 15 Junio de 1999) y las patentes de Estados Unidos Nos.: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,243,022; 5,254,469; 3,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 3,292,873; 5,317,098; 3,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

[0286] No es necesario que todas las posiciones de un compuesto determinado se modifiquen uniformemente, y de hecho, se pueden incorporar más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente en un único compuesto o incluso en un único nucleósido en un oligonucleótido. La presente solicitud también describe compuestos no codificantes que con compuestos quiméricos. Los compuestos no codificantes "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta solicitud, son compuestos no codificantes, particularmente oligonucleótidos, que contiene dos o más regiones químicamente distintas, cada una formada por por lo menos una unidad monomérica, es decir, un

nucleótidos en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen habitualmente por lo menos una región en la que se modifica el oligonucleótido para conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasa, una mayor captación celular y/o una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de dividir los híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARnasa H es una endonucleasa celular que divide la cadena de ARN de la cadena doble ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por tanto, da lugar a la división del ARN diana, aumentando ampliamente así la eficacia de la inhibición de oligonucleótidos de la expresión génica. Consecuentemente, se pueden obtener a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. Los compuestos no codificantes quiméricos se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o oligonucleótidos tal como se han descrito anteriormente. Los oligonucleótidos no codificantes quiméricos preferidos incorporan por lo menos una azúcar modificado en 2' (preferiblemente 2'-O-$(CH2)_2$-O-CH_3) en el extremo 3' terminal para conferir resistencia a la nucleasa y una región con por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguas para conferir la actividad de ARNasa H. Dichos compuestos también se refieren en la técnica como híbridos o espaciómeros ("gapmers"). Los "gapmers" preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (2'-O-(CH2)2-O-CH3) en el extremo 3' terminal y el extremo 5' terminal separados por por lo menos una región que tiene por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguos y preferiblemente incorporan uniones de la estructura de fosforotioato. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,978; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; S, 652,355; 5,652,356; y 5,700,922.

[0287] Los compuestos no codificantes se pueden fabricar convenientemente y rutinariamente a través de la técnica conocida de la síntesis de fase sólida. El equipo para dicha síntesis es comercializado por varios vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se puede utilizar, adicional o alternativamente, cualquier otro medio para dicha síntesis conocida en la técnica. Se conoce que se utilizan técnicas similares para preparar oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o en cualquier caso asociarse con otras moléculas, estructurales moleculares o mezclas de compuestos, tales como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar e la captación, distribución, y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones auxiliares de captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,321,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020;5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; S,S 1Z,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; y 5,595,756.

[0288] Otros ejemplos de oligonucleótidos codificante o no codificantes incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a grupos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros grupos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L-lisina). Además, agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos, se pueden unir a oligonucleótidos codificantes o no codificantes para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido codificante o no codificante por la secuencia de nucleótidos diana.

[0289] Los oligonucleótido no codificantes o codificante se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante cualquier procedimiento de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, la electroporación de transfección de ADN mediada por $CaPO_4$, o mediante la utilización de vectores de transferencia génica, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, se inserta un oligonucleótido no codificante o codificante en un vector retroviral adecuado. Se pone en contacto una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana con el vector retroviral recombinante, in vivo o ex vivo. Entre los vectores retrovirales adecuados se incluyen, pero sin limitación, los derivados de los retrovirus murinos M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de la doble copia designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

[0290] Los oligonucleótidos codificante o no codificantes también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, tal como se describe en WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero sin limitación, receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando de unirse a su molécula o receptor correspondiente, o de bloquear la entrada del oligonucleótido codificante o no codificante o su conjugado en la célula.

[0291] Alternativamente, un oligonucleótido codificante o no codificante se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal como se describe en WO 90/10448. El complejo de oligonucleótido codificante o no codificante-lípido se disocia preferiblemente en la célula mediante una lipasa endógena.

[0292] Las moléculas ARN o AND no codificante o codificantes tienen generalmente por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165,170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos 10% de esa longitud de referencia.

[0293] Las sondas se pueden emplear en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para identificar secuencias codificantes de TAHO estrechamente relacionadas.

[0294] Las secuencias de nucleótidos que codifican TAHO se pueden usar además para construir sondas de hibridación para la localización del gen que codifica este polipéptido TAHO y para el análisis genético de individuos con alteraciones genéticas. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden usar para la localización de un cromosoma y regiones específicas del cromosoma usando técnicas conocidas como la hibridación *in situ*, análisis de unión frente marcadores cromosómicos conocidos y cribado de genotecas por hibridación.

[0295] Cuando las secuencias codificantes para TAHO codifican una proteína que se une a otra proteína (ejemplo, cuando el TAHO es un receptor), los TAHO se pueden usar en análisis para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos procedimientos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción de unión receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión se pueden usar además para cribar péptidos o pequeñas moléculas inhibidoras o agonistas de la interacción de unión. Además, el receptor TAHO se puede utilizar para aislar el ligando o ligandos correlativos. Se pueden diseñar ensayos de cribado para encontrar compuestos guía que mimeticen la actividad biológica del polipéptido TAHO nativo o un receptor para TAHO. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles para un cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolas particularmente adecuadas para identificar candidatos farmacológicos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en varios formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos celulares, caracterizados en la técnica.

[0296] Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido TAHO o sus formas modificadas se pueden usar además para generar animales transgénicos o animales "*knock out*" (sin un determinado gen) que a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual fue introducido en el animal o un ancestro del animal en una etapa prenatal, por ejemplo, en una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir del cual se desarrolla un animal. En una realización, el ADNc que codifica un polipéptido TAHO se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifique el polipéptido TAHO según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar los animales transgénicos que contienen las células que expresan el ADN que codifica el polipéptido TAHO. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N^{o} 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, las células particulares serán las dianas para la incorporación de un transgén del polipéptido TAHO con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica un polipéptido TAHO introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria se pueden usar para examinar el efecto de la expresión aumentada del ADN que codifica el polipéptido TAHO. Dichos animales se pueden usar como animales de prueba para reactivos que se cree que confieren protección frente, por ejemplo, a estados patológicos asociados con su sobreexpresión. Se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida del estado patológico en comparación con los animales sin tratar que lleven el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para el estado patológico.

[0297] Alternativamente, se pueden usar homólogos no humanos de los polipéptidos TAHO para construir un animal "*knock out*" para el polipéptido TAHO que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica el polipéptido TAHO como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido TAHO y un ADN genómico alterado que codifica el polipéptido TAHO introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, se puede utilizar ADNc que codifica un polipéptido TAHO para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido TAHO según las técnicas establecidas. Se puede eliminar o reemplazar una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido TAHO por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que se usa para controlar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias quilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') [ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homólogamente con el ADN endógeno [ver por ejemplo, Li y col., Cell, 69: 915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocito de un animal (por ejemplo, ratón o rata) para formar quimeras de agregación [ver por ejemplo, Bradley, en

"*Teratocarcinomas and Embrionyc Stem Cells: A Practical Approach",* (Teratocarcinomas y células troncales embrionarias: Un enfoque práctico), E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs 113-125]. Un embrión quimérico se puede después implantar en un animal de crianza hembra pseudopreñada adecuada y el embrión nace para crear un animal "*knock out*". La progenie que porta el ADN recombinado homólogamente en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas habituales y se puede usar para criar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado homólogamente. Los animales "*knock out*" se pueden caracterizar por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente ciertos estados patológicos y por su desarrollo de estados patológicos debido a la ausencia del polipéptido TAHO.

[0298] EL ácido nucleico que codifica los polipéptidos TAHO también se pueden utilizar en terapia génica. En las aplicaciones de terapia génica, se introducen los genes en células con el fin de conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. “Terapia génica” incluye tanto la terapia génica convencionales en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, lo cual implica la administración de una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Se pueden utilizar ARNs o ADNs no codificantes como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Se ha observado que se pueden importar oligonucleótidos no codificantes cortos en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus concentraciones intracelulares bajas causadas por su captación limitada por la membrana celular. (Zamenick et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA83; 4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados.

[0299] Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Entre las técnicas actuales de transferencia de genes *in vivo* preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (habitualmente retrovirales) y transfección mediada por liposomas recubiertos de proteína viral (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que reconoce 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 el reconocimiento y/o facilitar la captación de, por ejemplo, proteínas cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan la internalización en el ciclado, y proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor es descrita, por ejemplo, por Wu et al., J. Biool. 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 génico y terapia génica, véase Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992).

[0300] Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos TAHO o fragmentos de los mismos descritos en la presente invención son útiles para la identificación de cromosomas. En este aspecto, existe una necesidad actual para identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que, en base a los datos de secuencias reales, existen actualmente relativamente pocos reactivos marcadores cromosómicos. Cada molécula de ácido nucleico de TAHO de la presente invención se puede utilizar como marcador cromosómico.

[0301] Los polipéptidos TAHO y las moléculas de ácido nucleico de la presente solicitud también se pueden utilizar para el diagnóstico de la tipificación del tejido, donde los polipéptidos TAHO de la presente solicitud se pueden expresar diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferiblemente en un tejido enfermo en comparación con tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácido nucleico de TAHO serán útiles para generar sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

[0302] Esta solicitud describe procedimientos de cribado de compuestos para identificar aquellos compuestos que mimetizan el polipéptido TAHO (agonistas) o prevenir el efecto del polipéptido TAHO (antagonistas). Los ensayos de cribado de fármacos candidatos antagonistas están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos TAHO codificados por los genes identificados aquí, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la expresión de polipéptido TAHO a partir de células. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de pequeñas moléculas como fármacos candidatos.

[0303] Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

[0304] Todos los ensayos tienen en común que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido

TAHO codificado por un ácido nucleico aquí identificado en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interaccionen.

[0305] En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido TAHO codificado por el gen identificado aquí o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se realiza mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido TAHO y dejándolo secar. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido TAHO a ser inmovilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente fijado. Cuando la reacción se ha completado, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos fijados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que el complejo se ha formado. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la formación del complejo, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0306] Si el compuesto candidato interacciona pero no se une a un polipéptido TAHO particular codificado por un gen identificado aquí, su interacción con este polipéptido puede ser analizada mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como el entrecruzamiento, la coinmunoprecipitación, y la copurificación a través de gradientes o en columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields and Song, Nature, 340:245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)] como se describe en Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)]. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones antes mencionadas (generalmente denominados como “sistema del doble híbrido”) aprovecha esta propiedad, y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1/*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4, depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β-galactosidasa. Existe un kit completo (MATCHMAKER^{TM}) disponible comercialmente por Clontech para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica del doble híbrido. Este sistema también puede extenderse para localizar dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas, así como para señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0307] Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido TAHO identificado aquí y otros componentes intra o extracelulares pueden ser analizados tal como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo para permitir la interacción y la unión de los dos productos. Para analizar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto a analizar. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para utilizarse como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto a analizar y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla tal como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción, que contiene el compuesto a analizar indica que el compuesto a analizar interfiere con la interacción del compuesto a analizar y su pareja de reacción.

[0308] Para analizar antagonistas, el polipéptido TAHO puede añadirse a una célula junto con el compuesto a cribar por una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido TAHO indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO. Alternativamente, se pueden detectar antagonistas mediante la combinación del polipéptido TAHO y un potencial antagonista con receptores del polipéptido TAHO unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido TAHO puede marcarse, mediante, por ejemplo, radioactividad, de manera que el número de moléculas del polipéptido TAHO unidas al receptor pueden usarse para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, “panning” de ligandos y separación por FACS. Coligan et al., Current Protocolos in Immun., 1(2): capítulo 5(1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión donde se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido TAHO y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO. Las células transfectadas que crecen en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido TAHO marcado. El polipéptido TAHO puede marcarse mediante distintos medios incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para un sitio. Tras la fijación e incubación, los

portaobjetos se someten a un análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y se preparan subgrupos y se retransfectan usando un proceso interactivo de subagrupamiento y recribado, que finalmente producen un único clon que codifica el supuesto receptor.

[0309] Como estrategia alternativa para la identificación de un receptor, el polipéptido TAHO marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana o extractos celulares que expresan la molécula receptora. El material entrecruzado se resuelve por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede cortarse, separarse en pequeños fragmentos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida por microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

[0310] En otro ensayo para antagonistas, se incubarían células de mamífero o una preparación de membrana que expresan el receptor con el polipéptido TAHO marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto de aumentar o bloquear esta interacción.

[0311] Ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con el polipéptido TAHO y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un potencial antagonista puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido TAHO que reconozca el receptor, pero que no ejerza ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido TAHO.

[0312] Otro antagonista potencial del polipéptido TAHO es una construcción de ARN o ADN no codificante preparada usando la tecnología no codificante, donde, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN no codificante actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm mediante la hibridación con el ARNm diana y evitando la traducción de la proteína. La tecnología no codificante puede usarse para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o del ADN o ARN no codificante, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido al ADN o al ARN. Por ejemplo, la región codificante 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica el polipéptido TAHO maduro de la presente invención se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN no codificante de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice- véase, Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:456 (1988): Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)], evitando así la transcripción y la producción del polipéptido TAHO. El oligonucleótido de ARN no codificante se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido TAHO (no codificante-Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expresión (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden también liberarse a células, de manera que el ARN o ADN no codificante puede ser expresado *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido TAHO. Cuando se usa un ADN no codificante, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del la región de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones de aproximadamente -10 a +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0313] Los antagonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el sitio de unión del receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido TAHO, bloqueando de este modo la actividad biológica normal del polipéptido TAHO. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero sin limitación, péptidos o moléculas de tipo péptido pequeñas, preferiblemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

[0314] Los ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión específicos de ribozimas en un ARN diana potencial se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4: 469-471 (1994), y la publicación PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre 1997).

[0315] Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser de cadena sencilla y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que provoca la formación de una triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, lo cual requiere generalmente tramos ajustables de purinas o pirimidinas en una cadena de una cadena doble. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO 97/33551, supra.

[0316] estas moléculas pequeñas se pueden identificar mediante uno o más de los ensayos de cribado descritos anteriormente y/o mediante cualquiera otra técnica de cribado conocida para los expertos en la materia.

[0317] El ácido nucleico codifica el polipéptido TAHO se puede utilizar aquí para la producción recombinante de polipéptido TAHO utilizando técnicas conocidas en el sector y tal como se describen aquí. A su vez, los polipéptidos TAHO producidos se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-TAHO utilizando técnicas conocidas en el sector y

tal como se describen aquí

[0318] Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido TAHO identificados aquí, así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente aquí, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos, incluyendo cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

[0319] Si el polipéptido TAHO es intracelular y los anticuerpos completos se utilizan como inhibidores, se prefieren anticuerpos internalizantes. Sin embargo, también se pueden utilizar lipofecciones o liposomas para liberar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

[0320] La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de manera adversa entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas se presentan de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo determinado.

[0321] Los siguientes ejemplos se ofrecen con sólo objetivos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

[0322] Se utilizaron reactivos disponibles comercialmente en los ejemplos según las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. Los anticuerpos utilizados en los ejemplos son anticuerpos disponibles comercialmente e incluyen, pero sin limitación, anti-CD180 (eBioscience MRH73-11, BD Pharmingen G28-8) y Serotec MHR73), anti-CD20 (Ancell 2H7 y BD Pharmingen 2H7), anti-CD72 (BD Pharmingen J4-117), anti-CXCR5 (R&D Systems 51505), anti-CD22 (Ancell RFB4, DAKO To15, Diatec 157, Sigma HIB-22 y Monosan BL-BC34), anti-CD22 (Leinco RFB-4 y NeoMarkers 22C04), anti-CD21 (ATCC HB-135 y ATCC HB5), anti-HLA-DOB (BD Pharmingen DOB.L1), anti-CD79a (Caltag ZL7-4 y Serotec ZL7-4), anti-CD79b (BiomedaSN8 y BD Pharmingen CB-3), anti-CD19 (Biomeda CB-19), anti-FCER2 (Ancell BU38 y Serotec D3.6 y BD Pharmingen M-L233). 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, VA.

EJEMPLO 1: Análisis de datos por microarray de la expresión de TAHO

[0323] Los datos de microarray implican el análisis de la expresión de TAHO por la acción del análisis de microarray de ADN en una amplia variedad de muestras de ARN de tejidos y células cultivados. Las muestras incluyen tejido humano normal y canceroso y varios tipos de células inmunes purificadas ambas en reposo y posterior a la estimulación externa. Estas muestras de ARN se pueden analizar según los protocolos de microarray regular en microarrays Agilent.

[0324] En este experimento, se aisló ARN de células y se generaron sondas de ARNc marcadas con cianina-3 y cinaina-5 mediante transcripción in vitro utilizando el kit de amplificación lineal fluorescente de ARN de input bajo Agilent (Agilent). Se utilizó cianina-5 para marcar las muestras a analizar para la expresión del polipéptido PRO, por ejemplo, el mieloma y las células plasmáticas, y se utilizó cianina-3 para marcar la referencia universal (el grupo de líneas celulares de Stratagene) con la que se comparó la expresión de las muestras de prueba. Se hibridaron 0,1 µg-0,2 mg la sonda de ARNc marcada con cianina-3 y cianina-5 con chips de grupos de oligonucleótidos de 60 unidades Agilent utilizando el Kit de Hibridación in situ plus (Agilent). Estas sondas se hibridaron a microarrays. Para el análisis del mieloma múltiple, las sondas se hibridaron a microarrays de oligonucleótidos de Genoma Humano Completo Agilent utilizando las condiciones y tampones estándar (Agilent) recomendados por Agilent.

[0325] Las sondas de ARNc se hibridaron a los microarrays a 60°C durante 17 horas en un centrifugador para hibridación fijado a 4 RPM. Después del lavado, se rastrearon con el escáner de microarrays Agilent que era capaz de excitar y detectar la fluorescencia de las moléculas fluorescentes de cianina-3 y cianina-5 (líneas láser a 532 y 633 nm). Los datos para cada gen en el grupo de oligonucleótidos de 60 unidades se extrajeron de la imagen del microarray rastreado utilizando el software de extracción de características de Agilent que representa el reconocimiento de características, la sustracción del fondo y la normalización y los datos resultantes se cargaron en el paquete de software conocido como Rosetta Resolver Gene Expression Data Analysis System (Rosetta Inpharmatics, Inc.). Rosetta Resolver incluye una base de datos de relación y numerosas herramientas analíticas para guardar, extraer y analizar grandes cantidades de datos de intensidad o proporción de expresión de genes.

[0326] En este ejemplo, se obtuvieron células B y células T (control) para el análisis por microarray. Para el aislamiento de células B intactas y células B de memoria y célula plasmáticas, se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de cualquiera de los paquetes leucocitarios proporcionados por cuatro donantes masculinos sanos o de toda la sangre de varios donantes normales. Se aislaron células plasmáticas CD138+ de PBMC utilizando el sistema de separación magnética de células MACS (Miltenyi Biotec) y esferas anti-CD138. Alternativamente, se seleccionaron las células B CD19+ totales con esferas anti-CD19 y separación MACS. Después del enriquecimiento de CD19+ (pureza del alrededor del 90%), se realizó una separación FACS (Moflo) para separar células b intactas y células B de memoria. Las células separadas se recogieron sometiendo las muestras a centrifugación. Las células separadas se lisaron inmediatamente en tampón LTR y se homogeneizaron con una columna de centrifugación QIAshredder (Qiagen), seguido por mini kit RNeasy para la purificación de ARN. El rendimiento de ARN fue variable de 0,4 a 10 μg y dependía del número de células.

[**0327**] Como control, se aislaron células T para análisis por microarray. Se aislaron células CD8 de sangre periférica de paquetes leucocitarios mediante selección negativa utilizando el kit de aislamiento de células CD8 de Stem Cell Technologies (Rosette Separation) y se purificó adicicionalmente mediante el sistema de separación magnética de células MACS utilizando el kit de aislamiento de células CD8 y se añadieron microesferas CD45RO para extraer las células CD45RO (Miltenyi Biotec). Las células T CD8 se dividieron en 3 muestras con cada muestra sometida a la estimulación que se indica a continuación: (1) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, más IL-12 y anti-IL4, (2) anti-CD3 y anti-CD29 sin añadir citoquinas o anticuerpos neutralizantes y (3) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, más IL-4, anticuerpos anti-IL12 y anticuerpo anti-IFN-γ. 48 horas después de la estimulación, se recogió el ARN. Después de 72 horas, las células se expandieron mediante la adición de una dilución de 8 veces con medio fresco. 7 días después de recoger el ARN, se recogieron las células Cd8, se lavaron y se estimularon por anti-CD3 y anti-CD28. 16 horas más tarde, se realizó una segunda recogida de ARN. 48 horas después de la reestipulación, se realizó una tercera recogida de ARN. Se recogió el ARN utilizando preparaciones Qiagen Midi según las instrucciones del manual con la adición de una digestión con ADNsa en columna después de la primera etapa de lavado RW1. Se eluyó el ARN en agua libre de ARNsa y posteriormente se concentró mediante precipitación con etanol. El ARN precipitado se tomó en agua libre de nucleasa hasta una concentración mínima final de 0,5 μg/μl.

[0328] Los microarrays de control adicionales se realizaron en ARN aislado de células T CD4+, células T auxiliares, células asesinas naturales (NK), neutrófilos (N'phil), monocitos CD14+, CD16+ y CD16- y células dendríticas (DC).

[0329] Se realizaron microarrays adicionales en ARN aislado de tejido canceroso, tal como Linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL) y mieloma múltiple (MM). Se realizaron microarrays adicionales en ARN aislado de células normales, tales como de nódulo linfático normal (NLN), células B normales, tales como Células B de centroblastos, centrocitos y manto folicular, células B de memoria, y células plasmáticas normales (PC), que son del linaje de células B y son equivalentes normales de la célula de mieloma, tal como células plasmáticas de amígdala, células plasmáticas de médula ósea (BM PC), células plasmáticas CD19+ (CD19+ PC), células plasmáticas CD19- (CD19- PC). Se realizaron microarrays adicionales en tejido normal, tal como cerebelo, corazón, próstata, glándula adrenal, vejiga, intestino delgado, colon, hígado fetal, útero, riñón, placenta, pulmón, páncreas, músculo, cerebro, glándula salivar, médula ósea, sangre, timo, amígdala, bazo, testículos, y glándula mamaria.

[0330] Las moléculas indicadas a continuación se han identificado por expresarse de manera significativa en células B en comparación con células no B. Específicamente, las moléculas se expresan de manera diferencial en células B intactas, células B de memoria que son IgGA+ o IgM+ y células plasmáticas de PBMC o médula ósea, en comparación con Células no B, por ejemplo células T. Por consiguiente, estas moléculas representan dianas excelentes para la terapia de tumores en mamíferos.

Molécula	Expresión específica en:	en comparación con:
DNA88116 (TAH026)	Células B	Células no B

Resumen

[0331] En la figura 91, la expresión de ARNm significativa se indicó en general como un valor de la proporción superior a 2 (eje vertical de la figura 91). En la figura 91, cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal mediante linfocitos o pérdida de la integridad de la muestra por el suministrador.

(19) TAHO26 (también referida en el presente documento como CD22) se expresó significativamente en células B normales (NB) (figura 91).

[0332] Como TAHO26 se ha identificado por expresarse significativamente en células B y en muestras de enfermedades asociadas a células B, tales como el linfoma no de Hodgkin, linfoma folicular y mieloma múltiple en comparación con las células no B detectado mediante análisis por microarray, la molécula es una excelente diana para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas, leucemias, mielomas y otros cánceres de células hematopoyéticas.

EJEMPLO 2: Análisis cuantitativa de la expresión de ARNm de TAHO

[0333] En este ensayo, se utilizaron un ensayo de 5' nucleasa (por ejemplo, TaqMan®) y PCR cuantitativa a tiempo real (por ejemplo, Mx3000P™ Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA)), para encontrar genes que se sobreexpresan significativamente en un tipo de tejido específico, tal como células B, en comparación con un tipo de célula diferente, tal como otros tipos de glóbulos blancos primarios, y que además se pueden sobreexpresar en células cancerosas del tipo de tejido específico en comparación con células no cancerosas del tipo de tejido específico. La reacción del ensayo de 5' nucleasa es una técnica basada en PCR fluorescente que utiliza la actividad de 5' exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para controlar la expresión génica a tiempo real. Se utilizan dos cebadores de oligonucleótidos (cuyas secuencias se basan en el gen o la secuencia EST de interés) para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótidos, o sonda, para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extendible por la enzima Taq ADN polimerasa, y se marca con un colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente desactivador. Cualquier emisión inducida por láser del colorante informador es desactivado por el colorante desactivador cuando los dos colorantes se encuentran próximos al estar en la sonda. Durante la reacción de amplificación con PCR, la enzima Taq ADN polimerasa divide la sonda de una forma dependiente de la plantilla. Los fragmentos de la sonda resultantes se disocian en solución y la señal del colorante informador liberado está libre del efecto desactivador del segundo fluoróforo. Se libera una molécula del colorante informador para cada nueva molécula sintetizada y la detección del colorante informador no desactivado proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

[0334] El procedimiento de 5' nucleasa se desarrolla en un dispositivo de PCR cuantitativo a tiempo real, tal como el Mx3000™ Real-Time PCR System. El sistema consiste en un termociclador, una lámpara de cuarzo-tungsteno, un tubo fotomultiplicador (PMT) para la detección y un ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge a tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos y se detecta en el PMT. El sistema incluye software para desarrollar el instrumento y para analizar los datos. El material de partida para el cribado fue ARNm (50 ng/pocillo desarrollado por duplicado) aislado de una variedad de diferentes tipos de glóbulos blancos (Neturophil (Neutr), células asesinas naturales (NK), Células dendríticas (Dend.), Monocitos (Mono), células T (subgrupos CD4+ y CD8+), células madre (CD34+), así como 20 donantes de células B separados (donantes Ids 310, 330, 357, 362, 597, 635, 816, 1012, 1013, 1020, 1072, 1074, 1075, 1076, 1077, 1086, 1096, 1098, 1109, 1112) para analizar la viabilidad del donante. Todo el ARN se adquirió comercialmente (AllCells, LLC, Berkeley, CA) y la concentración de cada uno se midió con exactitud siguiendo instrucciones. El ARNm se cuantifica de manera exacta, por ejemplo, fluorimétricamente.

[0335] Los datos del ensayo de la 5' nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o ciclo umbral. Éste se define como el ciclo en el que la señal informadora se acumula por encima del nivel base de fluorescencia. Los valores ΔCt se utilizan como medida cuantitativa del número relativo de copias de partida de una secuencia diana particular en una muestra de ácido nucleico. Como una unidad Ct corresponde a 1 ciclo de PCR o aproximadamente a un incremento relativo de 2 veces en relación al normal. Dos unidades corresponde a un incremento relativo de 4 veces, 3 unidades corresponde a un incremento relativo de 8 veces y así sucesivamente, se puede medir cuantitativamente el incremento relativo de veces en la expresión de ARNm entre dos o más tejidos diferentes. Cuanto más bajo es el valor de ct en una muestra, mayor es el número de copias de partida de ese gen en concreto. Si se incluye una curva estándar en el ensayo, la cantidad relativa de cada diana se puede extrapolar y facilita la visión de los datos ya que un número elevado de copias también presenta cantidades relativas (en oposición a un número de copias elevadas que tiene valores Ct inferiores) y también corrige cualquier variación de la regla generalizada de que 1Ct es igual a un incremento de 2 veces. Utilizando esta técnica, se han identificado las moléculas indicadas a continuación por sobreexpresarse de manera significativa (es decir, por lo menos 2 veces) en un único (o número limitado) de tejidos específicos o tipos de células específicos en comparación con un tejido o tipo de células diferente (del mismo y diferentes donantes de tejido), identificándose también algunas por sobreexpresarse significativamente (es decir, por lo menos 2 veces) en células cancerosas cuando se compara con células normales del tejido o tipo de célula particular y, de este modo, representan polipéptidos diana excelentes para la terapia contra el cáncer en mamíferos.

Molécula	expresión específica en:	en comparación con:
DNA8816 (TAHO26)	Células B	Células no B

Resumen

[0336] Los niveles de expresión de TAHO26 en ARN total aislado de células B purificadas o de células B de 20 donantes de células B (310-1112) (AllCell) y promedio (Avg. B) fue significativamente superior que los respectivos niveles de expresión de TAHO26 en ARN total aislado de varios tipos de glóbulos blancos, neutrófilos (Neutr), células asesinas naturales (NK) (un subgrupo de células T), células dendríticas (Dend), monocitos (Mono), células T CD4+, células T CD8+, células madre CD34+ (datos no mostrados).

[0337] Por consiguiente, como TAHO26 se expresa significativamente en células B en comparación con células no B

según se detecta mediante análisis TaqMan, la molécula es una excelente diana para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

EJEMPLO 4: Utilización de TAHO como sonda de hibridación

[0338] El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica TAHO como sonda de hibridación para, por ejemplo, la detección de la presencia de TAHO en un mamífero.

[0339] El ADN que comprende la secuencia codificante del TAHO de longitud completa o maduro tal como se describe aquí, también se puede utilizar como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de TAHO) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

[0340] 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 de TAHO 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 42ºC durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42ºC.

[0341] A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad secuencial deseada con el ADN que codifica TAHO de secuencia nativa y longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en el sector.

EJEMPLO 5: Expresión de polipéptido de TAHO en *E.coli*

[0342] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de TAHO mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

[0343] La secuencia de ADN que codifica TAHO se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de 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 poli-His (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y sitio de división para la enteroquinasa), la región codificante de TAHO, el terminador transcripcional lambda, y un gen argU.

[0344] 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.

[0345] 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.

[0346] Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína TAHO solubilizada se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

[0347] El TAHO se puede expresar en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His según el procedimiento siguiente. El ADN que codifica TAHO se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contienen sitios para enzimas de restricción que corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de traducción eficiente y fiable, una purificación rápida en una columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His amplificadas por PCR se ligan a continuación en un vector de expresión, que se utiliza para transformar un huésped *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts) clpP(laclq). Los transformantes se desarrollan en primer lugar en LB que contiene carbenicilina 50 mg/ml a 30ºC con agitación hasta alcanzar una D.O. de 3-5 a 600 nm. Los cultivos se diluyen entonces 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,71 g de citrato sódico·$2H_2O$, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y $MgSO_4$ 7 mM) y se desarrollan durante aproximadamente 20-30 horas a 30ºC con agitación. Se toman

muestras para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y se centrifuga todo el cultivo para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta la purificación y renaturalización.

[0348] La pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5-1 l (6-10 g de sedimentos) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón pH 8. Se añaden sulfito sódico sólido y tetrationato sódico hasta concentraciones finales de 0,1 M y 0,02M, respectivamente, y la solución se agita durante toda la noche a 4ºC. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por la sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante de metales (guanidina 6M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micras para purificar. El extracto purificado se carga en una columna quelante Qiagen de Ni^{2+}-NTA de 5 ml equilibrada en el tampón de la columna quelante de metal. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y guardan a 4ºC. La concentración de proteínas se estima por su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

[0349] Las proteína se renaturalizan diluyendo la muestra lentamente en tampón de renaturalización preparado fresco que consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6; NaCl 0,3 M; urea 2,5 M; cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de renaturalización se eligen para que la concentración final se encuentre entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de renaturalización se agita suavemente a 4ºC durante 12-36 horas. La reacción de renaturalización se desactiva mediante la adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de una purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micras y se añade acetonitrilo hasta una concentración final de 2-10%. La proteína renaturalizada se cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H con un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Se analizan alícuotas de fracciones con una absorbancia A_{280} en geles de poliacrilamida-SDS y se agrupan las fracciones que contienen la proteína renaturalizada homogénea. En general, las muestras renaturalizadas de manera adecuada de la mayoría de proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que estas muestras son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos resguardados de la interacción con la resina de fase inversa. Las muestras agregadas se eluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de separar las formas mal plegadas de las proteínas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

[0350] Las fracciones que contienen el polipéptido TAHO plegada deseada se agrupan y se elimina el acetonitrilo con una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mm, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas Superfine G25 (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas de forma estéril.

[0351] Algunos de los polipéptidos TAHo descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta o estas técnicas.

EJEMPLO 6: Expresión de TAHO en células de mamíferos

[0352] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de TAHO mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

[0353] El vector pRK5 (véase, EP 307.247 publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcio4nalmente, el ADN de TAHO se liga en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de TAHO utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook et. al., *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-TAHO.

[0354] 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-[TAHO] 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 $CaCl_2$. A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de $NaPO_4$, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25ºC. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37ºC. 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.

[0355] 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 ^{35}S-cisteína y 200 µCi/ml de ^{35}S- 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 TAHO. Los cultivos que contienen células transfectadas

pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

[0356] En una técnica alternativa, se puede introducir el ADN de TAHO 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-TAHO. 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 TAHO expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

[0357] En otra realización, puede expresarse TAHO en células CHO. El vector pRK5-TAHO puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como $CaPO_4$ 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 ^{35}S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido TAHO, 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 TAHO expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

[0358] El TAHO etiquetado con epítopo puede expresarse también en células CHO huéspedes. El TAHO puede subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclón puede someterse a PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta epítopo seleccionada, tal como una etiqueta de poli-His en un vector de expresión de Baculovirus. El inserto de TAHO etiquetado con poli-His puede subclonarse a continuación en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal 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 TAHO etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelato con Ni^{2+}.

[0359] TAHO se puede expresar en células CHO y/o COS mediante un procedimiento transitorio o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

[0360] La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, CH2 y los dominios de CH2 y/o es una forma etiquetada de poli-his.

[0361] Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar descritas en Ausubel et. al., Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el traslado adecuado de los de ADNc. El vector utilizado para la expresión en las células CHO es tal y como se describe en Lucas et. al., Nucl. Acid Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

[0362] Se introducen doce microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección Superfect® (Quiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se desarrollan tal y como se describe en Lucas et. al., supra. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para el crecimiento y producción posterior tal y como se describe a continuación.

[0363] Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan mediante la colocación en un baño de agua y se mezclan mediante agitación. El contenido se pipetea en un tubo de centrífuga que contiene 10 mL de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 µm con suero bovino fetal al 5% dialfiltrado a 0,2 µm). A continuación, las células se fraccionan en un agitador de 100 mL que contiene 90 mL de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren a un agitador de 250 mL lleno con 150 mL de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37ºC. Después de otros 2-3 días, se siembran 3×10^5 células/mL en agitadores de 250 mL, 500 mL y 2000 mL. El medio celular se cambia por medio fresco mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio de CHO adecuado, en realidad se utiliza un medio de producción descrito en la patente de Estados Unidos No. 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. En un agitador de producción de 3L se siembra a razón de $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determina el número de células y el pH. En el día 1, se

toman muestras del agitador y se inicia el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se toman muestras del agitador, la temperatura se cambia a 33ºC, y se añaden 30 mL de glucosa 500g/L y 0,6 mL de antiespuma al 10% (por ejemplo 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajusta según la necesidad manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un flitro de 0,22 µm. El filtrado se guarda a 4ºC o se carga inmediatamente en columnas para la purificación.

[0364] Para las construcciones etiquetadas de poli-his, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni^{2+}-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni^{2+}-NTA equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4ºC. Tras cargarse, la columna se lava con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guarda a -80ºC.

[0365] Las construcciones de inmunoadhesina (que contiene Fc) se purifican a partir del medio condicionado tal y como se indica a continuación. El medio condicionado se bombea en una columna de Proteína A (Pharmacia) de 5 ml que ha sido equilibrada en un tampón de 20 mM de fosfato sódico, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluída se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 µL de tampón Tris 1M, pH 9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento, tal como el descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-his. La homogeneidad se calcula mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales mediante degradación Edman.

[0366] Algunos de los polipéptidos TAHO descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta o estas técnicas.

EJEMPLO 7: Expresión de TAHO en levadura

[0367] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de TAHO en levadura.

[0368] En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de TAHO a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica TAHO y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de TAHO. Para la secreción, el ADN que codifica TAHO puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal TAHO nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, una secuencia señal/líder secretora del factor alfa o invertasa de levadura, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de TAHO.

[0369] Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y una separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

[0370] El TAHO recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene TAHO puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

[0371] Algunos de los polipéptidos TAHO descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta o estas técnicas.

EJEMPLO 8: Expresión de TAHO en células de insectos infectadas de Baculovirus

[0372] El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante en células de insectos infectadas de Baculovirus.

[0373] La secuencia que codifica para TAHO se fusiona en dirección 5' de un epítopo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichas epítopo etiquetas incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica TAHO o la parte deseada de la secuencia codificante de TAHO, tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con

todas esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

[0374] El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28ºC, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como se describe en O'Reilley et. al., Baculovirus expresion vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

[0375] A continuación, TAHO etiquetado con poli-His expresados puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni^{2+}-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert et. al., Nature, 362: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml de HEPES, pH 7,9; 12,5 mM de $MgCl_2$; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonican dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se depuran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni^{2+}-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A_{280} con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato: 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína no unidas específicamente. Después de alcanzar la línea base a A_{280} de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni^{2+}-NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el TAHO etiquetado con His_{10} eluído, respectivamente, se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

[0376] Alternativamente, la purificación del TAHO etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

[0377] Algunos de los polipéptidos TAHO descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta o estas técnicas.

EJEMPLO 9:Preparación de anticuerpos que se unen a TAHO

[0378] Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a TAHO.

[0379] Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en el sector y están descritas, por ejemplo, en Coding, supra. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen TAHO purificado, proteínas de fusión que contienen TAHO y células que expresan TAHO recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse según el técnico en la materia sin una gran experimentación.

[0380] Los ratones, tal como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de TAHO emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1–100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante de MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se refuerzan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante diversas semanas, los ratones también se pueden reforzar con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-TAHO.

[0381] Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales “positivos” para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de TAHO. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

[0382] Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA para la reactividad contra inmunógeno. La determinación de células de hibridomas "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra inmunógeno está dentro de la técnica.

[0383] Las células de hibridomas positivas se pueden inyectar intraperitonialmente en ratones singeneicos Balb/c para producir fluidos ascíticos que contienen los anticuerpos monoclonales anti-inmunógeno. Alternativamente, las

células de hibridomas pueden desarrollarse en matraces o en botellas en rodillo de cultivos de tejidos. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los fluidos ascíticos se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

[0384] Los anticuerpos dirigidos contra algunos de los polipéptidos TAHO descritos en el presente documento se pueden producir satisfactoriamente utilizando esta técnica o técnicas. Más específicamente, los anticuerpos monoclonales funcionales que son capaces de reconocer y unirse a la proteína TAHO (medido mediante ELISA estándar, análisis de clasificación FACS y/o análisis por inmunohistoquímica) se pueden generar satisfactoriamente contra las siguientes proteínas TAHO descritas en el presente documento: TAHO26 (DNA88116).

[0385] Además de la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos TAHO descritos en el presente documento, muchos de los anticuerpos monoclonales se pueden conjugar satisfactoriamente a una toxina celular para su uso en el direccionamiento de la toxina celular a una célula (o tejido) que expresa un polipéptido TAHO de interés (tanto in vitro como in vivo). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales derivados de la toxina (por ejemplo, DM1) se pueden generar satisfactoriamente contra los siguientes polipéptidos TAHO descritos en el presente documento: TAHO26 (DNA88116).

EJEMPLO 10: Purificación de polipéptidos TAHO utilizando anticuerpos específicos

[0386] Los polipéptidos TAHO nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en las técnicas de purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifica el polipéptido pro-TAHO, el polipéptido TAHO maduro, o el polipéptido pre-TAHO mediante cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido TAHO de interés. En general, una columna de inmunoafinidad está construida por acoplamientos covalentes de anticuerpos anti-polipéptido TAHO a una resina de cromatografía activada.

[0387] Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en la Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J). Así mismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de los fluidos ascíticos de ratón mediante la precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica, tal como la SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0388] Dicha columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido TAHO mediante la preparación de una fracción a partir de células que contienen polipéptido TAHO en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de toda la célula o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por adición de detergente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido TAHO soluble que contiene una secuencia señal podría secretarse en una cantidad útil en el medio en el que las células crecen.

[0389] Una preparación que contiene polipéptido TAHO soluble se pasa por la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorbancia preferencial del polipéptido TAHO (por ejemplo, tampones de fuerza iónica elevada en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión anticuerpo/polipéptido TAHO (por ejemplo, un tampón de pH bajo, tal como aproximadamente un pH de 2-3, o una alta concentración de caótropo, tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido TAHO.

EJEMPLO 11: Ensayo de citólisis de células tumorales in Vitro

[0390] Se pueden obtener células de mamífero que expresan el polipéptido TAHO de interés utilizando el vector de expresión estándar y técnicas de clonación. Alternativamente, muchas líneas celulares tumorales que expresan polipéptidos TAHO de interés están públicamente disponibles, por ejemplo, a través de la ATCC y se pueden identificar de manera rutinaria utilizando un análisis ELISA o FACS estándar. A continuación, los anticuerpos monoclonales anti-polipéptido TAHO (disponibles comercialmente y derivados conjugados a toxina de los mismos) se pueden emplear en ensayos para determinar la capacidad del anticuerpo para matar las células in vitro que expresan el polipéptido TAHO.

[0391] Por ejemplo, las células que expresan el polipéptido TAHO de interés se obtienen tal como se ha descrito anteriormente y se emplacan en placas de 96 pocillos. En un análisis, el conjugado anticuerpo/toxina (o anticuerpo desnudo) se incluye en la incubación celular durante un periodo de 4 días. En un segundo análisis independiente, las células se incuban durante 1 hora con el conjugado anticuerpo/toxina (o anticuerpo desnudo) y, a continuación, se lavaron e incubaron en ausencia del conjugado anticuerpo/toxina durante un periodo de 4 días. A continuación se mide la viabilidad celular utilizando el Ensayo de viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo de Promega (Cat# G7571). Las células no tratadas sirven como control negativo.

[0392] Las líneas de células B (ARH-77, BJAB, Daudi, DOHH-2, Su-DHL-4, Raji y Ramos) se prepararon a 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos de base plana estériles separadas y tratadas con cultivo de tejido (Cellstar 650185). Las células se introdujeron en un medio de ensayo (RPMI 1460, 1% L-Glutamina, 10% de suero fetal bovino (FBS; de Hyclone) y 10 mM HEPES). Las células se colocaron inmediatamente en un incubador a 37°C durante toda la noche. Se diluyeron conjugados de fármacos de anticuerpos (utilizando anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD79A, anti-CD79B disponibles comercialmente) a 2 x 10 μg/ml en medio de ensayo. Los conjugados se unieron con reticuladores SMCC o enlazador disulfuro SPP a la toxina DM1. Además, los conjugados se pueden unir con Vc-PAB a la toxina MMAE. Los conjugados basados en herceptina (SMCC-DM1 o SPP-DM1) se utilizaron como controles negativos. Se utilizó L-DM1 libre equivalente a la dosis de carga de conjugado como control positivo. Las muestras se centrifugaron para asegurar una mezcla homogénea antes de la dilución. Los conjugados de fármacos de anticuerpos se diluyeron adicionalmente en serie 1:3. Las líneas celulares se cargaron con 50 μl de cada muestra por fila utilizando un sistema de automatización Rapidplate® 96/384 Zymark. Cuando se cargó la placa completa, las placas se reincubaron durante 3 días para permitir que las toxinas tuvieran efecto. Las reacciones se detuvieron mediante la aplicación de 100 μl/pocillo de Cell Glo (Promega, Cat. #G7571/2/3) a todos los pocillos durante 10 minutos. Los 100 μl del pocillo inactivado se transfirieron a placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido blanco, base clara (Costar 3610) y se leyó la luminiscencia y se registró como unidades de luz relativa (RLU). Los anticuerpos TAHO para este experimento incluían anticuerpos disponibles comercialmente, incluyendo anti-TAHO26/CD22 (Leinco REB-4).

Resumen

[0393] (1) Anticuerpo anti-TAH026/CD22 conjugado a toxina DM1 (CD22-SPP-DM1 y CD22-SMCC-DM1) mostró una citólisis de células tumorales significativa cuando se comparó con anticuerpo anti-TAHO26/CD22 solo o anti-HER2 conjugado a toxina DM1 de control negativo (anti-HER2-SMCC-DM1) en células RAJI o RAMOS. Además, se observó una mayor citólisis de células tumorales con CD22-SPP-DM1 en comparación con CD22-SMCC-DM1.

[0394] Los anticuerpo monoclonales anti-polipéptido TAHO son útiles para reducir el crecimiento tumoral in vitro de tumores, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

EJEMPLO 13: Immunohistoquímica

[**0395**] Para determinar la expresión en tejido de polipéptido TAHO y para confirmar los resultados de microarray del ejemplo 1, se examinó la detección inmunohistoquímica de la expresión del polipéptido TAHO en tejidos linfoides congelados bruscamente y fijados en formalina e insertados en parafina (FFPE), incluyendo amígdalas palatina, bazo, nódulo linfático y parches de Peyer del Banco de Tejidos Humanos de Genentech.

[0396] La prevalencia de la expresión de TAHO diana se evaluó en microarrays de tejido de linfoma FFPE (Cybrdi) y un panel de 24 muestras de linfoma humano congelado. Las muestras de tejido se congelaron a 5 μm, se secaron al aire y se fijaron en acetona durante 5 minutos antes de la inmunotinción. Los tejidos insertados en parafina se seccionaron a 5 μm y se montaron en portamuestras de microscopio SuperFrost Plus (VWR).

[**0397**] Para las secciones congeladas, se colocaron los portamuestras en TBST, 1% BSA y 10% de suero de caballo normal que contenía azida sódica al 0,05% durante 30 minutos, a continuación se incubaron con reactivos de un kit de bloqueo Avidina/Biotina (Vector) antes de la adición de anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios monoclonales de ratón (disponibles comercialmente) se detectaron con IgG antiratón de caballo biotinilado (Vector), seguido de la incubación en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Elite, Vector) y tetrahidrocloruro de diaminobencidina potenciado con metal (DAB, Pierce). Las secciones de control se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón irrelevante coincidente de isotipo (Pharmingen) a una concentración equivalente. Tras la aplicación del reactivo ABC-HRP, las secciones se incubaron con biotinil-tiramida (Perkin Elmer) en diluyente de amplificación durante 5-10 minutos, se lavaron y se incubaron de nuevo con reactivo ABC-HRP. La detección se realizó utilizando DAB tal como se ha descrito anteriormente.

[0398] Las secciones de tejido humano FFPE se desceraron en agua destilada, se trataron con solución de extracción diana (Dako) en un baño se agua hirviendo durante 20 minutos, seguido de un periodo de enfriamiento de 20 minutos. La actividad de peroxidada endógena residual se bloqueó utilizando 1X una solución de bloqueo (KPL) durante 4 minutos. Las secciones se incubaron con reactivos de bloqueo avidina/biotina y tampón de bloqueo que contenía suero de caballo normal al 10% antes de la adición de los anticuerpos monoclonales diluidos hasta 0,5-5,0 μg/ml en tampón de bloqueo. A continuación, las secciones se incubaron secuencialmente con anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado, seguido de ABC-HRP y detección cromogénica con DAB. Se utilizó la amplificación de la señal de tiramida, descrita anteriormente, para aumentar la sensibilidad de tinción para un conjunto de TAHO dianas (CD21, CD22, HLA-DOB).

Resumen

[0399]
(1) TAHO26 (CD22) mostró un marcaje intenso de las células B de la zona del manto y un marcaje más débil, pero significativo, de los centros germinales detectado con un clon de anticuerpo primario RFB-4 (Leinco) en tejido de amígdala humana congelada y el clon 22C04 (Neomarkers) en tejido de amígdala humano FFPE (datos no mostrados).

[0400] Por consiguiente, en vista del patrón de expresión de TAHO26 evaluado mediante inmunohistoquímica en muestras de amígdala, un órgano linfoide donde se desarrollan células B, la moléculas es una diana excelente para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

EJEMPLO 14: Citometría de flujo

[0401] Para determinar la expresión de moléculas TAHO, se realizó un análisis FACS utilizando una variedad de células, incluyendo células normales y células enfermas, tales como células de leucemia linfocítica crónica (CLL)

A. Células normales: TAHO26 (CD22)

[0402] Para los subtipos de células B de amígdalas, las amígdalas frescas se trocearon en HBSS frío y se pasaron a través de un colador de células de 70 um. Las células se lavaron una vez y se contaron. Las células B CD19+ se enriquecieron utilizando el AutoMACS (Miltenyi). Brevemente, las células de amígdalas se bloquearon con IgG humana, se incubaron con microesferas anti-CD19, y se lavaron antes de la selección positiva sobre el AutoMACS. Se guardó una fracción de células B CD19+ para el análisis citométrico de flujo de células plasmáticas. Las células CD19+ restantes se tiñeron con FITC-CD77, PE-IgD, y APC-CD38 para clasificar subpoblaciones de células B. El enriquecimiento de CD19+ se analizó utilizando PE-Cy5-CD19, y la pureza variaba del 94 al 98% de CD19+. Las subpoblaciones B de amígdalas se clasificaron en el MoFlo por Michael Hamilton a la velocidad de flujo de 18.000-20000 células/segundo. Las células del manto folicular se recogieron como la fracción IgD/CD38-, las células B de memoria fueron IgD-/CD38-, los centrocitos fueron IgD-/CD38+/CD77-, y los centroblastos fueron IgD-/CD38+/CD77+. Las células se guardaron en suero al 50% durante toda la noche, o se tiñeron y fijaron con paraformaldehído al 2%. Para el análisis de células plasmáticas, se tiñeron todas las células B de amígdalas con CD138-PE, CD20-FITC, y se detectó el anticuerpo biotinilado a la diana de interés con estreptavidina-PE-Cy5. Las subpoblaciones B de amígdalas se tiñeron con anticuerpo biotinilado para la diana de interés, y se detectaron con estreptavidina-PE-Cy5. El análisis de flujo se realizó en el BD FACSCaliber, y se analizaron los datos posteriormente utilizando software FlowJo v 4.5.2 (TreeStar). Los anticuerpos conjugados con biotina que estaban disponibles comercialmente, tales como TAHO26/CD22 (RFB4 de Ancell) se utilizaron en la citometría de flujo.

Resumen de TAHO26 (CD22) en células normales

[0403] El patrón de expresión en los subtipos B de amígdalas clasificados se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido TAHO de interés. TAHO26 (CD22) (utilizando anti-CD22, RFB4 de Ancell) mostró una expresión significativa en células B de memoria, células del manto folicular, centroblastos y centrocitos (datos no mostrados).

[0404] El patrón de expresión en las células plasmáticas de amígdalas se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido TAHO de interés. TAHO26 (CD22) (utilizando anti-CD22, RFB4 de Ancell) mostró una expresión significativa en células plasmáticas (datos no mostrados).

[0405] Por consiguiente, a la vista del patrón de expresión de TAHO26 en subtipos B de amígdalas evaluados mediante FACS, la molécula es una diana excelente para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

B. Células CLL: TAHO26 (CD22)

[0406] Los siguientes mAbs purificados o conjugados a fluorocromo se utilizaron para la citometría de flujo de muestras de CLL: CD5-PE, CD 19-PerCP Cy5.5, CD20-FITC, CD20-APC (disponible comercialmente de BD Pharmingen). Además, los anticuerpos biotinilados disponibles comercialmente contra CD22 (RFB4 de Ancell) se utilizaron para la citometría de flujo. Los anticuerpos CD5, CD19 y D20 se utilizaron para canalizar células B y se realizó la tinción con PI para comprobar la viabilidad celular.

[0407] Las células (10^6 células en un volumen de 100 ml) se incubaron en primer lugar con 1 mg de cada uno de los anticuerpos CD5, CD19 y CD20 y 10 mg de cada globulina gamma de humano y ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) para bloquear la unión no específica, a continuación se incubaron con concentraciones óptimas de mAbs durante 30 minutos en la oscuridad a 4°C. Cuando se utilizaron anticuerpos

biotinilados, se añadieron a continuación estreptavidina-PE o estreptavidina-APC (Jackson ImunoResearch Laboratories) según las instrucciones de fabricación. Se realizó una citometría de flujo en un FACS calibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Se registraron las señales de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) en un modo lineal, señales de fluorescencia en modo logarítmico. Las células muertas y los residuos celulares se canalizaron utilizando las propiedades de dispersión de las células. Los datos se analizaron utilizando software CellQuest Pro (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star Inc.).

Resumen de TAHO26 (CD22) en muestras de CLL

[**0408**] El patrón de expresión en las muestras de CLL se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido TAHO de interés. TAHO26 (CD22) mostró una expresión significativa en muestras de CLL (datos no mostrados).

[**0409**] Por consiguiente, en vista del patrón de expresión de TAHO26 en muestras de leucemia linfocítica crónica (CLL) evaluadas mediante FACS, la molécula es una diana excelente para la terapia de tumores en mamíferos incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

Ejemplo 15: Internalización de TAHO

[0410] La internalización de los anticuerpos TAHO en líneas de células B se evaluaron en células Raji, Ramos, Daudi y otras células B, incluyendo líneas celulares ARH77, SuDHL4, U698M, huB y BJAB.

[0411] Se utilizó una placa de 15 cm “ready-to-split” de células B (~50 x 10^6 células) con células para su uso en hasta 20 reacciones. Las células estaban por debajo del paso 25 (menos de 8 semanas de vida) y crecieron de forma sana sin ningún micoplasma.

[0412] En un tubo Falcon de 15 ml de tapón suelto se añadieron 1 μg/ml de anticuerpo anti-TAHO de ratón a 2,5 x 10^6 células en 2 ml de medio de crecimiento normal (por ejemplo, RPMI/10% FBS/1% glutamina) que contenía 1:10 de bloqueo de FcR (kit MACS, dializado para eliminar la azida), 1% pen/strep, 5 PM pepstatina A, 10 μg/ml leupeptina (inhibidores de proteasas lisosomales) y 25 μg/ml Alexa488-transferrina (que marcaron el mecanismo de reciclaje e indicaron qué células estaban vivas; alternativamente se puede utilizar un marcador en fase fluida de dextrano Ax488 para marcar todos los mecanismos) durante 24 horas en un incubador con CO_2 al 5% a 37°C. Para los anticuerpos de internalización rápida, se tomaron puntos de tiempo cada 5 minutos. Para los puntos de tiempo tomados en menos de 1 hora, se utilizó 1 ml de medio libre de carbonato completo (Gibco 18045-088 + 10% FBS, 1 % glutamina, 1% pen/strep, 10 mM Hepes pH 7,4) y las reacciones se realizaron en baño de agua a 37°C en lugar del incubador con CO_2.

[0413] Después de completar la evolución el tiempo, las células se recogieron mediante centrifugación (1500 rpm a 4°C durante 5 minutos en G6-SR o 2500 rpm a 3 minutos en una centrífuga eppendorf tipo benchtop), se lavaron una vez en 1,5 ml de medio libre de carbonato (en Eppendorfs) o 10 ml de medio para tubos Falcon de 15 ml. Las células se sometieron a una segunda centrifugación y se resuspendieron en 0,5 ml de paraformaldehído al 3% (EMS) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la fijación de las células.

[0414] Las siguientes etapas son realizadas por un conjunto de células a través de centrifugación. Las células se lavaron en PBS y a continuación se inactivaron durante 10 minutos en 0,5 ml de NH_4Cl 50 mM (sigma) en PBS y se permeabilizaron con 0,5 ml de Triton-X-100 al 0,1% en PBS durante 4 minutos durante una rotación de centrifugación de 4 minutos. Las células se lavaron en PBS y se sometieron a centrifugación. Se añadió 1 μg/ml Cy3-anticuerpo anti ratón (o anti-especie 1·) para detectar la captación del anticuerpo en 200 μl de medio libre de carbonato completo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces en medio libre de carbonato y se resuspendieron en 25 μl de medio libre de carbonato y las células se dejaron reposar como una gota en un pocillo de un portamuestras LabtekII de 8 pocillos recubiertos de polilisina durante por lo menos una hora (o durante toda la noche en un frigorífico). Se aspiraron las células no unidas y se montaron los portamuestras con una gota por pocillo de Vectashield que contenía DAPI bajo un cubremuestras de 50x24 mm. Las células se examinaron bajo un objetivo de 100x para la internalización de los anticuerpos.

Resumen

[0415]
(3) TAHO26/CD22 (detectado utilizando anticuerpo anti-CD22 Leinco RFB4) se internalizó en 5 minutos en células Raji, en 5 minutos en células Ramos, en 5 minutos en células Daudi y en 5 minutos en células ARH77 y se liberó a los lisosomas en 1 hora. TAHO26/CD22 (detectado utilizando anticuerpos anti-CD22, DAKO To15, Diatec 157, Sigma HIB-22 o Monosan BL-BC34) se internalizó en 5 minutos en células Raji y se liberó a los lisosomas en 1 hora.

[**0416**] Por consiguiente, en vista de la internalización de TAHO26 en líneas celulares B evaluada mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-TAHO respectivos, la molécula es una diana excelente para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, linfoma No de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

Listado de secuencias

<110> Genentech, Inc.

<120> Composiciones y procedimientos para el tratamiento de tumores de origen hematopoyético

<130> RXT/FP6712392

<140> Desconocido, presentado con el mismo
<141> 2004-11-16

<150> 09004091.6

<141> 2014-11-16

<150> EP04811110.8
<151> 2004-11-16

<150> PCT/US2004/038262
<151> 2004-11-16

<150> US 60/520,842
<151> 2003-11-17

<150> US 60/532,426
<151> 2003-12-24

<160> 75

<210> 1
<211> 2037
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
agtgtgatgg atatctgcag aattcgccct tatggcgttt gacgtcagct 50

gcttcttttg ggtggtgctg ttttctgccg gctgtaaagt catcacctcc 100

tgggatcaga tgtgcattga gaaagaagcc aacaaaacat ataactgtga 150

aaatttaggt ctcagtgaaa tccctgacac tctaccaaac acaacagaat 200

ttttggaatt cagctttaat tttttgccta caattcacaa tagaaccttc 250

agcagactca tgaatcttac ctttttggat ttaactaggt gccagattaa 300

ctggatacat gaagacactt ttcaaagcca tcatcaatta agcacacttg 350

tgttaactgg aaatcccctg atattcatgg cagaaacatc gcttaatggg 400

cccaagtcac tgaagcatct tttcttaatc caaacgggaa tatccaatct 450

cgagtttatt ccagtgcaca atctggaaaa cttggaaagc ttgtatcttg 500

gaagcaacca tatttcctcc attaagttcc ccaaagactt cccagcacgg 550

aatctgaaag tactggattt tcagaataat gctatacact acatctctag 600

agaagacatg aggtctctgg agcaggccat caacctaagc ctgaacttca 650

atggcaataa tgttaaaggt attgagcttg gggcttttga ttcaacggtc 700

ttccaaagtt tgaactttgg aggaactcca aatttgtctg ttatattcaa 750

tggtctgcag aactctacta ctcagtctct ctggctggga acatttgagg 800

acattgatga cgaagatatt agttcagcca tgctcaaggg actctgtgaa 850

atgtctgttg agagcctcaa cctgcaggaa caccgcttct ctgacatctc 900

atccaccaca tttcagtgct tcacccaact ccaagaattg gatctgacag 950

caactcactt gaaagggtta ccctctggga tgaagggtct gaacttgctc 1000

aagaaattag ttctcagtgt aaatcatttc gatcaattgt gtcaaatcag 1050

tgctgccaat ttcccctccc ttacacacct ctacatcaga ggcaacgtga 1100

agaaacttca ccttggtgtt ggctgcttgg agaaactagg aaaccttcag 1150

acacttgatt taagccataa tgacatagag gcttctgact gctgcagtct 1200

gcaactcaaa aacctgtccc acttgcaaac cttaaacctg agccacaatg 1250

agcctcttgg tctccagagt caggcattca aagaatgtcc tcagctagaa 1300

ctcctcgatt tggcatttac ccgcttacac attaatgctc cacaaagtcc 1350

cttccaaaac ctccatttcc ttcaggttct gaatctcact tactgcttcc 1400

ttgataccag caatcagcat cttctagcag gcctaccagt tctccggcat 1450

ctcaacttaa aagggaatca ctttcaagat gggactatca cgaagaccaa 1500

cctacttcag accgtgggca gcttggaggt tctgattttg tcctcttgtg 1550

gtctcctctc tatagaccag caagcattcc acagcttggg aaaaatgagc 1600

catgtagact taagccacaa cagcctgaca tgcgacagca ttgattctct 1650

tagccatctt aagggaatct acctcaatct ggctgccaac agcattaaca 1700

tcatctcacc ccgtctcctc cctatcttgt cccagcagag caccattaat 1750

ttaagtcata acccccctgga ctgcacttgc tcgaatattc atttcttaac 1800

atggtacaaa gaaaacctgc acaaacttga aggctcggag gagaccacgt 1850

gtgcaaaccc gccatctcta aggggagtta agctatctga tgtcaagctt 1900

tcctgtggga ttacagccat aggcattttc tttctcatag tatttctatt 1950

attgttggct attctgctat tttttgcagt taaatacctt ctcaggtgga 2000

aataccaaca catttagtgc tgaaggtttc cagagaa 2037

<210> 2
<211> 660
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Phe Asp Val Ser Cys Phe Phe Trp Val Val Leu Phe Ser
1 5 10 15

Ala Gly Cys Lys Val Ile Thr Ser Trp Asp Gln Met Cys Ile Glu
20 25 30

```
Lys Glu Ala Asn Lys Thr Tyr Asn Cys Glu Asn Leu Gly Leu Ser
 35                  40                  45

Glu Ile Pro Asp Thr Leu Pro Asn Thr Thr Glu Phe Leu Glu Phe
 50                  55                  60

Ser Phe Asn Phe Leu Pro Thr Ile His Asn Arg Thr Phe Ser Arg
 65                  70                  75

Leu Met Asn Leu Thr Phe Leu Asp Leu Thr Arg Cys Gln Ile Asn
 80                  85                  90

Trp Ile His Glu Asp Thr Phe Gln Ser His His Gln Leu Ser Thr
 95                 100                 105

Leu Val Leu Thr Gly Asn Pro Leu Ile Phe Met Ala Glu Thr Ser
110                 115                 120

Leu Asn Gly Pro Lys Ser Leu Lys His Leu Phe Leu Ile Gln Thr
125                 130                 135

Gly Ile Ser Asn Leu Glu Phe Ile Pro Val His Asn Leu Glu Asn
140                 145                 150

Leu Glu Ser Leu Tyr Leu Gly Ser Asn His Ile Ser Ser Ile Lys
155                 160                 165

Phe Pro Lys Asp Phe Pro Ala Arg Asn Leu Lys Val Leu Asp Phe
170                 175                 180

Gln Asn Asn Ala Ile His Tyr Ile Ser Arg Glu Asp Met Arg Ser
185                 190                 195

Leu Glu Gln Ala Ile Asn Leu Ser Leu Asn Phe Asn Gly Asn Asn
200                 205                 210

Val Lys Gly Ile Glu Leu Gly Ala Phe Asp Ser Thr Val Phe Gln
215                 220                 225

Ser Leu Asn Phe Gly Gly Thr Pro Asn Leu Ser Val Ile Phe Asn
230                 235                 240

Gly Leu Gln Asn Ser Thr Thr Gln Ser Leu Trp Leu Gly Thr Phe
245                 250                 255

Glu Asp Ile Asp Asp Glu Asp Ile Ser Ser Ala Met Leu Lys Gly
260                 265                 270

Leu Cys Glu Met Ser Val Glu Ser Leu Asn Leu Gln Glu His Arg
275                 280                 285

Phe Ser Asp Ile Ser Ser Thr Thr Phe Gln Cys Phe Thr Gln Leu
290                 295                 300

Gln Glu Leu Asp Leu Thr Ala Thr His Leu Lys Gly Leu Pro Ser
305                 310                 315

Gly Met Lys Gly Leu Asn Leu Leu Lys Lys Leu Val Leu Ser Val
320                 325                 330

Asn His Phe Asp Gln Leu Cys Gln Ile Ser Ala Ala Asn Phe Pro
335                 340                 345

Ser Leu Thr His Leu Tyr Ile Arg Gly Asn Val Lys Lys Leu His
350                 355                 360

Leu Gly Val Gly Cys Leu Glu Lys Leu Gly Asn Leu Gln Thr Leu
365                 370                 375
```

Asp Leu Ser His Asn Asp Ile Glu Ala Ser Asp Cys Cys Ser Leu
380 385 390

Gln Leu Lys Asn Leu Ser His Leu Gln Thr Leu Asn Leu Ser His
395 400 405

Asn Glu Pro Leu Gly Leu Gln Ser Gln Ala Phe Lys Glu Cys Pro
410 415 420

Gln Leu Glu Leu Leu Asp Leu Ala Phe Thr Arg Leu His Ile Asn
425 430 435

Ala Pro Gln Ser Pro Phe Gln Asn Leu His Phe Leu Gln Val Leu
440 445 450

Asn Leu Thr Tyr Cys Phe Leu Asp Thr Ser Asn Gln His Leu Leu
455 460 465

Ala Gly Leu Pro Val Leu Arg His Leu Asn Leu Lys Gly Asn His
470 475 480

Phe Gln Asp Gly Thr Ile Thr Lys Thr Asn Leu Leu Gln Thr Val
485 490 495

Gly Ser Leu Glu Val Leu Ile Leu Ser Ser Cys Gly Leu Leu Ser
500 505 510

Ile Asp Gln Gln Ala Phe His Ser Leu Gly Lys Met Ser His Val
515 520 525

Asp Leu Ser His Asn Ser Leu Thr Cys Asp Ser Ile Asp Ser Leu
530 535 540

Ser His Leu Lys Gly Ile Tyr Leu Asn Leu Ala Ala Asn Ser Ile
545 550 555

Asn Ile Ile Ser Pro Arg Leu Leu Pro Ile Leu Ser Gln Gln Ser
560 565 570

Thr Ile Asn Leu Ser His Asn Pro Leu Asp Cys Thr Cys Ser Asn
575 580 585

Ile His Phe Leu Thr Trp Tyr Lys Glu Asn Leu His Lys Leu Glu
590 595 600

Gly Ser Glu Glu Thr Thr Cys Ala Asn Pro Pro Ser Leu Arg Gly
605 610 615

Val Lys Leu Ser Asp Val Lys Leu Ser Cys Gly Ile Thr Ala Ile
620 625 630

Gly Ile Phe Phe Leu Ile Val Phe Leu Leu Leu Leu Ala Ile Leu
635 640 645

Leu Phe Phe Ala Val Lys Tyr Leu Leu Arg Trp Lys Tyr Gln His
650 655 660

<210> 3
<211> 2661
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 3
cagcagtagg ccttgcctca gatccaaggt cactcggaag aggccatgtc 50

taccctcaat gacactcatg gaggaaatgc tgagagaagc attcagatgc 100

atgacacaag gtaagactgc caaaaatctt gttcttgctc tcctcatttt 150
gttatttgtt ttatttttag gagttttgag agcaaaatga caacacccag 200
aaattcagta aatgggactt tcccggcaga gccaatgaaa ggccctattg 250
ctatgcaatc tggtccaaaa ccactcttca ggaggatgtc ttcactggtg 300
ggccccacgc aaagcttctt catgagggaa tctaagactt tgggggctgt 350
ccagattatg aatgggctct tccacattgc cctgggggggt cttctgatga 400
tcccagcagg gatctatgca cccatctgtg tgactgtgtg gtaccctctc 450
tggggaggca ttatgtatat tatttccgga tcactcctgg cagcaacgga 500
gaaaaactcc aggaagtgtt tggtcaaagg aaaaatgata atgaattcat 550
tgagcctctt tgctgccatt tctggaatga ttctttcaat catggacata 600
cttaatatta aaatttccca ttttttaaaa atggagagtc tgaattttat 650
tagagctcac acaccatata ttaacatata caactgtgaa ccagctaatc 700
cctctgagaa aaactcccca tctacccaat actgttacag catacaatct 750
ctgttcttgg gcattttgtc agtgatgctg atctttgcct tcttccagga 800
acttgtaata gctggcatcg ttgagaatga atggaaaaga acgtgctcca 850
gacccaaatc taacatagtt ctcctgtcag cagaagaaaa aaaagaacag 900
actattgaaa taaaagaaga agtggttggg ctaactgaaa catcttccca 950
accaaagaat gaagaagaca ttgaaattat tccaatccaa gaagaggaag 1000
aagaagaaac agagacgaac tttccagaac ctccccaaga tcaggaatcc 1050
tcaccaatag aaaatgacag ctctccttaa gtgatttctt ctgttttctg 1100
tttccttttt taaacattag tgttcatagc ttccaagaga catgctgact 1150
ttcatttctt gaggtactct gcacatacgc accacatctc tatctggcct 1200
ttgcatggag tgaccatagc tccttctctc ttacattgaa tgtagagaat 1250
gtagccattg tagcagcttg tgttgtcacg cttcttcttt tgagcaactt 1300
tcttacactg aagaaaggca gaatgagtgc ttcagaatgt gatttcctac 1350
taacctgttc cttggatagg ctttttagta tagtattttt ttttgtcatt 1400
ttctccatca acaaccaggg agactgcacc tgatggaaaa gatatatgac 1450
tgcttcatga cattcctaaa ctatcttttt tttattccac atctacgttt 1500
ttggtggagt ccctttttgca tcattgtttt aaggatgata aaaaaaaata 1550
acaactaggg acaatacaga acccattcca tttatctttc tacagggctg 1600
acattgtggc acattcttag agttaccaca ccccatgagg gaagctctaa 1650
atagccaaca cccatctgtt ttttgtaaaa acagcatagc ttatacatgg 1700
acatgtctct gccttaactt ttcctaactc ccactctagg ctattgtttg 1750
catgtctacc tacttttagc cattatgcga gaaaagaaaa aaatgaccat 1800

agaaaatgcc accatgaggt gcccaaattt caaataataa ttaacattta 1850

gttatattta taatttccag atgacaaagt atttcatcaa ataacttcat 1900

ttgatgttcc atgatcaaga aagaatccct atctctattt tacaagtaat 1950

tcaaagaggc caaataactt gtaaacaaga aaaggtaact tgtcaacagt 2000

cataactagt aattatgaga gccttgtttc ataaccaggt cttcttactc 2050

aaatcctgtg atgtttgaaa taaccaaatt gtctctccaa tgtctgcata 2100

aactgtgaga gccaagtcaa cagcttttat caagaattta ctctctgacc 2150

agcaataaac aagcactgag agacacagag agccagattc agattttacc 2200

catggggata aaaagactca gactttcacc acatttggaa aactacttgc 2250

atcataaata tataataact ggtagtttat atgaagcaga cactaagtgc 2300

tatagacact ctcagaatat catacttgga aacaatgtaa ttaaaatgcc 2350

gaatctgagt caacagctgc cctacttttc aattcagata tactagtacc 2400

ttacctagaa ataatgttaa cctagggtga agtcactata atctgtagtc 2450

tattatttgg gcatttgcta catgatgagt gctgccagat tgtggcaggt 2500

aaagagacaa tgtaatttgc actccctatg atatttctac atttttagcg 2550

accactagtg gaagacattc cccaaaatta gaaaaaaagg agatagaaga 2600

tttctgtcta tgtaaagttc tcaaaatttg ttctaaatta ataaaactat 2650

ctttgtgttc a 2661

<210> 4
<211> 297
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu
1 5 10 15

Pro Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu
20 25 30

Phe Arg Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe
35 40 45

Met Arg Glu Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly
50 55 60

Leu Phe His Ile Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly
65 70 75

Ile Tyr Ala Pro Ile Cys Val Thr Val Trp Tyr Pro Leu Trp Gly
80 85 90

Gly Ile Met Tyr Ile Ile Ser Gly Ser Leu Leu Ala Ala Thr Glu
95 100 105

Lys Asn Ser Arg Lys Cys Leu Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn
110 115 120

Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile
125 130 135

Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser His Phe Leu Lys Met Glu
140 145 150

Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro Tyr Ile Asn Ile Tyr
155 160 165

Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn Ser Pro Ser Thr
170 175 180

Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly Ile Leu Ser
185 190 195

Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile Ala Gly
200 205 210

Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys Ser
215 220 225

Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile
230 235 240

Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln
245 250 255

Pro Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu
260 265 270

Glu Glu Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp
275 280 285

Gln Glu Ser Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
290 295

<210> 5
<211> 1846
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 5
gttggtgacc aagagtacat ctcttttcaa atagctggat taggtcctca 50

tgctgctgtg gtcattgctg gtcatctttg atgcagtcac tgaacaggca 100

gattcgctga cccttgtggc gccctcttct gtcttcgaag gagacagcat 150

cgttctgaaa tgccagggag aacagaactg gaaaattcag aagatggctt 200

accataagga taacaaagag ttatctgttt tcaaaaaatt ctcagatttc 250

cttatccaaa gtgcagtttt aagtgacagt ggtaactatt tctgtagtac 300

caaaggacaa ctctttctct gggataaaac ttcaaatata gtaaagataa 350

aagtccaaga gctctttcaa cgtcctgtgc tgactgccag ctccttccag 400

cccatcgaag ggggtccagt gagcctgaaa tgtgagaccc ggctctctcc 450

acagaggttg gatgttcaac tccagttctg cttcttcaga gaaaaccagg 500

tcctggggtc aggctggagc agctctccgg agctccagat ttctgccgtg 550

tggagtgaag acacagggtc ttactggtgc aaggcagaaa cggtgactca 600

caggatcaga aaacagagcc tccaatccca gattcacgtg cagagaatcc 650

ccatctctaa tgtaagcttg gagatccggg cccccggggg acaggtgact 700

gaaggacaaa aactgatcct gctctgctca gtggctgggg gtacaggaaa 750

tgtcacattc tcctggtaca gagaggccac aggaaccagt atgggaaaga 800

aaacccagcg ttccctgtca gcagagctgg agatcccagc tgtgaaagag 850

agtgatgccg gcaaatatta ctgtagagct gacaacggcc atgtgcctat 900

ccagagcaag gtggtgaata tccctgtgag aattccagtg tctcgccctg 950

tcctcaccct caggtctcct ggggcccagg ctgcagtggg ggacctgctg 1000

gagcttcact gtgaggccct gagaggctct cccccaatct tgtaccaatt 1050

ttatcatgag gatgtcaccc ttgggaacag ctcggccccc tctggaggag 1100

gggcctcctt caacctctct ttgactgcag aacattctgg aaactactcc 1150

tgtgaggcca acaacggcct gggggcccag tgcagtgagg cagtgccagt 1200

ctccatctca ggacctgatg gctatagaag agacctcatg acagctggag 1250

ttctctgggg actgtttggt gtccttggtt tcactggtgt tgctttgctg 1300

ttgtatgcct tgttccacaa gatatcagga gaaagttctg ccactaatga 1350

acccagaggg gcttccaggc caaatcctca agagttcacc tattcaagcc 1400

caaccccaga catggaggag ctgcagccag tgtatgtcaa tgtgggctct 1450

gtagatgtgg atgtggttta ttctcaggtc tggagcatgc agcagccaga 1500

aagctcagca aacatcagga cacttctgga gaacaaggac tcccaagtca 1550

tctactcttc tgtgaagaaa tcataacact tggaggaatc agaagggaag 1600

atcaacagca aggatggggc atcattaaga cttgctataa aaccttatga 1650

aaatgcttga ggcttatcac ctgccacagc cagaacgtgc ctcaggaggc 1700

acctcctgtc atttttgtcc tgatgatgtt tcttctccaa tatcttcttt 1750

tacctatcaa tattcattga actgctgcta catccagaca ctgtgcaaat 1800

aaattatttc tgctaccttc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa atgcag 1846

<210> 6
<211> 508
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Leu Leu Trp Ser Leu Leu Val Ile Phe Asp Ala Val Thr Glu
1 5 10 15

Gln Ala Asp Ser Leu Thr Leu Val Ala Pro Ser Ser Val Phe Glu
20 25 30

Gly Asp Ser Ile Val Leu Lys Cys Gln Gly Glu Gln Asn Trp Lys
35 40 45

Ile Gln Lys Met Ala Tyr His Lys Asp Asn Lys Glu Leu Ser Val
50 55 60

Phe Lys Lys Phe Ser Asp Phe Leu Ile Gln Ser Ala Val Leu Ser
65 70 75

Asp Ser Gly Asn Tyr Phe Cys Ser Thr Lys Gly Gln Leu Phe Leu

```
                  80                  85                  90

Trp Asp Lys Thr Ser Asn Ile Val Lys Ile Lys Val Gln Glu Leu
                  95                 100                 105

Phe Gln Arg Pro Val Leu Thr Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Glu
                 110                 115                 120

Gly Gly Pro Val Ser Leu Lys Cys Glu Thr Arg Leu Ser Pro Gln
                 125                 130                 135

Arg Leu Asp Val Gln Leu Gln Phe Cys Phe Phe Arg Glu Asn Gln
                 140                 145                 150

Val Leu Gly Ser Gly Trp Ser Ser Ser Pro Glu Leu Gln Ile Ser
                 155                 160                 165

Ala Val Trp Ser Glu Asp Thr Gly Ser Tyr Trp Cys Lys Ala Glu
                 170                 175                 180

Thr Val Thr His Arg Ile Arg Lys Gln Ser Leu Gln Ser Gln Ile
                 185                 190                 195

His Val Gln Arg Ile Pro Ile Ser Asn Val Ser Leu Glu Ile Arg
                 200                 205                 210

Ala Pro Gly Gly Gln Val Thr Glu Gly Gln Lys Leu Ile Leu Leu
                 215                 220                 225

Cys Ser Val Ala Gly Gly Thr Gly Asn Val Thr Phe Ser Trp Tyr
                 230                 235                 240

Arg Glu Ala Thr Gly Thr Ser Met Gly Lys Lys Thr Gln Arg Ser
                 245                 250                 255

Leu Ser Ala Glu Leu Glu Ile Pro Ala Val Lys Glu Ser Asp Ala
                 260                 265                 270

Gly Lys Tyr Tyr Cys Arg Ala Asp Asn Gly His Val Pro Ile Gln
                 275                 280                 285

Ser Lys Val Val Asn Ile Pro Val Arg Ile Pro Val Ser Arg Pro
                 290                 295                 300

Val Leu Thr Leu Arg Ser Pro Gly Ala Gln Ala Ala Val Gly Asp
                 305                 310                 315

Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile
                 320                 325                 330

Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser
                 335                 340                 345

Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala
                 350                 355                 360

Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu Gly
                 365                 370                 375

Ala Gln Cys Ser Glu Ala Val Pro Val Ser Ile Ser Gly Pro Asp
                 380                 385                 390

Gly Tyr Arg Arg Asp Leu Met Thr Ala Gly Val Leu Trp Gly Leu
                 395                 400                 405

Phe Gly Val Leu Gly Phe Thr Gly Val Ala Leu Leu Leu Tyr Ala
                 410                 415                 420
```

Leu Phe His Lys Ile Ser Gly Glu Ser Ser Ala Thr Asn Glu Pro
425 430 435

Arg Gly Ala Ser Arg Pro Asn Pro Gln Glu Phe Thr Tyr Ser Ser
440 445 450

Pro Thr Pro Asp Met Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr Val Asn Val
455 460 465

Gly Ser Val Asp Val Asp Val Val Tyr Ser Gln Val Trp Ser Met
470 475 480

Gln Gln Pro Glu Ser Ser Ala Asn Ile Arg Thr Leu Leu Glu Asn
485 490 495

Lys Asp Ser Gln Val Ile Tyr Ser Ser Val Lys Lys Ser
500 505

<210> 7
<211> 1107
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
tgctgcaact caaactaacc aacccactgg gagaagatgc ctgggggtcc 50

aggagtcctc caagctctgc ctgccaccat cttcctcctc ttcctgctgt 100

ctgctgtcta cctgggccct gggtgccagg ccctgtggat gcacaaggtc 150

ccagcatcat tgatggtgag cctgggggaa gacgcccact tccaatgccc 200

gcacaatagc agcaacaacg ccaacgtcac ctggtggcgc gtcctccatg 250

gcaactacac gtggcccccc gagttcttgg gcccgggcga ggaccccaat 300

ggtacgctga tcatccagaa tgtgaacaag agccatgggg gcatatacgt 350

gtgccgggtc caggagggca acgagtcata ccagcagtcc tgcggcacct 400

acctccgcgt gcgccagccg ccccccaggc ccttcctgga catgggggag 450

ggcaccaaga accgaatcat cacagccgag gggatcatcc tcctgttctg 500

cgcggtggtg cctgggacgc tgctgctgtt caggaaacga tggcagaacg 550

agaagctcgg gttggatgcc ggggatgaat atgaagatga aaacctttat 600

gaaggcctga acctggacga ctgctccatg tatgaggaca tctcccgggg 650

cctccagggc acctaccagg atgtgggcag cctcaacata ggagatgtcc 700

agctggagaa gccgtgacac ccctactcct gccaggctgc ccccgcctgc 750

tgtgcaccca gctccagtgt ctcagctcac ttccctggga cattctcctt 800

tcagcccttc tgggggcttc cttagtcata ttcccccagt ggggggtggg 850

agggtaacct cactcttctc caggccaggc ctccttggac tcccctgggg 900

gtgtcccact cttcttccct ctaaactgcc ccacctccta acctaatccc 950

cacgccccgc tgcctttccc aggctccct cacccagcgg gtaatgagcc 1000

cttaatcgct gcctctaggg gagctgattg tagcagcctc gttagtgtca 1050

ccccctcctc cctgatctgt cagggccact tagtgataat aaattcttcc 1100

caactgc 1107

<210> 8
<211> 226
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile
  1               5                  10                  15

Phe Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys
             20                  25                  30

Gln Ala Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser
             35                  40                  45

Leu Gly Glu Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn
             50                  55                  60

Asn Ala Asn Val Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr
             65                  70                  75

Trp Pro Pro Glu Phe Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr
             80                  85                  90

Leu Ile Ile Gln Asn Val Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val
             95                 100                 105

Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly
            110                 115                 120

Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp
            125                 130                 135

Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile
            140                 145                 150

Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe
            155                 160                 165

Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp
            170                 175                 180

Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn Leu Asp Asp
            185                 190                 195

Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly Thr Tyr
            200                 205                 210

Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu Lys
            215                 220                 225

Pro
```

<210> 9
<211> 1270
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9

```
caggggacag gctgcagccg gtgcagttac acgttttcct ccaaggagcc 50

tcggacgttg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100

aggctggcgt tgtctcctgt gcccagccac tggatggtgg cgttgctgct 150
```

gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccggtacc 200

ggaatcccaa aggtagtgct tgttcgcgga tctggcagag cccacgtttc 250

atagccagga aacggggctt cacggtgaaa atgcactgct acatgaacag 300

cgcctccggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350

cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaagagtc ccagaacgaa 400

tctctcgcca ccctcaccat ccaaggcatc cggtttgagg acaatggcat 450

ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctcggaggtc taccagggct 500

gcggcacaga gctgcgagtc atgggattca gcaccttggc acagctgaag 550

cagaggaaca cgctgaagga tggtatcatc atgatccaga cgctgctgat 600

catcctcttc atcatcgtgc ctatcttcct gctgctggac aaggatgaca 650

gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgagggcct ggacattgac 700

cagacagcca cctatgagga catagtgacg ctgcggacag gggaagtgaa 750

gtggtctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800

tgacctgggt gcaggctccc tggcctcagt gactgcttcg gagctgcctg 850

gctcatggcc caaccccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900

gcccaccaga gctgccattt gtctccagcc cctggtcccc agctcttgcc 950

aaagggcctg gagtagaagg acaacagggc agcaacttgg agggagttct 1000

ctggggatgg acgggaccca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050

ccccacacat gggatggggg aggcagagac tggtccagag cccgcaaatg 1100

gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccatggaccc 1150

aactgggccc cagaagagcc acaggaacat cattcctctc ccgcaaccac 1200

tcccacccca gggaggccct ggcctccagt gccttccccc gtggaataaa 1250

cggtgtgtcc tgagaaacca 1270

<210> 10
<211> 229
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Ala Arg Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val
1 5 10 15

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg
20 25 30

Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg
35 40 45

Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
50 55 60

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser
65 70 75

Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys

80 85 90

Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala
95 100 105

Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr
110 115 120

Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly
125 130 135

Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln
140 145 150

Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln
155 160 165

Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu
170 175 180

Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr
185 190 195

Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
200 205 210

Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His
215 220 225

Pro Gly Gln Glu

<210> 11
<211> 3934
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11
gccctcccag agctgccgga cgctcgcggg tctcggaacg catcccgccg 50

cgggggcttc ggccgtggca tgggcgccgc gggcctgctc ggggttttct 100

tggctctcgt cgcaccgggg gtcctcggga tttcttgtgg ctctcctccg 150

cctatcctaa atggccggat tagttattat tctaccccca ttgctgttgg 200

taccgtgata aggtacagtt gttcaggtac cttccgcctc attggagaaa 250

aaagtctatt atgcataact aaagacaaag tggatggaac ctgggataaa 300

cctgctccta aatgtgaata tttcaataaa tattcttctt gccctgagcc 350

catagtacca ggaggataca aaattagagg ctctacaccc tacagacatg 400

gtgattctgt gacatttgcc tgtaaaacca acttctccat gaacggaaac 450

aagtctgttt ggtgtcaagc aaataatatg tgggggccga cacgactacc 500

aacctgtgta agtgttttcc ctctcgagtg tccagcactt cctatgatcc 550

acaatggaca tcacacaagt gagaatgttg gctccattgc tccaggattg 600

tctgtgactt acagctgtga atctggttac ttgcttgttg gagaaaagat 650

cattaactgt ttgtcttcgg gaaaatggag tgctgtcccc cccacatgtg 700

aagaggcacg ctgtaaatct ctaggacgat ttcccaatgg gaaggtaaag 750

gagcctccaa ttctccgggt tggtgtaact gcaaactttt tctgtgatga 800

agggtatcga ctgcaaggcc caccttctag tcggtgtgta attgctggac 850

agggagttgc ttggaccaaa atgccagtat gtgaagaaat tttttgccca 900

tcacctcccc ctattctcaa tggaagacat ataggcaact cactagcaaa 950

tgtctcatat ggaagcatag tcacttacac ttgtgacccg gacccagagg 1000

aaggagtgaa cttcatcctt attggagaga gcactctccg ttgtacagtt 1050

gatagtcaga agactgggac ctggagtggc cctgccccac gctgtgaact 1100

ttctacttct gcggttcagt gtccacatcc ccagatccta agaggccgaa 1150

tggtatctgg gcagaaagat cgatatacct ataacgacac tgtgatattt 1200

gcttgcatgt ttggcttcac cttgaagggc agcaagcaaa tccgatgcaa 1250

tgcccaaggc acatgggagc catctgcacc agtctgtgaa aaggaatgcc 1300

aggcccctcc taacatcctc aatgggcaaa aggaagatag acacatggtc 1350

cgctttgacc ctggaacatc tataaaatat agctgtaacc ctggctatgt 1400

gctggtggga gaagaatcca tacagtgtac ctctgagggg gtgtggacac 1450

cccctgtacc ccaatgcaaa gtggcagcgt gtgaagctac aggaaggcaa 1500

ctcttgacaa aaccccagca ccaatttgtt agaccagatg tcaactcttc 1550

ttgtggtgaa gggtacaagt taagtgggag tgtttatcag gagtgtcaag 1600

gcacaattcc ttggtttatg gagattcgtc tttgtaaaga aatcacctgc 1650

ccaccacccc ctgttatcta caatggggca cacaccggga gttccttaga 1700

agattttcca tatggaacca cggtcactta cacatgtaac cctgggccag 1750

aaagaggagt ggaattcagc ctcattggag agagcaccat ccgttgtaca 1800

agcaatgatc aagaaagagg cacctggagt ggccctgctc ccctatgtaa 1850

actttccctc cttgctgtcc agtgctcaca tgtccatatt gcaaatggat 1900

acaagatatc tggcaaggaa gccccatatt tctacaatga cactgtgaca 1950

ttcaagtgtt atagtggatt tactttgaag ggcagtagtc agattcgttg 2000

caaagctgat aacacctggg atcctgaaat accagtttgt gaaaaagaaa 2050

catgccagca tgtgagacag agtcttcaag aacttccagc tggttcacgt 2100

gtggagctag ttaatacgtc ctgccaagat gggtaccagt tgactggaca 2150

tgcttatcag atgtgtcaag atgctgaaaa tggaatttgg ttcaaaaaga 2200

ttccactttg taaagttatt cactgtcacc ctccaccagt gattgtcaat 2250

gggaagcaca cagggatgat ggcagaaaac tttctatatg gaaatgaagt 2300

ctcttatgaa tgtgaccaag gattctatct cctgggagag aaaaaattgc 2350

agtgcagaag tgattctaaa ggacatggat cttggagcgg gccttcccca 2400

cagtgcttac gatctcctcc tgtgactcgc tgccctaatc cagaagtcaa 2450

acatgggtac aagctcaata aaacacattc tgcatattcc cacaatgaca 2500

tagtgtatgt tgactgcaat cctggcttca tcatgaatgg tagtcgcgtg 2550

attaggtgtc atactgataa cacatgggtg ccaggtgtgc caacttgtat 2600

gaaaaaagcc ttcatagggt gtccacctcc gcctaagacc cctaacggga 2650

accatactgg tggaaacata gctcgatttt ctcctggaat gtcaatcctg 2700

tacagctgtg accaaggcta cctgctggtg ggagaggcac tccttctttg 2750

cacacatgag ggaacctgga gccaacctgc ccctcattgt aaagaggtaa 2800

actgtagctc accagcagat atggatggaa tccagaaagg gctggaacca 2850

aggaaaatgt atcagtatgg agctgttgta actctggagt gtgaagatgg 2900

gtatatgctg gaaggcagtc cccagagcca gtgccaatcg gatcaccaat 2950

ggaaccctcc cctggcggtt tgcagatccc gttcacttgc tcctgtcctt 3000

tgtggtattg ctgcaggttt gatacttctt accttcttga ttgtcattac 3050

cttatacgtg atatcaaaac acagagaacg caattattat acagatacaa 3100

gccagaaaga agcttttcat ttagaagcac gagaagtata ttctgttgat 3150

ccatacaacc cagccagctg atcagaagac aaactggtgt gtgcctcatt 3200

gcttggaatt cagcggaata ttgattagaa agaaactgct ctaatatcag 3250

caagtctctt tatatggcct caagatcaat gaaatgatgt cataagcgat 3300

cacttcctat atgcacttat tctcaagaag aacatcttta tggtaaagat 3350

gggagcccag tttcactgcc atatactctt caaggacttt ctgaagcctc 3400

acttatgaga tgcctgaagc caggccatgg ctataaacaa ttacatggct 3450

ctaaaaagtt ttgccctttt taaggaaggc actaaaaaga gctgtcctgg 3500

tatctagacc catcttcttt ttgaaatcag catactcaat gttactatct 3550

gcttttggtt ataatgtgtt tttaattatc taaagtatga agcattttct 3600

ggggttatga tggccttacc tttattagga agtatggttt tattttgata 3650

gtagcttcct cctctggtgg tgttaatcat ttcattttta cccttactgt 3700

ttgagtttct ctcacattac tgtatatact ttgcctttcc ataatcactc 3750

agtgattgca atttgcacaa gttttttaa attatgggaa tcaagattta 3800

atcctagaga tttggtgtac aattcaggct ttggatgttt ctttagcagt 3850

tttgtgataa gttctagttg cttgtaaaat ttcacttaat aatgtgtaca 3900

ttagtcattc aataaattgt aattgtaaag aaaa 3934

<210> 12
<211> 1033
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Met Gly Ala Ala Gly Leu Leu Gly Val Phe Leu Ala Leu Val Ala
1 5 10 15

```
Pro Gly Val Leu Gly Ile Ser Cys Gly Ser Pro Pro Pro Ile Leu
 20                  25                  30

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

Val Ile Arg Tyr Ser Cys Ser Gly Thr Phe Arg Leu Ile Gly Glu
 50                  55                  60

Lys Ser Leu Leu Cys Ile Thr Lys Asp Lys Val Asp Gly Thr Trp
 65                  70                  75

Asp Lys Pro Ala Pro Lys Cys Glu Tyr Phe Asn Lys Tyr Ser Ser
 80                  85                  90

Cys Pro Glu Pro Ile Val Pro Gly Gly Tyr Lys Ile Arg Gly Ser
 95                 100                 105

Thr Pro Tyr Arg His Gly Asp Ser Val Thr Phe Ala Cys Lys Thr
110                 115                 120

Asn Phe Ser Met Asn Gly Asn Lys Ser Val Trp Cys Gln Ala Asn
125                 130                 135

Asn Met Trp Gly Pro Thr Arg Leu Pro Thr Cys Val Ser Val Phe
140                 145                 150

Pro Leu Glu Cys Pro Ala Leu Pro Met Ile His Asn Gly His His
155                 160                 165

Thr Ser Glu Asn Val Gly Ser Ile Ala Pro Gly Leu Ser Val Thr
170                 175                 180

Tyr Ser Cys Glu Ser Gly Tyr Leu Leu Val Gly Glu Lys Ile Ile
185                 190                 195

Asn Cys Leu Ser Ser Gly Lys Trp Ser Ala Val Pro Pro Thr Cys
200                 205                 210

Glu Glu Ala Arg Cys Lys Ser Leu Gly Arg Phe Pro Asn Gly Lys
215                 220                 225

Val Lys Glu Pro Pro Ile Leu Arg Val Gly Val Thr Ala Asn Phe
230                 235                 240

Phe Cys Asp Glu Gly Tyr Arg Leu Gln Gly Pro Pro Ser Ser Arg
245                 250                 255

Cys Val Ile Ala Gly Gln Gly Val Ala Trp Thr Lys Met Pro Val
260                 265                 270

Cys Glu Glu Ile Phe Cys Pro Ser Pro Pro Pro Ile Leu Asn Gly
275                 280                 285

Arg His Ile Gly Asn Ser Leu Ala Asn Val Ser Tyr Gly Ser Ile
290                 295                 300

Val Thr Tyr Thr Cys Asp Pro Asp Pro Glu Glu Gly Val Asn Phe
305                 310                 315

Ile Leu Ile Gly Glu Ser Thr Leu Arg Cys Thr Val Asp Ser Gln
320                 325                 330

Lys Thr Gly Thr Trp Ser Gly Pro Ala Pro Arg Cys Glu Leu Ser
335                 340                 345

Thr Ser Ala Val Gln Cys Pro His Pro Gln Ile Leu Arg Gly Arg
```

```
                  350                 355                 360

Met Val Ser Gly Gln Lys Asp Arg Tyr Thr Tyr Asn Asp Thr Val
                  365                 370                 375

Ile Phe Ala Cys Met Phe Gly Phe Thr Leu Lys Gly Ser Lys Gln
                  380                 385                 390

Ile Arg Cys Asn Ala Gln Gly Thr Trp Glu Pro Ser Ala Pro Val
                  395                 400                 405

Cys Glu Lys Glu Cys Gln Ala Pro Pro Asn Ile Leu Asn Gly Gln
                  410                 415                 420

Lys Glu Asp Arg His Met Val Arg Phe Asp Pro Gly Thr Ser Ile
                  425                 430                 435

Lys Tyr Ser Cys Asn Pro Gly Tyr Val Leu Val Gly Glu Glu Ser
                  440                 445                 450

Ile Gln Cys Thr Ser Glu Gly Val Trp Thr Pro Pro Val Pro Gln
                  455                 460                 465

Cys Lys Val Ala Ala Cys Glu Ala Thr Gly Arg Gln Leu Leu Thr
                  470                 475                 480

Lys Pro Gln His Gln Phe Val Arg Pro Asp Val Asn Ser Ser Cys
                  485                 490                 495

Gly Glu Gly Tyr Lys Leu Ser Gly Ser Val Tyr Gln Glu Cys Gln
                  500                 505                 510

Gly Thr Ile Pro Trp Phe Met Glu Ile Arg Leu Cys Lys Glu Ile
                  515                 520                 525

Thr Cys Pro Pro Pro Pro Val Ile Tyr Asn Gly Ala His Thr Gly
                  530                 535                 540

Ser Ser Leu Glu Asp Phe Pro Tyr Gly Thr Thr Val Thr Tyr Thr
                  545                 550                 555

Cys Asn Pro Gly Pro Glu Arg Gly Val Glu Phe Ser Leu Ile Gly
                  560                 565                 570

Glu Ser Thr Ile Arg Cys Thr Ser Asn Asp Gln Glu Arg Gly Thr
                  575                 580                 585

Trp Ser Gly Pro Ala Pro Leu Cys Lys Leu Ser Leu Leu Ala Val
                  590                 595                 600

Gln Cys Ser His Val His Ile Ala Asn Gly Tyr Lys Ile Ser Gly
                  605                 610                 615

Lys Glu Ala Pro Tyr Phe Tyr Asn Asp Thr Val Thr Phe Lys Cys
                  620                 625                 630

Tyr Ser Gly Phe Thr Leu Lys Gly Ser Ser Gln Ile Arg Cys Lys
                  635                 640                 645

Ala Asp Asn Thr Trp Asp Pro Glu Ile Pro Val Cys Glu Lys Glu
                  650                 655                 660

Thr Cys Gln His Val Arg Gln Ser Leu Gln Glu Leu Pro Ala Gly
                  665                 670                 675

Ser Arg Val Glu Leu Val Asn Thr Ser Cys Gln Asp Gly Tyr Gln
                  680                 685                 690
```

```
Leu Thr Gly His Ala Tyr Gln Met Cys Gln Asp Ala Glu Asn Gly
                695                 700                 705

Ile Trp Phe Lys Lys Ile Pro Leu Cys Lys Val Ile His Cys His
            710                 715                 720

Pro Pro Pro Val Ile Val Asn Gly Lys His Thr Gly Met Met Ala
        725                 730                 735

Glu Asn Phe Leu Tyr Gly Asn Glu Val Ser Tyr Glu Cys Asp Gln
    740                 745                 750

Gly Phe Tyr Leu Leu Gly Glu Lys Lys Leu Gln Cys Arg Ser Asp
755                 760                 765

Ser Lys Gly His Gly Ser Trp Ser Gly Pro Ser Pro Gln Cys Leu
            770                 775                 780

Arg Ser Pro Pro Val Thr Arg Cys Pro Asn Pro Glu Val Lys His
        785                 790                 795

Gly Tyr Lys Leu Asn Lys Thr His Ser Ala Tyr Ser His Asn Asp
    800                 805                 810

Ile Val Tyr Val Asp Cys Asn Pro Gly Phe Ile Met Asn Gly Ser
815                 820                 825

Arg Val Ile Arg Cys His Thr Asp Asn Thr Trp Val Pro Gly Val
            830                 835                 840

Pro Thr Cys Met Lys Lys Ala Phe Ile Gly Cys Pro Pro Pro Pro
        845                 850                 855

Lys Thr Pro Asn Gly Asn His Thr Gly Gly Asn Ile Ala Arg Phe
    860                 865                 870

Ser Pro Gly Met Ser Ile Leu Tyr Ser Cys Asp Gln Gly Tyr Leu
875                 880                 885

Leu Val Gly Glu Ala Leu Leu Leu Cys Thr His Glu Gly Thr Trp
            890                 895                 900

Ser Gln Pro Ala Pro His Cys Lys Glu Val Asn Cys Ser Ser Pro
        905                 910                 915

Ala Asp Met Asp Gly Ile Gln Lys Gly Leu Glu Pro Arg Lys Met
    920                 925                 930

Tyr Gln Tyr Gly Ala Val Val Thr Leu Glu Cys Glu Asp Gly Tyr
935                 940                 945

Met Leu Glu Gly Ser Pro Gln Ser Gln Cys Gln Ser Asp His Gln
            950                 955                 960

Trp Asn Pro Pro Leu Ala Val Cys Arg Ser Arg Ser Leu Ala Pro
        965                 970                 975

Val Leu Cys Gly Ile Ala Ala Gly Leu Ile Leu Leu Thr Phe Leu
    980                 985                 990

Ile Val Ile Thr Leu Tyr Val Ile Ser Lys His Arg Glu Arg Asn
995                1000                1005

Tyr Tyr Thr Asp Thr Ser Gln Lys Glu Ala Phe His Leu Glu Ala
           1010                1015                1020

Arg Glu Val Tyr Ser Val Asp Pro Tyr Asn Pro Ala Ser
       1025                1030
```

<210> 13
<211> 2978
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 13
caaacgttcc caaatcttcc cagtcggctt gcagagactc cttgctccca 50

ggagataacc agaagctgca tcttattgac agatggtcat cacattggtg 100

agctggagtc atcagattgt ggggcccgga gtgaggctga agggagtgga 150

tcagagcact gcctgagagt cacctctact ttcctgctac cgctgcctgt 200

gagctgaagg ggctgaacca tacactcctt tttctacaac cagcttgcat 250

tttttctgcc cacaatgagc ggggaatcaa tgaatttcag cgatgttttc 300

gactccagtg aagattattt tgtgtcagtc aatacttcat attactcagt 350

tgattctgag atgttactgt gctccttgca ggaggtcagg cagttctcca 400

ggctatttgt accgattgcc tactccttga tctgtgtctt tggcctcctg 450

gggaatattc tggtggtgat caccttttgct ttttataaga aggccaggtc 500

tatgacagac gtctatctct tgaacatggc cattgcagac atcctctttg 550

ttcttactct cccattctgg gcagtgagtc atgccactgg tgcgtgggtt 600

ttcagcaatg ccacgtgcaa gttgctaaaa ggcatctatg ccatcaactt 650

taactgcggg atgctgctcc tgacttgcat tagcatggac cggtacatcg 700

ccattgtaca ggcgactaag tcattccggc tccgatccag aacactaccg 750

cgcacgaaaa tcatctgcct tgttgtgtgg gggctgtcag tcatcatctc 800

cagctcaact tttgtcttca accaaaaata caacacccaa ggcagcgatg 850

tctgtgaacc caagtaccag actgtctcgg agcccatcag gtggaagctg 900

ctgatgttgg ggcttgagct actctttggt ttctttatcc ctttgatgtt 950

catgatattt tgttacacgt tcattgtcaa aaccttggtg caagctcaga 1000

attctaaaag gcacaaagcc atccgtgtaa tcatagctgt ggtgcttgtg 1050

tttctggctt gtcagattcc tcataacatg gtcctgcttg tgacggctgc 1100

aaatttgggt aaaatgaacc gatcctgcca gagcgaaaag ctaattggct 1150

atacgaaaac tgtcacagaa gtcctggctt tcctgcactg ctgcctgaac 1200

cctgtgctct acgcttttat tgggcagaag ttcagaaact actttctgaa 1250

gatcttgaag gacctgtggt gtgtgagaag gaagtacaag tcctcaggct 1300

tctcctgtgc cgggaggtac tcagaaaaca tttctcggca gaccagtgag 1350

accgcagata acgacaatgc gtcgtccttc actatgtgat agaaagctga 1400

gtctccctaa ggcatgtgtg aaacatactc atagatgtta tgcaaaaaaa 1450

agtctatggc caggtatgca tggaaaatgt gggaattaag caaaatcaag 1500

caagcctctc tcctgcggga cttaacgtgc tcatgggctg tgtgatctct 1550

tcagggtggg gtggtctctg ataggtagca ttttccagca ctttgcaagg 1600

aatgttttgt agctctaggg tatatatccg cctggcattt cacaaaacag 1650

cctttgggaa atgctgaatt aaagtgaatt gttgacaaat gtaaacattt 1700

tcagaaatat tcatgaagcg gtcacagatc acagtgtctt ttggttacag 1750

cacaaaatga tggcagtggt ttgaaaaact aaaacagaaa aaaaaatgga 1800

agccaacaca tcactcattt taggcaaatg tttaaacatt tttatctatc 1850

agaatgttta ttgttgctgg ttataagcag caggattggc cggctagtgt 1900

ttcctctcat ttccctttga tacagtcaac aagcctgacc ctgtaaaatg 1950

gaggtggaaa gacaagctca agtgttcaca acctggaagt gcttcgggaa 2000

gaaggggaca atggcagaac aggtgttggt gacaattgtc accaattgga 2050

taaagcagct caggttgtag tgggccatta ggaaactgtc ggtttgcttt 2100

gatttccctg ggagctgttc tctgtcgtga gtgtctcttg tctaaacgtc 2150

cattaagctg agagtgctat gaagacagga tctagaataa tcttgctcac 2200

agctgtgctc tgagtgccta gcggagttcc agcaaacaaa atggactcaa 2250

gagagatttg attaatgaat cgtaatgaag ttggggttta ttgtacagtt 2300

taaaatgtta gatgttttta atttttaaa taaatggaat actttttttt 2350

tttttaaaga aagcaacttt actgagacaa tgtagaaaga agttttgttc 2400

cgtttcttta atgtggttga agagcaatgt gtggctgaag acttttgtta 2450

tgaggagctg cagattagct aggggacagc tggaattatg ctggcttctg 2500

ataattattt taaaggggtc tgaaatttgt gatggaatca gattttaaca 2550

gctctcttca atgacataga aagttcatgg aactcatgtt tttaaagggc 2600

tatgtaaata tatgaacatt agaaaaatag caacttgtgt tacaaaaata 2650

caaacacatg ttaggaaggt actgtcatgg gctaggcatg gtggctcaca 2700

cctgtaatcc cagcattttg ggaagctaag atgggtggat cacttgaggt 2750

caggagtttg agaccagcct ggccaacatg gcgaaacccc tctctactaa 2800

aaatacaaaa atttgccagg cgtggtggcg ggtgcctgta atcccagcta 2850

cttgggaggc tgaggcaaga gaatcgcttg aacccaggag gcagaggttg 2900

cagtgagccg agatcgtgcc attgcactcc agcctgggtg acagagcgag 2950

actccatctc aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2978

<210> 14
<211> 374
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Met Ser Gly Glu Ser Met Asn Phe Ser Asp Val Phe Asp Ser Ser
1 5 10 15

```
Glu Asp Tyr Phe Val Ser Val Asn Thr Ser Tyr Tyr Ser Val Asp
 20                  25                  30

Ser Glu Met Leu Leu Cys Ser Leu Gln Glu Val Arg Gln Phe Ser
 35                  40                  45

Arg Leu Phe Val Pro Ile Ala Tyr Ser Leu Ile Cys Val Phe Gly
 50                  55                  60

Leu Leu Gly Asn Ile Leu Val Val Ile Thr Phe Ala Phe Tyr Lys
 65                  70                  75

Lys Ala Arg Ser Met Thr Asp Val Tyr Leu Leu Asn Met Ala Ile
 80                  85                  90

Ala Asp Ile Leu Phe Val Leu Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val Ser
 95                 100                 105

His Ala Thr Gly Ala Trp Val Phe Ser Asn Ala Thr Cys Lys Leu
110                 115                 120

Leu Lys Gly Ile Tyr Ala Ile Asn Phe Asn Cys Gly Met Leu Leu
125                 130                 135

Leu Thr Cys Ile Ser Met Asp Arg Tyr Ile Ala Ile Val Gln Ala
140                 145                 150

Thr Lys Ser Phe Arg Leu Arg Ser Arg Thr Leu Pro Arg Thr Lys
155                 160                 165

Ile Ile Cys Leu Val Val Trp Gly Leu Ser Val Ile Ile Ser Ser
170                 175                 180

Ser Thr Phe Val Phe Asn Gln Lys Tyr Asn Thr Gln Gly Ser Asp
185                 190                 195

Val Cys Glu Pro Lys Tyr Gln Thr Val Ser Glu Pro Ile Arg Trp
200                 205                 210

Lys Leu Leu Met Leu Gly Leu Glu Leu Leu Phe Gly Phe Phe Ile
215                 220                 225

Pro Leu Met Phe Met Ile Phe Cys Tyr Thr Phe Ile Val Lys Thr
230                 235                 240

Leu Val Gln Ala Gln Asn Ser Lys Arg His Lys Ala Ile Arg Val
245                 250                 255

Ile Ile Ala Val Val Leu Val Phe Leu Ala Cys Gln Ile Pro His
260                 265                 270

Asn Met Val Leu Leu Val Thr Ala Ala Asn Leu Gly Lys Met Asn
275                 280                 285

Arg Ser Cys Gln Ser Glu Lys Leu Ile Gly Tyr Thr Lys Thr Val
290                 295                 300

Thr Glu Val Leu Ala Phe Leu His Cys Cys Leu Asn Pro Val Leu
305                 310                 315

Tyr Ala Phe Ile Gly Gln Lys Phe Arg Asn Tyr Phe Leu Lys Ile
320                 325                 330

Leu Lys Asp Leu Trp Cys Val Arg Arg Lys Tyr Lys Ser Ser Gly
335                 340                 345

Phe Ser Cys Ala Gly Arg Tyr Ser Glu Asn Ile Ser Arg Gln Thr
350                 355                 360
```

Ser Glu Thr Ala Asp Asn Asp Asn Ala Ser Ser Phe Thr Met
365 370

<210> 15
<211> 1531
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 15
agtcacagag ggaacacaga gcctagttgt aaacggacag agacgagagg 50

ggcaagggag gacagtggat gacagggaag acgagtgggg gcagagctgc 100

tcaggaccat ggctgaggcc atcacctatg cagatctgag gtttgtgaag 150

gctcccctga agaagagcat ctccagccgg ttaggacagg acccaggggc 200

tgatgatgat ggggaaatca cctacgagaa tgttcaagtg cccgcagtcc 250

taggggtgcc ctcaagcttg gcttcttctg tactagggga caaagcagcg 300

gtcaagtcgg agcagccaac tgcgtcctgg agagccgtga cgtcaccagc 350

tgtcgggcgg attctcccct gccgcacaac ctgcctgcga tacctcctgc 400

tcggcctgct cctcacctgc ctgctgttag gagtgaccgc catctgcctg 450

ggagtgcgct atctgcaggt gtctcagcag ctccagcaga cgaacagggt 500

tctggaagtc actaacagca gcctgaggca gcagctccgc ctcaagataa 550

cgcagctggg acagagtgca gaggatctgc aggggtccag gagagagctg 600

gcgcagagtc aggaagcact acaggtggaa cagagggctc atcaggcggc 650

cgaagggcag ctacaggcct gccaggcaga cagacagaag acgaaggaga 700

ccttgcaaag tgaggagcaa cagaggaggg ccttggagca gaagctgagc 750

aacatggaga acagactgaa gcccttcttc acatgcggct cagcagacac 800

ctgctgtccg tcgggatgga taatgcatca gaaaagctgc ttttacatct 850

cacttacttc aaaaaattgg caggagagcc aaaaacaatg tgaaactctg 900

tcttccaagc tggccacatt cagtgaaatt tatccacaat cacactctta 950

ctacttctta aattcactgt tgccaaatgg tggttcaggg aattcatatt 1000

ggactggcct cagctctaac aaggattgga agttgactga tgatacacaa 1050

cgcactagga cttatgctca aagctcaaaa tgtaacaagg tacataaaac 1100

ttggtcatgg tggacactgg agtcagagtc atgtagaagt tctcttccct 1150

acatctgtga gatgacagct ttcaggtttc cagattagga cagtcctttg 1200

cactgagttg acactcatgc caacaagaac ctgtgcccct ccttcctaac 1250

ctgaggcctg gggttcctca gaccatctcc ttcattctgg gcagtgccag 1300

ccaccggctg acccacacct gacacttcca gccagtctgc tgcctgctcc 1350

ctcttcctga aactggactg ttcctgggaa aagggtgaag ccacctctag 1400

aagggacttt ggcctccccc caagaacttc ccatggtaga atggggtggg 1450

ggaggagggc gcacgggctg agcggatagg ggcggcccgg agccagccag 1500

gcagttttat tgaaatcttt ttaaataatt g 1531

<210> 16
<211> 359
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

```
Met Ala Glu Ala Ile Thr Tyr Ala Asp Leu Arg Phe Val Lys Ala
  1               5                  10                  15

Pro Leu Lys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Leu Gly Gln Asp Pro Gly
             20                  25                  30

Ala Asp Asp Asp Gly Glu Ile Thr Tyr Glu Asn Val Gln Val Pro
             35                  40                  45

Ala Val Leu Gly Val Pro Ser Ser Leu Ala Ser Ser Val Leu Gly
             50                  55                  60

Asp Lys Ala Ala Val Lys Ser Glu Gln Pro Thr Ala Ser Trp Arg
             65                  70                  75

Ala Val Thr Ser Pro Ala Val Gly Arg Ile Leu Pro Cys Arg Thr
             80                  85                  90

Thr Cys Leu Arg Tyr Leu Leu Leu Gly Leu Leu Leu Thr Cys Leu
             95                 100                 105

Leu Leu Gly Val Thr Ala Ile Cys Leu Gly Val Arg Tyr Leu Gln
            110                 115                 120

Val Ser Gln Gln Leu Gln Gln Thr Asn Arg Val Leu Glu Val Thr
            125                 130                 135

Asn Ser Ser Leu Arg Gln Gln Leu Arg Leu Lys Ile Thr Gln Leu
            140                 145                 150

Gly Gln Ser Ala Glu Asp Leu Gln Gly Ser Arg Arg Glu Leu Ala
            155                 160                 165

Gln Ser Gln Glu Ala Leu Gln Val Glu Gln Arg Ala His Gln Ala
            170                 175                 180

Ala Glu Gly Gln Leu Gln Ala Cys Gln Ala Asp Arg Gln Lys Thr
            185                 190                 195

Lys Glu Thr Leu Gln Ser Glu Glu Gln Gln Arg Arg Ala Leu Glu
            200                 205                 210

Gln Lys Leu Ser Asn Met Glu Asn Arg Leu Lys Pro Phe Phe Thr
            215                 220                 225

Cys Gly Ser Ala Asp Thr Cys Cys Pro Ser Gly Trp Ile Met His
            230                 235                 240

Gln Lys Ser Cys Phe Tyr Ile Ser Leu Thr Ser Lys Asn Trp Gln
            245                 250                 255

Glu Ser Gln Lys Gln Cys Glu Thr Leu Ser Ser Lys Leu Ala Thr
            260                 265                 270

Phe Ser Glu Ile Tyr Pro Gln Ser His Ser Tyr Tyr Phe Leu Asn
            275                 280                 285

Ser Leu Leu Pro Asn Gly Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Trp Thr Gly
```

290 295 300

Leu Ser Ser Asn Lys Asp Trp Lys Leu Thr Asp Asp Thr Gln Arg
305 310 315

Thr Arg Thr Tyr Ala Gln Ser Ser Lys Cys Asn Lys Val His Lys
320 325 330

Thr Trp Ser Trp Trp Thr Leu Glu Ser Glu Ser Cys Arg Ser Ser
335 340 345

Leu Pro Tyr Ile Cys Glu Met Thr Ala Phe Arg Phe Pro Asp
350 355

<210> 17
<211> 1978
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 17
ggcacgaggg tccgcaagcc cggctgagag cgcgccatgg ggcaggcggg 50

ctgcaagggg ctctgcctgt cgctgttcga ctacaagacc gagaagtatg 100

tcatcgccaa gaacaagaag gtgggcctgc tgtaccggct gctgcaggcc 150

tccatcctgg cgtacctggt cgtatgggtg ttcctgataa agaagggtta 200

ccaagacgtc gacacctccc tgcagagtgc tgtcatcacc aaagtcaagg 250

gcgtggcctt caccaacacc tcggatcttg ggcagcggat ctgggatgtc 300

gccgactacg tcattccagc ccagggagag aacgtctttt ttgtggtcac 350

caacctgatt gtgaccccca accagcggca gaacgtctgt gctgagaatg 400

aaggcattcc tgatggcgcg tgctccaagg acagcgactg ccacgctggg 450

gaagcggtta cagctggaaa cggagtgaag accggccgct gcctgcggag 500

agggaacttg gccaggggca cctgtgagat ctttgcctgg tgcccgttgg 550

agacaagctc caggccggag gagccattcc tgaaggaggc cgaagacttc 600

accattttca taaagaacca catccgtttc cccaaattca acttctccaa 650

aaacaatgtg atggacgtca aggacagatc tttcctgaaa tcatgccact 700

ttggccccaa gaaccactac tgccccatct tccgactggg ctccatcgtc 750

cgctgggccg ggagcgactt ccaggatata gccctgcgag gtggcgtgat 800

aggaattaat attgaatgga actgtgatct tgataaagct gcctctgagt 850

gccaccctca ctattctttt agccgtctgg acaataaact ttcaaagtct 900

gtctcctccg ggtacaactt cagatttgcc agatattacc gagacgcagc 950

cggggtggag ttccgcaccc tgatgaaagc ctacgggatc cgctttgacg 1000

tgatggtgaa cggcaagggt gctttcttct gcgacctggt actcatctac 1050

ctcatcaaaa agagagagtt ttaccgtgac aagaagtacg aggaagtgag 1100

gggcctagaa gacagttccc aggaggccga ggacgaggca tcggggctgg 1150

ggctatctga gcagctcaca tctgggccag ggctgctggg gatgccggag 1200

cagcaggagc tgcaggagcc acccgaggcg aagcgtggaa gcagcagtca 1250

gaaggggaac ggatctgtgt gcccacagct cctggagccc cacaggagca 1300

cgtgaattgc ctctgcttac gttcaggccc tgtcctaaac ccagccgtct 1350

agcacccagt gatcccatgc ctttgggaat cccaggatgc tgcccaacgg 1400

gaaatttgta cattgggtgc tatcaatgcc acatcacagg gaccagccat 1450

cacagagcaa agtgacctcc acgtctgatg ctggggtcat caggacggac 1500

ccatcatggc tgtctttttg ccccaccccc tgccgtcagt tcttcctttc 1550

tccgtggctg gcttcccgca ctagggaacg ggttgtaaat ggggaacatg 1600

acttccttcc ggagtccttg agcacctcag ctaaggaccg cagtgccctg 1650

tagagttcct agattacctc actgggaata gcattgtgcg tgtccggaaa 1700

agggctccat ttggttccag cccactcccc tctgcaagtg ccacagcttc 1750

cctcagagca tactctccag tggatccaag tactctctct cctaaagaca 1800

ccaccttcct gccagctgtt tgcccttagg ccagtacaca gaattaaagt 1850

gggggagatg gcagacgctt tctgggacct gcccaagata tgtattctct 1900

gacactctta tttggtcata aaacaataaa tggtgtcaat ttcaaaaaaa 1950

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1978

<210> 18
<211> 422
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Arg Cys Leu Arg Arg Gly Asn Leu Ala Arg Gly Thr Cys Glu Ile
155 160 165

Phe Ala Trp Cys Pro Leu Glu Thr Ser Ser Arg Pro Glu Glu Pro
170 175 180

Phe Leu Lys Glu Ala Glu Asp Phe Thr Ile Phe Ile Lys Asn His
185 190 195

Ile Arg Phe Pro Lys Phe Asn Phe Ser Lys Asn Asn Val Met Asp
200 205 210

Val Lys Asp Arg Ser Phe Leu Lys Ser Cys His Phe Gly Pro Lys
215 220 225

Asn His Tyr Cys Pro Ile Phe Arg Leu Gly Ser Ile Val Arg Trp
230 235 240

Ala Gly Ser Asp Phe Gln Asp Ile Ala Leu Arg Gly Gly Val Ile
245 250 255

Gly Ile Asn Ile Glu Trp Asn Cys Asp Leu Asp Lys Ala Ala Ser
260 265 270

Glu Cys His Pro His Tyr Ser Phe Ser Arg Leu Asp Asn Lys Leu
275 280 285

Ser Lys Ser Val Ser Ser Gly Tyr Asn Phe Arg Phe Ala Arg Tyr
290 295 300

Tyr Arg Asp Ala Ala Gly Val Glu Phe Arg Thr Leu Met Lys Ala
305 310 315

Tyr Gly Ile Arg Phe Asp Val Met Val Asn Gly Lys Gly Ala Phe
320 325 330

Phe Cys Asp Leu Val Leu Ile Tyr Leu Ile Lys Lys Arg Glu Phe
335 340 345

Tyr Arg Asp Lys Lys Tyr Glu Glu Val Arg Gly Leu Glu Asp Ser
350 355 360

Ser Gln Glu Ala Glu Asp Glu Ala Ser Gly Leu Gly Leu Ser Glu
365 370 375

Gln Leu Thr Ser Gly Pro Gly Leu Leu Gly Met Pro Glu Gln Gln
380 385 390

Glu Leu Gln Glu Pro Pro Glu Ala Lys Arg Gly Ser Ser Ser Gln
395 400 405

Lys Gly Asn Gly Ser Val Cys Pro Gln Leu Leu Glu Pro His Arg
410 415 420

Ser Thr

<210> 19
<211> 1322
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 19
aactcattct gaagaggctg acgatttac tgtctcattt ttttcctttc 50

tccagaatgg gttctgggtg ggtcccctgg gtggtggctc tgctagtgaa 100

tctgacccga ctggattcct ccatgactca aggcacagac tctccagaag 150

attttgtgat tcaggcaaag gctgactgtt acttcaccaa cgggacagaa 200

aaggtgcagt ttgtggtcag attcatcttt aacttggagg agtatgtacg 250

tttcgacagt gatgtgggga tgtttgtggc attgaccaag ctggggcagc 300

cagatgctga gcagtggaac agccggctgg atctcttgga gaggagcaga 350

caggccgtgg atggggtctg tagacacaac tacaggctgg gcgcaccctt 400

cactgtgggg agaaaagtgc aaccagaggt gacagtgtac ccagagagga 450

ccccactcct gcaccagcat aatctgctgc actgctctgt gacaggcttc 500

tatccagggg atatcaagat caagtggttc ctgaatgggc aggaggagag 550

agctggggtc atgtccactg gccctatcag gaatggagac tggacctttc 600

agactgtggt gatgctagaa atgactcctg aacttggaca tgtctacacc 650

tgccttgtcg atcactccag cctgctgagc cctgtttctg tggagtggag 700

agctcagtct gaatattctt ggagaaagat gctgagtggc attgcagcct 750

tcctacttgg gctaatcttc cttctggtgg gaatcgtcat ccagctaagg 800

gctcagaaag gatatgtgag gacgcagatg tctggtaatg aggtctcaag 850

agctgttctg ctccctcagt catgctaagg tcctcactaa gcttgctctc 900

tctggagcct gaagtagtga tgagtagtct gggccctggg tgaggtaaag 950

gacattcatg aggtcaatgt tctgggaata actctcttcc ctgatccttg 1000

gaggagcccg aactgattct ggagctctgt gttctgagat catgcatctc 1050

ccacccatct gcccttctcc cttctacgtg tacatcatta atccccattg 1100

ccaagggcat tgtccagaaa ctcccctgag accttactcc ttccagcccc 1150

aaatcattta cttttctgtg gtccagccct actcctataa gtcatgatct 1200

ccaaagcttt ctgtcttcca actgcagtct ccacagtctt cagaagacaa 1250

atgctcaggt agtcactgtt tccttttcac tgtttttaaa aacctttat 1300

tgtcaaataa aatggagata ca 1322

<210> 20
<211> 273
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Met Gly Ser Gly Trp Val Pro Trp Val Val Ala Leu Leu Val Asn
1 5 10 15

Leu Thr Arg Leu Asp Ser Ser Met Thr Gln Gly Thr Asp Ser Pro
20 25 30

Glu Asp Phe Val Ile Gln Ala Lys Ala Asp Cys Tyr Phe Thr Asn
35 40 45

Gly Thr Glu Lys Val Gln Phe Val Val Arg Phe Ile Phe Asn Leu
50 55 60

Glu Glu Tyr Val Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Met Phe Val Ala

65 70 75

Leu Thr Lys Leu Gly Gln Pro Asp Ala Glu Gln Trp Asn Ser Arg
80 85 90

Leu Asp Leu Leu Glu Arg Ser Arg Gln Ala Val Asp Gly Val Cys
95 100 105

Arg His Asn Tyr Arg Leu Gly Ala Pro Phe Thr Val Gly Arg Lys
110 115 120

Val Gln Pro Glu Val Thr Val Tyr Pro Glu Arg Thr Pro Leu Leu
125 130 135

His Gln His Asn Leu Leu His Cys Ser Val Thr Gly Phe Tyr Pro
140 145 150

Gly Asp Ile Lys Ile Lys Trp Phe Leu Asn Gly Gln Glu Glu Arg
155 160 165

Ala Gly Val Met Ser Thr Gly Pro Ile Arg Asn Gly Asp Trp Thr
170 175 180

Phe Gln Thr Val Val Met Leu Glu Met Thr Pro Glu Leu Gly His
185 190 195

Val Tyr Thr Cys Leu Val Asp His Ser Ser Leu Leu Ser Pro Val
200 205 210

Ser Val Glu Trp Arg Ala Gln Ser Glu Tyr Ser Trp Arg Lys Met
215 220 225

Leu Ser Gly Ile Ala Ala Phe Leu Leu Gly Leu Ile Phe Leu Leu
230 235 240

Val Gly Ile Val Ile Gln Leu Arg Ala Gln Lys Gly Tyr Val Arg
245 250 255

Thr Gln Met Ser Gly Asn Glu Val Ser Arg Ala Val Leu Leu Pro
260 265 270

Gln Ser Cys

<210> 21
<211> 2818
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 21
gctgccacct ctctagaggc acctggcggg gagcctctca acataagaca 50

gtgaccagtc tggtgactca cagccggcac agccatgaac tacccgctaa 100

cgctggaaat ggacctcgag aacctggagg acctgttctg ggaactggac 150

agattggaca actataacga cacctccctg gtggaaaatc atctctgccc 200

tgccacagag ggtcccctca tggcctcctt caaggccgtg ttcgtgcccg 250

tggcctacag cctcatcttc ctcctgggcg tgatcggcaa cgtcctggtg 300

ctggtgatcc tggagcggca ccggcagaca cgcagttcca cggagacctt 350

cctgttccac ctggccgtgg ccgacctcct gctggtcttc atcttgccct 400

ttgccgtggc cgagggctct gtgggctggg tcctggggac cttcctctgc 450

aaaactgtga ttgccctgca caaagtcaac ttctactgca gcagcctgct 500

cctggcctgc atcgccgtgg accgctacct ggccattgtc cacgccgtcc 550

atgcctaccg ccaccgccgc ctcctctcca tccacatcac ctgtgggacc 600

atctggctgg tgggcttcct ccttgccttg ccagagattc tcttcgccaa 650

agtcagccaa ggccatcaca acaactccct gccacgttgc accttctccc 700

aagagaacca agcagaaacg catgcctggt tcacctcccg attcctctac 750

catgtggcgg gattcctgct gcccatgctg gtgatgggct ggtgctacgt 800

gggggtagtg cacaggttgc gccaggccca gcggcgccct cagcggcaga 850

aggcagtcag ggtggccatc ctggtgacaa gcatcttctt cctctgctgg 900

tcaccctacc acatcgtcat cttcctggac accctggcga ggctgaaggc 950

cgtggacaat acctgcaagc tgaatggctc tctccccgtg gccatcacca 1000

tgtgtgagtt cctgggcctg gcccactgct gcctcaaccc catgctctac 1050

actttcgccg gcgtgaagtt ccgcagtgac ctgtcgcggc tcctgaccaa 1100

gctgggctgt accggccctg cctccctgtg ccagctcttc cctagctggc 1150

gcaggagcag tctctctgag tcagagaatg ccacctctct caccacgttc 1200

taggtcccag tgtccccttt tattgctgct tttccttggg gcaggcagtg 1250

atgctggatg ctccttccaa caggagctgg gatcctaagg gctcaccgtg 1300

gctaagagtg tcctaggagt atcctcattt ggggtagcta gaggaaccaa 1350

ccccatttct agaacatccc tgccagctct tctgccggcc ctggggctag 1400

gctggagccc agggagcgga aagcagctcg aaggcacagt gaaggctgtc 1450

cttacccatc tgcacccccc tgggctgaga gaacctcacg cacctcccat 1500

cctaatcatc caatgctcaa gaaacaactt ctacttctgc ccttgccaac 1550

ggagagcgcc tgcccctccc agaacacact ccatcagctt aggggctgct 1600

gacctccaca gcttcccctc tctcctcctg cccacctgtc aaacaaagcc 1650

agaagctgag caccagggga tgagtggagg ttaaggctga ggaaaggcca 1700

gctggcagca gagtgtggct tcggacaact cagtccctaa aaacacagac 1750

attctgccag gcccccaagc ctgcagtcat cttgaccaag caggaagctc 1800

agactggttg agttcaggta gctgcccctg gctctgaccg aaacagcgct 1850

gggtccaccc catgtcaccg gatcctgggt ggtctgcagg cagggctgac 1900

tctaggtgcc cttggaggcc agccagtgac ctgaggaagc gtgaaggccg 1950

agaagcaaga aagaaacccg acagagggaa gaaaagagct ttcttcccga 2000

accccaagga gggagatgga tcaatcaaac ccggctgtcc cctccgccca 2050

ggcgagatgg ggtgggggga gaactcctag ggtggctggg tccaggggat 2100

gggaggttgt gggcattgat ggggaaggag gctggcttgt cccctcctca 2150

ctcccttccc ataagctata gacccgagga aactcagagt cggaacggag 2200

aaaggtggac tggaaggggc ccgtgggagt catctcaacc atcccctccg 2250

ttggcatcac cttaggcagg gaagtgtaag aaacacactg aggcaggaac 2300

tcccaggccc aggaagccgt gccctgcccc cgtgaggatg tcactcagat 2350

ggaaccgcag gaagctgctc cgtgcttgtt tgctcacctg gggtgtggga 2400

ggcccgtccg gcagttctgg gtgctcccta ccacctcccc agcctttgat 2450

caggtgggga gtcagggacc cctgcccttg tcccactcaa gccaagcagc 2500

caagctcctt gggaggcccc actggggaaa taacagctgt ggctcacgtg 2550

agagtgtctt cacggcagga caacgagaaa gccctaagac gtccctttt 2600

tctctgagta tctcctcgca agctgggtaa tcgatgggga gtctgaagca 2650

gatgcaaaga ggcagaggat ggattttgaa ttttcttttt aataaaaagg 2700

cacctataaa acaggtcaat acagtacagg cagcacagag acccccggaa 2750

caagcctaaa aattgtttca aaataaaaac caagaagatg tcttcaaaaa 2800

aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2818

<210> 22
<211> 372
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Asn Tyr Pro Leu Thr Leu Glu Met Asp Leu Glu Asn Leu Glu
1 5 10 15

Asp Leu Phe Trp Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Tyr Asn Asp Thr
20 25 30

Ser Leu Val Glu Asn His Leu Cys Pro Ala Thr Glu Gly Pro Leu
35 40 45

Met Ala Ser Phe Lys Ala Val Phe Val Pro Val Ala Tyr Ser Leu
50 55 60

Ile Phe Leu Leu Gly Val Ile Gly Asn Val Leu Val Leu Val Ile
65 70 75

Leu Glu Arg His Arg Gln Thr Arg Ser Ser Thr Glu Thr Phe Leu
80 85 90

Phe His Leu Ala Val Ala Asp Leu Leu Leu Val Phe Ile Leu Pro
95 100 105

Phe Ala Val Ala Glu Gly Ser Val Gly Trp Val Leu Gly Thr Phe
110 115 120

Leu Cys Lys Thr Val Ile Ala Leu His Lys Val Asn Phe Tyr Cys
125 130 135

Ser Ser Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ala Val Asp Arg Tyr Leu Ala
140 145 150

Ile Val His Ala Val His Ala Tyr Arg His Arg Arg Leu Leu Ser
155 160 165

Ile His Ile Thr Cys Gly Thr Ile Trp Leu Val Gly Phe Leu Leu

170 175 180

Ala Leu Pro Glu Ile Leu Phe Ala Lys Val Ser Gln Gly His His
185 190 195

Asn Asn Ser Leu Pro Arg Cys Thr Phe Ser Gln Glu Asn Gln Ala
200 205 210

Glu Thr His Ala Trp Phe Thr Ser Arg Phe Leu Tyr His Val Ala
215 220 225

Gly Phe Leu Leu Pro Met Leu Val Met Gly Trp Cys Tyr Val Gly
230 235 240

Val Val His Arg Leu Arg Gln Ala Gln Arg Arg Pro Gln Arg Gln
245 250 255

Lys Ala Val Arg Val Ala Ile Leu Val Thr Ser Ile Phe Phe Leu
260 265 270

Cys Trp Ser Pro Tyr His Ile Val Ile Phe Leu Asp Thr Leu Ala
275 280 285

Arg Leu Lys Ala Val Asp Asn Thr Cys Lys Leu Asn Gly Ser Leu
290 295 300

Pro Val Ala Ile Thr Met Cys Glu Phe Leu Gly Leu Ala His Cys
305 310 315

Cys Leu Asn Pro Met Leu Tyr Thr Phe Ala Gly Val Lys Phe Arg
320 325 330

Ser Asp Leu Ser Arg Leu Leu Thr Lys Leu Gly Cys Thr Gly Pro
335 340 345

Ala Ser Leu Cys Gln Leu Phe Pro Ser Trp Arg Arg Ser Ser Leu
350 355 360

Ser Glu Ser Glu Asn Ala Thr Ser Leu Thr Thr Phe
365 370

<210> 23
<211> 1529
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 23
agtggctcta ctttcagaag aaagtgtctc tcttcctgct taaacctctg 50

tctctgacgg tccctgccaa tcgctctggt cgaccccaac acactaggag 100

gacagacaca ggctccaaac tccactaacc agagctgtga ttgtgcccgc 150

tgagtggact gcgttgtcag ggagtgagtg ctccatcatc gggagaatcc 200

aagcaggacc gccatggagg aaggtcaata ttcagagatc gaggagcttc 250

ccaggaggcg gtgttgcagg cgtgggactc agatcgtgct gctggggctg 300

gtgaccgccg ctctgtgggc tgggctgctg actctgcttc tcctgtggca 350

ctgggacacc acacagagtc taaaacagct ggaagagagg gctgcccgga 400

acgtctctca agtttccaag aacttggaaa gccaccacgg tgaccagatg 450

gcgcagaaat cccagtccac gcagatttca caggaactgg aggaacttcg 500

agctgaacag cagagattga aatctcagga cttggagctg tcctggaacc 550

tgaacgggct tcaagcagat ctgagcagct tcaagtccca ggaattgaac 600

gagaggaacg aagcttcaga tttgctggaa agactccggg aggaggtgac 650

aaagctaagg atggagttgc aggtgtccag cggctttgtg tgcaacacgt 700

gccctgaaaa gtggatcaac ttccaacgga agtgctacta cttcggcaag 750

ggcaccaagc agtgggtcca cgcccggtat gcctgtgacg acatggaagg 800

gcagctggtc agcatccaca gcccggagga gcaggacttc ctgaccaagc 850

atgccagcca caccggctcc tggattggcc ttcggaactt ggacctgaag 900

ggagagttta tctgggtgga tgggagccat gtggactaca gcaactgggc 950

tccaggggag cccaccagcc ggagccaggg cgaggactgc gtgatgatgc 1000

ggggctccgg tcgctggacc gacgccttct gcgaccgtaa gctgggcgcc 1050

tgggtgtgcg accggctggc cacatgcacg ccgccagcca gcgaaggttc 1100

cgcggagtcc atgggacctg attcaagacc agaccctgac ggccgcctgc 1150

ccacccccctc tgcccctctc cactcttgag catggataca gccaggccca 1200

gagcaagacc ctgaagaccc ccaaccacgg cctaaaagcc tctttgtggc 1250

tgaaaggtcc ctgtgacatt ttctgccacc caaacggagg cagctgacac 1300

atctcccgct cctctatggc ccctgccttc ccaggagtac accccaacag 1350

caccctctcc agatgggagt gcccccaaca gcaccctctc cagatgagag 1400

ttacacccca acagcaccct ctccagatgc agccccatct cctcagcacc 1450

ccaggacctg agtatcccca gctcagggtg gtgagtcctc ctgtccagcc 1500

tgcatcaata aaatggggca gtgatggcc 1529

<210> 24
<211> 321
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Glu Glu Gly Gln Tyr Ser Glu Ile Glu Glu Leu Pro Arg Arg
1 5 10 15

Arg Cys Cys Arg Arg Gly Thr Gln Ile Val Leu Leu Gly Leu Val
20 25 30

Thr Ala Ala Leu Trp Ala Gly Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Trp
35 40 45

His Trp Asp Thr Thr Gln Ser Leu Lys Gln Leu Glu Glu Arg Ala
50 55 60

Ala Arg Asn Val Ser Gln Val Ser Lys Asn Leu Glu Ser His His
65 70 75

Gly Asp Gln Met Ala Gln Lys Ser Gln Ser Thr Gln Ile Ser Gln
80 85 90

Glu Leu Glu Glu Leu Arg Ala Glu Gln Gln Arg Leu Lys Ser Gln
95 100 105

Asp Leu Glu Leu Ser Trp Asn Leu Asn Gly Leu Gln Ala Asp Leu
110 115 120

Ser Ser Phe Lys Ser Gln Glu Leu Asn Glu Arg Asn Glu Ala Ser
125 130 135

Asp Leu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Glu Val Thr Lys Leu Arg Met
140 145 150

Glu Leu Gln Val Ser Ser Gly Phe Val Cys Asn Thr Cys Pro Glu
155 160 165

Lys Trp Ile Asn Phe Gln Arg Lys Cys Tyr Tyr Phe Gly Lys Gly
170 175 180

Thr Lys Gln Trp Val His Ala Arg Tyr Ala Cys Asp Asp Met Glu
185 190 195

Gly Gln Leu Val Ser Ile His Ser Pro Glu Glu Gln Asp Phe Leu
200 205 210

Thr Lys His Ala Ser His Thr Gly Ser Trp Ile Gly Leu Arg Asn
215 220 225

Leu Asp Leu Lys Gly Glu Phe Ile Trp Val Asp Gly Ser His Val
230 235 240

Asp Tyr Ser Asn Trp Ala Pro Gly Glu Pro Thr Ser Arg Ser Gln
245 250 255

Gly Glu Asp Cys Val Met Met Arg Gly Ser Gly Arg Trp Thr Asp
260 265 270

Ala Phe Cys Asp Arg Lys Leu Gly Ala Trp Val Cys Asp Arg Leu
275 280 285

Ala Thr Cys Thr Pro Pro Ala Ser Glu Gly Ser Ala Glu Ser Met
290 295 300

Gly Pro Asp Ser Arg Pro Asp Pro Asp Gly Arg Leu Pro Thr Pro
305 310 315

Ser Ala Pro Leu His Ser
320

<210> 25
<211> 1244
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 25
agagatgggg acggaggcca cagagcaggt ttcctggggc cattactctg 50

gggatgaaga ggacgcatac tcggctgagc cactgccgga gctttgctac 100

aaggccgatg tccaggcctt cagccgggcc ttccaaccca gtgtctccct 150

gaccgtggct gcgctgggtc tggccggcaa tggcctggtc ctggccaccc 200

acctggcagc ccgacgcgca gcgcgctcgc ccacctctgc ccacctgctc 250

cagctggccc tggccgacct cttgctggcc ctgactctgc ccttcgcggc 300

agcaggggct cttcagggct ggagtctggg aagtgccacc tgccgcacca 350

tctctggcct ctactcggcc tccttccacg ccggcttcct cttcctggcc 400

tgtatcagcg ccgaccgcta cgtggccatc gcgcgagcgc tcccagccgg 450

gccgcggccc tccactcccg gccgcgcaca cttggtctcc gtcatcgtgt 500

ggctgctgtc actgctcctg gcgctgcctg cgctgctctt cagccaggat 550

gggcagcggg aaggccaacg acgctgtcgc ctcatcttcc ccgagggcct 600

cacgcagacg gtgaaggggg cgagcgccgt ggcgcaggtg gccctgggct 650

tcgcgctgcc gctgggcgtc atggtagcct gctacgcgct tctgggccgc 700

acgctgctgg ccgccagggg gcccgagcgc cggcgtgcgc tgcgcgtcgt 750

ggtggctctg gtggcggcct tcgtggtgct gcagctgccc tacagcctcg 800

ccctgctgct ggatactgcc gatctactgg ctgcgcgcga gcggagctgc 850

cctgccagca aacgcaagga tgtcgcactg ctggtgacca gcggcttggc 900

cctcgcccgc tgtggcctca atcccgttct ctacgccttc ctgggcctgc 950

gcttccgcca ggacctgcgg aggctgctac ggggtgggag ctcgccctca 1000

gggcctcaac cccgccgcgg ctgcccccgc cggccccgcc tttcttcctg 1050

ctcagctccc acggagaccc acagtctctc ctgggacaac tagggctgcg 1100

aatctagagg agggggcagg ctgagggtcg tgggaaaggg gagtaggtgg 1150

gggaacactg agaaagaggc agggacctaa agggactacc tctgtgcctt 1200

gccacattaa attgataaca tggaaatgaa aaaaaaaaaa aaaa 1244

<210> 26
<211> 362
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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

Arg Pro Ser Thr Pro Gly Arg Ala His Leu Val Ser Val Ile Val
155 160 165

Trp Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ala Leu Leu Phe Ser
170 175 180

Gln Asp Gly Gln Arg Glu Gly Gln Arg Arg Cys Arg Leu Ile Phe
185 190 195

Pro Glu Gly Leu Thr Gln Thr Val Lys Gly Ala Ser Ala Val Ala
200 205 210

Gln Val Ala Leu Gly Phe Ala Leu Pro Leu Gly Val Met Val Ala
215 220 225

Cys Tyr Ala Leu Leu Gly Arg Thr Leu Leu Ala Ala Arg Gly Pro
230 235 240

Glu Arg Arg Arg Ala Leu Arg Val Val Val Ala Leu Val Ala Ala
245 250 255

Phe Val Val Leu Gln Leu Pro Tyr Ser Leu Ala Leu Leu Leu Asp
260 265 270

Thr Ala Asp Leu Leu Ala Ala Arg Glu Arg Ser Cys Pro Ala Ser
275 280 285

Lys Arg Lys Asp Val Ala Leu Leu Val Thr Ser Gly Leu Ala Leu
290 295 300

Ala Arg Cys Gly Leu Asn Pro Val Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Leu
305 310 315

Arg Phe Arg Gln Asp Leu Arg Arg Leu Leu Arg Gly Gly Ser Ser
320 325 330

Pro Ser Gly Pro Gln Pro Arg Arg Gly Cys Pro Arg Arg Pro Arg
335 340 345

Leu Ser Ser Cys Ser Ala Pro Thr Glu Thr His Ser Leu Ser Trp
350 355 360

Asp Asn

<210> 27
<211> 1066
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 27
cctcggttct atcgattgaa ttcatgaaga cattgcctgc catgcttgga 50

actgggaaat tattttgggt cttcttctta atcccatatc tggacatctg 100

gaacatccat gggaaagaat catgtgatgt acagctttat ataaagagac 150

aatctgaaca ctccatctta gcaggagatc cctttgaact agaatgccct 200

gtgaaatact gtgctaacag gcctcatgtg acttggtgca agctcaatgg 250

aacaacatgt gtaaaacttg aagatagaca aacaagttgg aaggaagaga 300

agaacatttc atttttcatt ctacattttg aaccagtgct tcctaatgac 350

aatgggtcat accgctgttc tgcaaatttt cagtctaatc tcattgaaag 400

ccactcaaca actctttatg tgacagatgt aaaaagtgct tcagaacgac 450

cctccaagga cgaaatggca agcagaccct ggctcctgta tagtttactt 500

cctttggggg gattgcctct actcatcact acctgtttct gcctgttctg 550

ctgcctgaga aggcaccaag gaaagcaaaa tgaactctct gacacagcag 600

gaagggaaat taacctggtt gatgctcacc ttaagagtga gcaaacagaa 650

gcaagcacca ggcaaaattc ccaagtactg ctatcagaaa ctggaattta 700

tgataatgac cctgaccttt gtttcagaat gcaggaaggg tctgaagttt 750

attctaatcc atgcctggaa gaaaacaaac caggcattgt ttatgcttcc 800

ctgaaccatt ctgtcattgg actgaactca agactggcaa gaaatgtaaa 850

agaagcacca acagaatatg catccatatg tgtgaggagt taaggatcct 900

ctagagtcga cctgcagaag cttggccgcc atggcccaac ttgtttattg 950

cagcttataa gtgttacaaa taaacaaata atatttctca atttgagaat 1000

ttttacttta gaaatgttca tgttagtgct tgggtctgaa gggtccatag 1050

gacaaatgat taaaat 1066

<210> 28
<211> 289
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Phe Trp
1 5 10 15

Val Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly
20 25 30

Lys Glu Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu
35 40 45

His Ser Ile Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val
50 55 60

Lys Tyr Cys Ala Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn
65 70 75

Gly Thr Thr Cys Val Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys
80 85 90

Glu Glu Lys Asn Ile Ser Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val
95 100 105

Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln
110 115 120

Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp
125 130 135

Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser Lys Asp Glu Met Ala Ser
140 145 150

Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Ser Leu Leu Pro Leu Gly Gly Leu Pro
155 160 165

Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu Phe Cys Cys Leu Arg Arg

170 175 180

His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala Gly Arg Glu
185 190 195

Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln Thr Glu Ala
200 205 210

Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly Ile
215 220 225

Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser
230 235 240

Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile
245 250 255

Val Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Leu Asn Ser Arg
260 265 270

Leu Ala Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile
275 280 285

Cys Val Arg Ser

<210> 29
<211> 2185
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 29
gttctccttt ccgagccaaa atcccaggcg atggtgaatt atgaacgtgc 50

cacaccatga agctcttgtg gcaggtaact gtgcaccacc acacctggaa 100

tgccatcctg ctcccgttcg tctacctcac ggcgcaagtg tggattctgt 150

gtgcagccat cgctgctgcc gcctcagccg ggccccagaa ctgcccctcc 200

gtttgctcgt gcagtaacca gttcagcaag gtggtgtgca cgcgccgggg 250

cctctccgag gtcccgcagg gtattccctc gaacacccgg tacctcaacc 300

tcatggagaa caacatccag atgatccagg ccgacacctt ccgccacctc 350

caccacctgg aggtcctgca gttgggcagg aactccatcc ggcagattga 400

ggtgggggcc ttcaacggcc tggccagcct caacaccctg gagctgttcg 450

acaactggct gacagtcatc cctagcgggg cctttgaata cctgtccaag 500

ctgcgggagc tctggcttcg caacaacccc atcgaaagca tcccctctta 550

cgccttcaac cgggtgccct ccctcatgcg cctggacttg ggggagctca 600

agaagctgga gtatatctct gagggagctt ttgaggggct gttcaacctc 650

aagtatctga acttgggcat gtgcaacatt aaagacatgc ccaatctcac 700

ccccctggtg gggctggagg agctggagat gtcagggaac cacttccctg 750

agatcaggcc tggctccttc catggcctga gctccctcaa gaagctctgg 800

gtcatgaact cacaggtcag cctgattgag cggaatgctt ttgacgggct 850

ggcttcactt gtggaactca acttggccca caataacctc tcttctttgc 900

cccatgacct ctttaccccg ctgaggtacc tggtggagtt gcatctacac 950

cacaaccctt ggaactgtga ttgtgacatt ctgtggctag cctggtggct 1000

tcgagagtat atacccacca attccacctg ctgtggccgc tgtcatgctc 1050

ccatgcacat gcgaggccgc tacctcgtgg aggtggacca ggcctccttc 1100

cagtgctctg ccccttcat catggacgca cctcgagacc tcaacatttc 1150

tgagggtcgg atggcagaac ttaagtgtcg gactcccct atgtcctccg 1200

tgaagtggtt gctgcccaat gggacagtgc tcagccacgc ctcccgccac 1250

ccaaggatct ctgtcctcaa cgacggcacc ttgaactttt cccacgtgct 1300

gctttcagac actggggtgt acacatgcat ggtgaccaat gttgcaggca 1350

actccaacgc ctcggcctac ctcaatgtga gcacggctga gcttaacacc 1400

tccaactaca gcttcttcac cacagtaaca gtggagacca cggagatctc 1450

gcctgaggac acaacgcgaa agtacaagcc tgttcctacc acgtccactg 1500

gttaccagcc ggcatatacc acctctacca cggtgctcat tcagactacc 1550

cgtgtgccca agcaggtggc agtacccgcg acagacacca ctgacaagat 1600

gcagaccagc ctggatgaag tcatgaagac caccaagatc atcattggct 1650

gctttgtggc agtgactctg ctagctgccg ccatgttgat tgtcttctat 1700

aaacttcgta agcggcacca gcagcggagt acagtcacag ccgcccggac 1750

tgttgagata atccaggtgg acgaagacat cccagcagca acatccgcag 1800

cagcaacagc agctccgtcc ggtgtatcag gtgaggggc agtagtgctg 1850

cccacaattc atgaccatat taactacaac acctacaaac cagcacatgg 1900

ggcccactgg acagaaaaca gcctggggaa ctctctgcac cccacagtca 1950

ccactatctc tgaaccttat ataattcaga cccataccaa ggacaaggta 2000

caggaaactc aaatatgact ccctctcccc aaaaaactta taaaatgcaa 2050

tagaatgcac acaaagacag caacttttgt acagagtggg gagagacttt 2100

ttcttgtata tgcttatata ttaagtctat gggctggtta aaaaaaacag 2150

attatattaa aatttaaaga caaaaagtca aaaca 2185

<210> 30
<211> 653
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Lys Leu Leu Trp Gln Val Thr Val His His His Thr Trp Asn
1 5 10 15

Ala Ile Leu Leu Pro Phe Val Tyr Leu Thr Ala Gln Val Trp Ile
20 25 30

Leu Cys Ala Ala Ile Ala Ala Ala Ala Ser Ala Gly Pro Gln Asn
35 40 45

Cys Pro Ser Val Cys Ser Cys Ser Asn Gln Phe Ser Lys Val Val

```
                  50                  55                  60

Cys Thr Arg Arg Gly Leu Ser Glu Val Pro Gln Gly Ile Pro Ser
                  65                  70                  75

Asn Thr Arg Tyr Leu Asn Leu Met Glu Asn Asn Ile Gln Met Ile
                  80                  85                  90

Gln Ala Asp Thr Phe Arg His Leu His His Leu Glu Val Leu Gln
                  95                 100                 105

Leu Gly Arg Asn Ser Ile Arg Gln Ile Glu Val Gly Ala Phe Asn
                 110                 115                 120

Gly Leu Ala Ser Leu Asn Thr Leu Glu Leu Phe Asp Asn Trp Leu
                 125                 130                 135

Thr Val Ile Pro Ser Gly Ala Phe Glu Tyr Leu Ser Lys Leu Arg
                 140                 145                 150

Glu Leu Trp Leu Arg Asn Asn Pro Ile Glu Ser Ile Pro Ser Tyr
                 155                 160                 165

Ala Phe Asn Arg Val Pro Ser Leu Met Arg Leu Asp Leu Gly Glu
                 170                 175                 180

Leu Lys Lys Leu Glu Tyr Ile Ser Glu Gly Ala Phe Glu Gly Leu
                 185                 190                 195

Phe Asn Leu Lys Tyr Leu Asn Leu Gly Met Cys Asn Ile Lys Asp
                 200                 205                 210

Met Pro Asn Leu Thr Pro Leu Val Gly Leu Glu Glu Leu Glu Met
                 215                 220                 225

Ser Gly Asn His Phe Pro Glu Ile Arg Pro Gly Ser Phe His Gly
                 230                 235                 240

Leu Ser Ser Leu Lys Lys Leu Trp Val Met Asn Ser Gln Val Ser
                 245                 250                 255

Leu Ile Glu Arg Asn Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ser Leu Val Glu
                 260                 265                 270

Leu Asn Leu Ala His Asn Asn Leu Ser Ser Leu Pro His Asp Leu
                 275                 280                 285

Phe Thr Pro Leu Arg Tyr Leu Val Glu Leu His Leu His His Asn
                 290                 295                 300

Pro Trp Asn Cys Asp Cys Asp Ile Leu Trp Leu Ala Trp Trp Leu
                 305                 310                 315

Arg Glu Tyr Ile Pro Thr Asn Ser Thr Cys Cys Gly Arg Cys His
                 320                 325                 330

Ala Pro Met His Met Arg Gly Arg Tyr Leu Val Glu Val Asp Gln
                 335                 340                 345

Ala Ser Phe Gln Cys Ser Ala Pro Phe Ile Met Asp Ala Pro Arg
                 350                 355                 360

Asp Leu Asn Ile Ser Glu Gly Arg Met Ala Glu Leu Lys Cys Arg
                 365                 370                 375

Thr Pro Pro Met Ser Ser Val Lys Trp Leu Leu Pro Asn Gly Thr
                 380                 385                 390
```

Val Leu Ser His Ala Ser Arg His Pro Arg Ile Ser Val Leu Asn
395 400 405

Asp Gly Thr Leu Asn Phe Ser His Val Leu Leu Ser Asp Thr Gly
410 415 420

Val Tyr Thr Cys Met Val Thr Asn Val Ala Gly Asn Ser Asn Ala
425 430 435

Ser Ala Tyr Leu Asn Val Ser Thr Ala Glu Leu Asn Thr Ser Asn
440 445 450

Tyr Ser Phe Phe Thr Thr Val Thr Val Glu Thr Thr Glu Ile Ser
455 460 465

Pro Glu Asp Thr Thr Arg Lys Tyr Lys Pro Val Pro Thr Thr Ser
470 475 480

Thr Gly Tyr Gln Pro Ala Tyr Thr Thr Ser Thr Thr Val Leu Ile
485 490 495

Gln Thr Thr Arg Val Pro Lys Gln Val Ala Val Pro Ala Thr Asp
500 505 510

Thr Thr Asp Lys Met Gln Thr Ser Leu Asp Glu Val Met Lys Thr
515 520 525

Thr Lys Ile Ile Ile Gly Cys Phe Val Ala Val Thr Leu Leu Ala
530 535 540

Ala Ala Met Leu Ile Val Phe Tyr Lys Leu Arg Lys Arg His Gln
545 550 555

Gln Arg Ser Thr Val Thr Ala Ala Arg Thr Val Glu Ile Ile Gln
560 565 570

Val Asp Glu Asp Ile Pro Ala Ala Thr Ser Ala Ala Ala Thr Ala
575 580 585

Ala Pro Ser Gly Val Ser Gly Glu Gly Ala Val Val Leu Pro Thr
590 595 600

Ile His Asp His Ile Asn Tyr Asn Thr Tyr Lys Pro Ala His Gly
605 610 615

Ala His Trp Thr Glu Asn Ser Leu Gly Asn Ser Leu His Pro Thr
620 625 630

Val Thr Thr Ile Ser Glu Pro Tyr Ile Ile Gln Thr His Thr Lys
635 640 645

Asp Lys Val Gln Glu Thr Gln Ile
650

<210> 31
<211> 1488
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 31
gctgaaaggg ccacgtttgt tttcattaca aataagacca ccgagtgggc 50

tcctggcgtg ggggcgggag cagccgcgcg cagtcttcag aggcagcccc 100

ccaggctgtc tctggagggt gtgtctctgc ttccctttcc ccgtgtttat 150

tttcagacga agccaagtgg cccgggggga ccctccggac tcccagcctt 200

cagagaggag ggcagctcgg gctttcgccg cagtgcttcc tgcccgtcac 250

gtgtgtgctc ctagccgggg tcgggggagc tggtatcttg gcccttctgg 300

gaggacgcgc acagcccgag gaggcagagc cccagacggg aatgggcttt 350

tcagaggtgg ggtgcgggcg aggggacgat gcattatttt taatatttga 400

tttatttttc caactggact tcttcccggg gctctttctg ggcccagctg 450

cctttgtgat cccgcgcccc ggtcctcggc ctctcacctc cagcgccggg 500

gcgccccctg ctgtcggaag cggctgtgac cgggcagagg tgctatctgg 550

gactctgggt tctcagcccg gggacagcga accgaggggc agatgatcca 600

tcagaaaaga gccggcactg cccagccccg cgcccctgcc cctgcctttt 650

tccgggagcg cgccgcgccg cacccgctac ggccgcttga ccccatcttt 700

gagcccggcc ccaagctctg ggaccgtcgt gcccctcatc aaggaagagc 750

caaggacccc aaggagaagg tcaggagcgg cggtgtggat gtcccttggc 800

tgcaggcccc gccgcgcact cccttcagtc cttcccttct ctagggacca 850

ggtagcatca gtgcctggat ctcggccttg tgtgccctgc tccctgcccc 900

acctactaag aaccaagtct ggttcaccgg ctcccaagag ctggaaccca 950

ttctcagcta gctgggggcc caggccaccc cttccctcca gacctgtgtg 1000

ccttctgccc tggctccagg gccccccaca ccgtgaccag ggcgggatcc 1050

ctatggggct ggccagtcgg caccgtgcca ggcccacagt gccctgggcg 1100

tccatggaag tcgttctgtg tctttaaaat cagaaggaag acattaacct 1150

ttaggctgaa gaaaatgttt tagtacacag caataactta tttgtcttta 1200

tccaacagcc ataaaatata actttaaata ttctattgat agagaaagga 1250

gttcatgaag gcagaaatgc ctggggccca cgaacatccc agtgtggccc 1300

tggacgggac atcatgctgg gcaacacagc taaaatgcgg gtgaagacca 1350

gatttcttgc acatggcggt gacgggatgc tccctagaga gcttcaagtg 1400

gattctttgc tttttatttt ctctcttaat aaaaatgtat gatgtttaca 1450

ttgtcagaga acaaacagaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 1488

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32
Met Ser Leu Gly Cys Arg Pro Arg Arg Ala Leu Pro Ser Val Leu
1 5 10 15

Pro Phe Ser Arg Asp Gln Val Ala Ser Val Pro Gly Ser Arg Pro
20 25 30

Cys Val Pro Cys Ser Leu Pro His Leu Leu Arg Thr Lys Ser Gly
35 40 45

Ser Pro Ala Pro Lys Ser Trp Asn Pro Phe Ser Ala Ser Trp Gly

50 55 60

Pro Arg Pro Pro Leu Pro Ser Arg Pro Val Cys Leu Leu Pro Trp
65 70 75

Leu Gln Gly Pro Pro His Arg Asp Gln Gly Gly Ile Pro Met Gly
80 85 90

Leu Ala Ser Arg His Arg Ala Arg Pro Thr Val Pro Trp Ala Ser
95 100 105

Met Glu Val Val Leu Cys Leu
110

<210> 33
<211> 1322
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 33
atatatcgat atgctgccga ggctgttgct gttgatctgt gctccactct 50

gtgaacctgc cgagctgttt ttgatagcca gcccctccca tcccacagag 100

gggagcccag tgaccctgac gtgtaagatg ccctttctac agagttcaga 150

tgcccagttc cagttctgct ttttcagaga cacccgggcc ttgggcccag 200

gctggagcag ctcccccaag ctccagatcg ctgccatgtg gaaagaagac 250

acagggtcat actggtgcga ggcacagaca atggcgtcca aagtcttgag 300

gagcaggaga tcccagataa atgtgcacag ggtccctgtc gctgatgtga 350

gcttggagac tcagccccca ggaggacagg tgatggaggg agacaggctg 400

gtcctcatct gctcagttgc tatgggcaca ggagacatca ccttcctttg 450

gtacaaaggg gctgtaggtt taaaccttca gtcaaagacc cagcgttcac 500

tgacagcaga gtatgagatt ccttcagtga gggagagtga tgctgagcaa 550

tattactgtg tagctgaaaa tggctatggt cccagcccca gtgggctggt 600

gagcatcact gtcagaatcc cggtgtctcg cccaatcctc atgctcaggg 650

ctcccagggc ccaggctgca gtggaggatg tgctggagct tcactgtgag 700

gccctgagag gctctcctcc gatcctgtac tggttttatc acgaggatat 750

caccctgggg agcaggtcgg ccccctctgg aggaggagcc tccttcaacc 800

tttccctgac tgaagaacat tctggaaact actcctgtga ggccaacaat 850

ggcctggggg cccagcgcag tgaggcggtg acactcaact tcacagtgcc 900

tactggggcc agaagcaatc atcttacctc aggagtcatt gaggggctgc 950

tcagcaccct tggtccagcc accgtggcct tattattttg ctacggcctc 1000

aaaagaaaaa taggaagacg ttcagccagg gatccactca ggagccttcc 1050

cagccctcta ccccaagagt tcacgtacct caactcacct accccagggc 1100

agctacagcc tatatatgaa aatgtgaatg ttgtaagtgg ggatgaggtt 1150

tattcactgg cgtactataa ccagccggag caggaatcag tagcagcaga 1200

aaccctgggg acacatatgg aggacaaggt ttccttagac atctattcca 1250

ggctgaggaa agcaaacatt acagatgtgg actatgaaga tgctatgtaa 1300

ggttatggaa gattctgctc tt 1322

<210> 34
<211> 429
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Met Leu Pro Arg Leu Leu Leu Leu Ile Cys Ala Pro Leu Cys Glu
1 5 10 15

Pro Ala Glu Leu Phe Leu Ile Ala Ser Pro Ser His Pro Thr Glu
20 25 30

Gly Ser Pro Val Thr Leu Thr Cys Lys Met Pro Phe Leu Gln Ser
35 40 45

Ser Asp Ala Gln Phe Gln Phe Cys Phe Phe Arg Asp Thr Arg Ala
50 55 60

Leu Gly Pro Gly Trp Ser Ser Ser Pro Lys Leu Gln Ile Ala Ala
65 70 75

Met Trp Lys Glu Asp Thr Gly Ser Tyr Trp Cys Glu Ala Gln Thr
80 85 90

Met Ala Ser Lys Val Leu Arg Ser Arg Arg Ser Gln Ile Asn Val
95 100 105

His Arg Val Pro Val Ala Asp Val Ser Leu Glu Thr Gln Pro Pro
110 115 120

Gly Gly Gln Val Met Glu Gly Asp Arg Leu Val Leu Ile Cys Ser
125 130 135

Val Ala Met Gly Thr Gly Asp Ile Thr Phe Leu Trp Tyr Lys Gly
140 145 150

Ala Val Gly Leu Asn Leu Gln Ser Lys Thr Gln Arg Ser Leu Thr
155 160 165

Ala Glu Tyr Glu Ile Pro Ser Val Arg Glu Ser Asp Ala Glu Gln
170 175 180

Tyr Tyr Cys Val Ala Glu Asn Gly Tyr Gly Pro Ser Pro Ser Gly
185 190 195

Leu Val Ser Ile Thr Val Arg Ile Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu
200 205 210

Met Leu Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Ala Val Glu Asp Val Leu
215 220 225

Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile Leu Tyr
230 235 240

Trp Phe Tyr His Glu Asp Ile Thr Leu Gly Ser Arg Ser Ala Pro
245 250 255

Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Glu Glu His
260 265 270

Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu Gly Ala Gln
275 280 285

Arg Ser Glu Ala Val Thr Leu Asn Phe Thr Val Pro Thr Gly Ala
290 295 300

Arg Ser Asn His Leu Thr Ser Gly Val Ile Glu Gly Leu Leu Ser
305 310 315

Thr Leu Gly Pro Ala Thr Val Ala Leu Leu Phe Cys Tyr Gly Leu
320 325 330

Lys Arg Lys Ile Gly Arg Arg Ser Ala Arg Asp Pro Leu Arg Ser
335 340 345

Leu Pro Ser Pro Leu Pro Gln Glu Phe Thr Tyr Leu Asn Ser Pro
350 355 360

Thr Pro Gly Gln Leu Gln Pro Ile Tyr Glu Asn Val Asn Val Val
365 370 375

Ser Gly Asp Glu Val Tyr Ser Leu Ala Tyr Tyr Asn Gln Pro Glu
380 385 390

Gln Glu Ser Val Ala Ala Glu Thr Leu Gly Thr His Met Glu Asp
395 400 405

Lys Val Ser Leu Asp Ile Tyr Ser Arg Leu Arg Lys Ala Asn Ile
410 415 420

Thr Asp Val Asp Tyr Glu Asp Ala Met
425

<210> 35
<211> 685
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 35
gatgtgctcc ttggagctgg tgtgcagtgt cctgactgta agatcaagtc 50

caaacctgtt ttggaattga ggaaacttct cttttgatct cagcccttgg 100

tggtccaggt cttcatgctg ctgtgggtga tattactggt cctggctcct 150

gtcagtggac agtttgcaag gacacccagg cccattattt tcctccagcc 200

tccatggacc acagtcttcc aaggagagag agtgaccctc acttgcaagg 250

gatttcgctt ctactcacca cagaaaacaa aatggtacca tcggtacctt 300

gggaaagaaa tactaagaga aaccccagac aatatccttg aggttcagga 350

atctggagag tacagatgcc aggcccaggg ctcccctctc agtagccctg 400

tgcacttgga tttttcttca gagatgggat ttcctcatgc tgcccaggct 450

aatgttgaac tcctgggctc aagtgatctg ctcacctagg cctctcaaag 500

cgctgggatt acagcttcgc tgatcctgca agctccactt tctgtgtttg 550

aaggagactc tgtggttctg aggtgccggg caaaggcgga agtaacactg 600

aataatacta tttacaagaa tgataatgtc ctggcattcc ttaataaaag 650

aactgacttc caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 685

<210> 36
<211> 124
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly
1 5 10 15

Gln Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro
20 25 30

Trp Thr Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys
35 40 45

Gly Phe Arg Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg
50 55 60

Tyr Leu Gly Lys Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu
65 70 75

Glu Val Gln Glu Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ala Gln Gly Ser
80 85 90

Pro Leu Ser Ser Pro Val His Leu Asp Phe Ser Ser Glu Met Gly
95 100 105

Phe Pro His Ala Ala Gln Ala Asn Val Glu Leu Leu Gly Ser Ser
110 115 120

Asp Leu Leu Thr

<210> 37
<211> 1337
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 37

ggatttttgt gatccgcgat tcgctcccac gggcgggacc tttgtaactg 50

cgggaggccc aggacaggcc caccctgcgg ggcgggaggc agccggggtg 100

agggaggtga agaaaccaag acgcagagag gccaagcccc ttgccttggg 150

tcacacagcc aaaggaggca gagccagaac tcacaaccag atccagaggc 200

aacagggaca tggccacctg ggacgaaaag gcagtcaccc gcagggccaa 250

ggtggctccc gctgagagga tgagcaagtt cttaaggcac ttcacggtcg 300

tgggagacga ctaccatgcc tggaacatca actacaagaa atgggagaat 350

gaagaggagg aggaggagga ggagcagcca ccacccacac cagtctcagg 400

cgaggaaggc agagctgcag cccctgacgt tgcccctgcc cctggccccg 450

cacccagggc ccccttgac ttcaggggca tgttgaggaa actgttcagc 500

tcccacaggt ttcaggtcat catcatctgc ttggtggttc tggatgccct 550

cctggtgctt gctgagctca tcctggacct gaagatcatc cagcccgaca 600

agaataacta tgctgccatg gtattccact acatgagcat caccatcttg 650

gtctttttta tgatggagat catctttaaa ttatttgtct tccgcctgag 700

ttctttcacc acaagtttga gatcctggat gcccgtcgtg gtggtggtct 750

cattcatcct ggacattgtc ctcctgttcc aggagcacca gtttgaggct 800

ctgggcctgc tgattctgct ccggctgtgg cgggtggccc ggatcatcaa 850

tgggattatc atctcagtta agacacgttc agaacggcaa ctcttaaggt 900

taaaacagat gaatgtacaa ttggccgcca agattcaaca ccttgagttc 950

agctgctctg agaagcccct ggactgatga gtttgctgta tcaacctgta 1000

aggagaagct ctctccggat ggctatggga atgaaagaat ccgacttcta 1050

ctctcacaca gccaccgtga aagtcctgga gtaaaatgtg ctgtgtacag 1100

aagagagaga aggaagcagg ctggcatgtt cactgggctg gtgttacgac 1150

agagaacctg acagtcactg gccagttatc acttcagatt acaaatcaca 1200

cagagcatct gcctgttttc aatcacaaga gaacaaaacc aaaatctata 1250

aagatattct gaaaatatga cagaatttga caaataaaag cataaacgtg 1300

taaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaa 1337

<210> 38
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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

200 205 210

Arg Ile Ile Asn Gly Ile Ile Ile Ser Val Lys Thr Arg Ser Glu
215 220 225

Arg Gln Leu Leu Arg Leu Lys Gln Met Asn Val Gln Leu Ala Ala
230 235 240

Lys Ile Gln His Leu Glu Phe Ser Cys Ser Glu Lys Pro Leu Asp
245 250 255

<210> 39
<211> 2970
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 39
agtgaagggg tttcccatat gaaaaataca gaaagaatta tttgaatact 50

agcaaataca caacttgata tttctagaga acccaggcac agtcttggag 100

acattactcc tgagagactg cagctgatgg aagatgagcc ccaacttcta 150

aaaatgtatc actaccggga ttgagataca aacagcattt aggaaggtct 200

catctgagta gcagcttcct gccctccttc ttggagataa gtcgggcttt 250

tggtgagaca gactttccca accctctgcc cggccggtgc ccatgcttct 300

gtggctgctg ctgctgatcc tgactcctgg aagagaacaa tcaggggtgg 350

ccccaaaagc tgtacttctc ctcaatcctc catggtccac agccttcaaa 400

ggagaaaaag tggctctcat atgcagcagc atatcacatt ccctagccca 450

gggagacaca tattggtatc acgatgagaa gttgttgaaa ataaaacatg 500

acaagatcca aattacagag cctggaaatt accaatgtaa gacccgagga 550

tcctccctca gtgatgccgt gcatgtggaa ttttcacctg actggctgat 600

cctgcaggct ttacatcctg tctttgaagg agacaatgtc attctgagat 650

gtcaggggaa agacaacaaa aacactcatc aaaaggttta ctacaaggat 700

ggaaaacagc ttcctaatag ttataattta gagaagatca cagtgaattc 750

agtctccagg gataatagca aatatcattg tactgcttat aggaagtttt 800

acatacttga cattgaagta acttcaaaac ccctaaatat ccaagttcaa 850

gagctgtttc tacatcctgt gctgagagcc agctcttcca cgcccataga 900

ggggagtccc atgaccctga cctgtgagac ccagctctct ccacagaggc 950

cagatgtcca gctgcaattc tccctcttca gagatagcca gaccctcgga 1000

ttgggctgga gcaggtcccc cagactccag atccctgcca tgtggactga 1050

agactcaggg tcttactggt gtgaggtgga gacagtgact cacagcatca 1100

aaaaaaggag cctgagatct cagatacgtg tacagagagt ccctgtgtct 1150

aatgtgaatc tagagatccg gcccaccgga gggcagctga ttgaaggaga 1200

aaatatggtc cttatttgct cagtagccca gggttcaggg actgtcacat 1250

tctcctggca caaagaagga agagtaagaa gcctgggtag aaagacccag 1300

cgttccctgt tggcagagct gcatgttctc accgtgaagg agagtgatgc 1350

agggagatac tactgtgcag ctgataacgt tcacagcccc atcctcagca 1400

cgtggattcg agtcaccgtg agaattccgg tatctcaccc tgtcctcacc 1450

ttcagggctc ccagggccca cactgtggtg ggggacctgc tggagcttca 1500

ctgtgagtcc ctgagaggct ctcccccgat cctgtaccga ttttatcatg 1550

aggatgtcac cctggggaac agctcagccc cctctggagg aggagcctcc 1600

ttcaacctct ctctgactgc agaacattct ggaaactact cctgtgatgc 1650

agacaatggc ctgggggccc agcacagtca tggagtgagt ctcagggtca 1700

cagttccggt gtctcgcccc gtcctcaccc tcagggctcc cggggcccag 1750

gctgtggtgg gggacctgct ggagcttcac tgtgagtccc tgagaggctc 1800

cttcccgatc ctgtactggt tttatcacga ggatgacacc ttggggaaca 1850

tctcggccca ctctggagga ggggcatcct tcaacctctc tctgactaca 1900

gaacattctg gaaactactc atgtgaggct gacaatggcc tgggggccca 1950

gcacagtaaa gtggtgacac tcaatgttac aggaacttcc aggaacagaa 2000

caggccttac cgctgcggga atcacggggc tggtgctcag catcctcgtc 2050

cttgctgctg ctgctgctct gctgcattac gccagggccc gaaggaaacc 2100

aggaggactt tctgccactg gaacatctag tcacagtcct agtgagtgtc 2150

aggagccttc ctcgtccagg ccttccagga tagaccctca agagcccact 2200

cactctaaac cactagcccc aatggagctg gagccaatgt acagcaatgt 2250

aaatcctgga gatagcaacc cgatttattc ccagatctgg agcatccagc 2300

atacaaaaga aaactcagct aattgtccaa tgatgcatca agagcatgag 2350

gaacttacag tcctctattc agaactgaag aagacacacc cagacgactc 2400

tgcaggggag gctagcagca gaggcagggc ccatgaagaa gatgatgaag 2450

aaaactatga gaatgtacca cgtgtattac tggcctcaga ccactagccc 2500

cttacccaga gtggcccaca ggaaacagcc tgcaccattt ttttttctgt 2550

tctctccaac cacacatcat ccatctctcc agactctgcc tcctacgagg 2600

ctgggctgca gggtatgtga ggctgagcaa aaggtctgca aatctcccct 2650

gtgcctgatc tgtgtgttcc ccaggaagag agcaggcagc ctctgagcaa 2700

gcactgtgtt attttcacag tggagacacg tggcaaggca ggagggccct 2750

cagctcctag ggctgtcgaa tagaggagga gagagaaatg gtctagccag 2800

ggttacaagg gcacaatcat gaccatttga tccaagtgtg atcgaaagct 2850

gttaatgtgc tctctgtata aacaatttgc tccaaatatt ttgtttccct 2900

tttttgtgtg gctggtagtg gcattgctga tgttttggtg tatatgctgt 2950

atccttgcta ccatattggg 2970

<210> 40
<211> 734
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

```
Met Leu Leu Trp Leu Leu Leu Leu Ile Leu Thr Pro Gly Arg Glu
  1               5                  10                  15

Gln Ser Gly Val Ala Pro Lys Ala Val Leu Leu Leu Asn Pro Pro
             20                  25                  30

Trp Ser Thr Ala Phe Lys Gly Glu Lys Val Ala Leu Ile Cys Ser
         35                  40                  45

Ser Ile Ser His Ser Leu Ala Gln Gly Asp Thr Tyr Trp Tyr His
     50                  55                  60

Asp Glu Lys Leu Leu Lys Ile Lys His Asp Lys Ile Gln Ile Thr
 65                  70                  75

Glu Pro Gly Asn Tyr Gln Cys Lys Thr Arg Gly Ser Ser Leu Ser
             80                  85                  90

Asp Ala Val His Val Glu Phe Ser Pro Asp Trp Leu Ile Leu Gln
         95                 100                 105

Ala Leu His Pro Val Phe Glu Gly Asp Asn Val Ile Leu Arg Cys
    110                 115                 120

Gln Gly Lys Asp Asn Lys Asn Thr His Gln Lys Val Tyr Tyr Lys
    125                 130                 135

Asp Gly Lys Gln Leu Pro Asn Ser Tyr Asn Leu Glu Lys Ile Thr
    140                 145                 150

Val Asn Ser Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Tyr His Cys Thr Ala
    155                 160                 165

Tyr Arg Lys Phe Tyr Ile Leu Asp Ile Glu Val Thr Ser Lys Pro
    170                 175                 180

Leu Asn Ile Gln Val Gln Glu Leu Phe Leu His Pro Val Leu Arg
    185                 190                 195

Ala Ser Ser Ser Thr Pro Ile Glu Gly Ser Pro Met Thr Leu Thr
    200                 205                 210

Cys Glu Thr Gln Leu Ser Pro Gln Arg Pro Asp Val Gln Leu Gln
    215                 220                 225

Phe Ser Leu Phe Arg Asp Ser Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser
    230                 235                 240

Arg Ser Pro Arg Leu Gln Ile Pro Ala Met Trp Thr Glu Asp Ser
    245                 250                 255

Gly Ser Tyr Trp Cys Glu Val Glu Thr Val Thr His Ser Ile Lys
    260                 265                 270

Lys Arg Ser Leu Arg Ser Gln Ile Arg Val Gln Arg Val Pro Val
    275                 280                 285

Ser Asn Val Asn Leu Glu Ile Arg Pro Thr Gly Gly Gln Leu Ile
    290                 295                 300

Glu Gly Glu Asn Met Val Leu Ile Cys Ser Val Ala Gln Gly Ser
```

305 310 315

Gly Thr Val Thr Phe Ser Trp His Lys Glu Gly Arg Val Arg Ser
320 325 330

Leu Gly Arg Lys Thr Gln Arg Ser Leu Leu Ala Glu Leu His Val
335 340 345

Leu Thr Val Lys Glu Ser Asp Ala Gly Arg Tyr Tyr Cys Ala Ala
350 355 360

Asp Asn Val His Ser Pro Ile Leu Ser Thr Trp Ile Arg Val Thr
365 370 375

Val Arg Ile Pro Val Ser His Pro Val Leu Thr Phe Arg Ala Pro
380 385 390

Arg Ala His Thr Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu
395 400 405

Ser Leu Arg Gly Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Arg Phe Tyr His Glu
410 415 420

Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala
425 430 435

Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser
440 445 450

Cys Asp Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln His Ser His Gly Val
455 460 465

Ser Leu Arg Val Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu
470 475 480

Arg Ala Pro Gly Ala Gln Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu
485 490 495

His Cys Glu Ser Leu Arg Gly Ser Phe Pro Ile Leu Tyr Trp Phe
500 505 510

Tyr His Glu Asp Asp Thr Leu Gly Asn Ile Ser Ala His Ser Gly
515 520 525

Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu His Ser Gly
530 535 540

Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln His Ser
545 550 555

Lys Val Val Thr Leu Asn Val Thr Gly Thr Ser Arg Asn Arg Thr
560 565 570

Gly Leu Thr Ala Ala Gly Ile Thr Gly Leu Val Leu Ser Ile Leu
575 580 585

Val Leu Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu His Tyr Ala Arg Ala Arg
590 595 600

Arg Lys Pro Gly Gly Leu Ser Ala Thr Gly Thr Ser Ser His Ser
605 610 615

Pro Ser Glu Cys Gln Glu Pro Ser Ser Ser Arg Pro Ser Arg Ile
620 625 630

Asp Pro Gln Glu Pro Thr His Ser Lys Pro Leu Ala Pro Met Glu
635 640 645

Leu Glu Pro Met Tyr Ser Asn Val Asn Pro Gly Asp Ser Asn Pro
650 655 660

Ile Tyr Ser Gln Ile Trp Ser Ile Gln His Thr Lys Glu Asn Ser
665 670 675

Ala Asn Cys Pro Met Met His Gln Glu His Glu Glu Leu Thr Val
680 685 690

Leu Tyr Ser Glu Leu Lys Lys Thr His Pro Asp Asp Ser Ala Gly
695 700 705

Glu Ala Ser Ser Arg Gly Arg Ala His Glu Glu Asp Asp Glu Glu
710 715 720

Asn Tyr Glu Asn Val Pro Arg Val Leu Leu Ala Ser Asp His
725 730

<210> 41
<211> 3459
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 41
ctcaatcagc tttatgcaga gaagaagctt actgagctca ctgctggtgc 50

tggtgtaggc aagtgctgct ttggcaatct gggctgacct ggcttgtctc 100

ctcagaactc cttctccaac cctggagcag gcttccatgc tgctgtgggc 150

gtccttgctg gcctttgctc cagtctgtgg acaatctgca gctgcacaca 200

aacctgtgat ttccgtccat cctccatgga ccacattctt caaaggagag 250

agagtgactc tgacttgcaa tggatttcag ttctatgcaa cagagaaaac 300

aacatggtat catcggcact actggggaga aaagttgacc ctgaccccag 350

gaaacaccct cgaggttcgg gaatctggac tgtacagatg ccaggcccgg 400

ggctccccac gaagtaaccc tgtgcgcttg ctcttttctt cagactcctt 450

aatcctgcag gcaccatatt ctgtgtttga aggtgacaca ttggttctga 500

gatgccacag aagaaggaaa gagaaattga ctgctgtgaa atatacttgg 550

aatggaaaca ttctttccat ttctaataaa agctgggatc ttcttatccc 600

acaagcaagt tcaaataaca atggcaatta tcgatgcatt ggatatggag 650

atgagaatga tgtatttaga tcaaatttca aaataattaa aattcaagaa 700

ctatttccac atccagagct gaaagctaca gactctcagc ctacagaggg 750

gaattctgta aacctgagct gtgaaacaca gcttcctcca gagcggtcag 800

acaccccact tcacttcaac ttcttcagag atggcgaggt catcctgtca 850

gactggagca cgtacccgga actccagctc ccaaccgtct ggagagaaaa 900

ctcaggatcc tattggtgtg gtgctgaaac agtgaggggt aacatccaca 950

agcacagtcc ctcgctacag atccatgtgc agcggatccc tgtgtctggg 1000

gtgctcctgg agacccagcc ctcaggggc caggctgttg aaggggagat 1050

gctggtcctt gtctgctccg tggctgaagg cacaggggat accacattct 1100

cctggcaccg agaggacatg caggagagtc tggggaggaa aactcagcgt 1150

tccctgagag cagagctgga gctccctgcc atcagacaga gccatgcagg 1200

gggatactac tgtacagcag acaacagcta cggccctgtc cagagcatgg 1250

tgctgaatgt cactgtgaga gagaccccag gcaacagaga tggccttgtc 1300

gccgcgggag ccactggagg gctgctcagt gctcttctcc tggctgtggc 1350

cctgctgttt cactgctggc gtcggaggaa gtcaggagtt ggtttcttgg 1400

gagacgaaac caggctccct cccgctccag gcccaggaga gtcctcccat 1450

tccatctgcc ctgcccaggt ggagcttcag tcgttgtatg ttgatgtaca 1500

ccccaaaaag ggagatttgg tatactctga gatccagact actcagctgg 1550

gagaagaaga ggaagctaat acctccagga cacttctaga ggataaggat 1600

gtctcagttg tctactctga ggtaaagaca caacacccag ataactcagc 1650

tggaaagatc agctctaagg atgaagaaag ttaagagaat gaaaagttac 1700

gggaacgtcc tactcatgtg atttctccct tgtccaaagt cccaggccca 1750

gtgcagtcct tgcggcacct ggaatgatca actcattcca gctttctaat 1800

tcttctcatg catatgcatt cactcccagg aatactcatt cgtctactct 1850

gatgttggga tggaatggcc tctgaaagac ttcactaaaa tgaccaggat 1900

ccacagttaa gagaagaccc tgtagtattt gctgtgggcc tgacctaatg 1950

cattccctag ggtctgcttt agagaagggg gataaagaga gagaaggact 2000

gttatgaaaa acagaagcac aaattttggt gaattgggat ttgcagagat 2050

gaaaaagact gggtgacctg gatctctgct taatacatct acaaccattg 2100

tctcactgga gactcacttg catcagtttg tttaactgtg agtggctgca 2150

caggcactgt gcaaacaatg aaaagcccct tcacttctgc ctgcacagct 2200

tacactgtca ggattcagtt gcagattaaa gaacccatct ggaatggttt 2250

acagagagag gaatttaaaa gaggacatca gaagagctgg agatgcaagc 2300

tctaggctgc gcttccaaaa gcaaatgata attatgttaa tgtcattagt 2350

gacaaagatt tgcaacatta gagaaaagag acacaaatat aaaattaaaa 2400

acttaagtac caactctcca aaactaaatt tgaacttaaa atattagtat 2450

aaactcataa taaactctgc ctttaaaaaa agataaatat ttcctacgtc 2500

tgttcactga aataattacc aaccccttag caataagcac tccttgcaga 2550

gaggttttat tctctaaata ccattccctt ctcaaaggaa ataaggttgc 2600

ttttcttgta ggaactgtgt ctttgagtta ctaattagtt tatatgagaa 2650

taattcttgc aataaatgaa gaaggaataa aagaaatagg aagccacaaa 2700

tttgtatgga tatttcatga tacacctact ggttaaataa ttgacaaaaa 2750

ccagcagcca aatattagag gtctcctgat ggaagtgtac aataccacct 2800

acaaattatc catgccccaa gtgttaaaac tgaatccatt caagtctttc 2850

taactgaata cttgttttat agaaaatgca tggagaaaag gaatttgttt 2900

aaataacatt atgggattgc aaccagcaaa acataaactg agaaaaagtt 2950

ctatagggca aatcacctgg cttctataac aaataaatgg gaaaaaaatg 3000

aaataaaaag aagagaggga ggaagaaagg gagagagaag aaaagaaaaa 3050

tgaagaaaag taattagaat attttcaaca taaagaaaag acgaatattt 3100

aaggtgacag atatcccaac tacgctgatt tgatctttac aaattatatg 3150

agtgtatgaa tttgtcacat gtatcacccc caaaaaaaga gaaaaagaaa 3200

aatagaagac atataaatta aatgagacga gacatgtcga ccaaaaggaa 3250

tgtgtgggtc ttgtttggat cctgactcaa attaagaaaa aataaaacta 3300

cctacgaaat actaagaaaa atttgtatac taatattaag aaattgttgt 3350

gtgttttgga tataagtgat agtttattgt agtgatgttt ttataaaagc 3400

aaaaggatat tcactttcag cgcttatact gaagtattag attaaagctt 3450

attaacgta 3459

<210> 42
<211> 515
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Leu Leu Trp Ala Ser Leu Leu Ala Phe Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15

Gln Ser Ala Ala Ala His Lys Pro Val Ile Ser Val His Pro Pro
20 25 30

Trp Thr Thr Phe Phe Lys Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Asn
35 40 45

Gly Phe Gln Phe Tyr Ala Thr Glu Lys Thr Thr Trp Tyr His Arg
50 55 60

His Tyr Trp Gly Glu Lys Leu Thr Leu Thr Pro Gly Asn Thr Leu
65 70 75

Glu Val Arg Glu Ser Gly Leu Tyr Arg Cys Gln Ala Arg Gly Ser
80 85 90

Pro Arg Ser Asn Pro Val Arg Leu Leu Phe Ser Ser Asp Ser Leu
95 100 105

Ile Leu Gln Ala Pro Tyr Ser Val Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val
110 115 120

Leu Arg Cys His Arg Arg Arg Lys Glu Lys Leu Thr Ala Val Lys
125 130 135

Tyr Thr Trp Asn Gly Asn Ile Leu Ser Ile Ser Asn Lys Ser Trp
140 145 150

Asp Leu Leu Ile Pro Gln Ala Ser Ser Asn Asn Asn Gly Asn Tyr
155 160 165

Arg Cys Ile Gly Tyr Gly Asp Glu Asn Asp Val Phe Arg Ser Asn

```
                170                 175                 180

Phe Lys Ile Ile Lys Ile Gln Glu Leu Phe Pro His Pro Glu Leu
                185                 190                 195

Lys Ala Thr Asp Ser Gln Pro Thr Glu Gly Asn Ser Val Asn Leu
                200                 205                 210

Ser Cys Glu Thr Gln Leu Pro Pro Glu Arg Ser Asp Thr Pro Leu
                215                 220                 225

His Phe Asn Phe Phe Arg Asp Gly Glu Val Ile Leu Ser Asp Trp
                230                 235                 240

Ser Thr Tyr Pro Glu Leu Gln Leu Pro Thr Val Trp Arg Glu Asn
                245                 250                 255

Ser Gly Ser Tyr Trp Cys Gly Ala Glu Thr Val Arg Gly Asn Ile
                260                 265                 270

His Lys His Ser Pro Ser Leu Gln Ile His Val Gln Arg Ile Pro
                275                 280                 285

Val Ser Gly Val Leu Leu Glu Thr Gln Pro Ser Gly Gly Gln Ala
                290                 295                 300

Val Glu Gly Glu Met Leu Val Leu Val Cys Ser Val Ala Glu Gly
                305                 310                 315

Thr Gly Asp Thr Thr Phe Ser Trp His Arg Glu Asp Met Gln Glu
                320                 325                 330

Ser Leu Gly Arg Lys Thr Gln Arg Ser Leu Arg Ala Glu Leu Glu
                335                 340                 345

Leu Pro Ala Ile Arg Gln Ser His Ala Gly Gly Tyr Tyr Cys Thr
                350                 355                 360

Ala Asp Asn Ser Tyr Gly Pro Val Gln Ser Met Val Leu Asn Val
                365                 370                 375

Thr Val Arg Glu Thr Pro Gly Asn Arg Asp Gly Leu Val Ala Ala
                380                 385                 390

Gly Ala Thr Gly Gly Leu Leu Ser Ala Leu Leu Leu Ala Val Ala
                395                 400                 405

Leu Leu Phe His Cys Trp Arg Arg Arg Lys Ser Gly Val Gly Phe
                410                 415                 420

Leu Gly Asp Glu Thr Arg Leu Pro Pro Ala Pro Gly Pro Gly Glu
                425                 430                 435

Ser Ser His Ser Ile Cys Pro Ala Gln Val Glu Leu Gln Ser Leu
                440                 445                 450

Tyr Val Asp Val His Pro Lys Lys Gly Asp Leu Val Tyr Ser Glu
                455                 460                 465

Ile Gln Thr Thr Gln Leu Gly Glu Glu Glu Glu Ala Asn Thr Ser
                470                 475                 480

Arg Thr Leu Leu Glu Asp Lys Asp Val Ser Val Val Tyr Ser Glu
                485                 490                 495

Val Lys Thr Gln His Pro Asp Asn Ser Ala Gly Lys Ile Ser Ser
                500                 505                 510
```

Lys Asp Glu Glu Ser
515

<210> 43
<211> 1933
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 43
acacacccac aggacctgca gctgaacgaa gttgaagaca actcaggaga 50

tctgttggaa agagaacgat agaggaaaat atatgaatgt tgccatcttt 100

agttccctgt gttgggaaaa ctgtctggct gtacctccaa gcctggccaa 150

accctgtgtt tgaaggagat gccctgactc tgcgatgtca gggatggaag 200

aatacaccac tgtctcaggt gaagttctac agagatggaa aattccttca 250

tttctctaag gaaaaccaga ctctgtccat gggagcagca acagtgcaga 300

gccgtggcca gtacagctgc tctgggcagg tgatgtatat tccacagaca 350

ttcacacaaa cttcagagac tgccatggtt caagtccaag agctgtttcc 400

acctcctgtg ctgagtgcca tcccctctcc tgagccccga gagggtagcc 450

tggtgaccct gagatgtcag acaaagctgc acccccctgag gtcagccttg 500

aggctccttt tctccttcca caaggacggc cacaccttgc aggacagggg 550

ccctcaccca gaactctgca tcccgggagc caaggaggga gactctgggc 600

tttactggtg tgaggtggcc cctgagggtg gccaggtcca gaagcagagc 650

ccccagctgg aggtcagagt gcaggctcct gtatcccgtc ctgtgctcac 700

tctgcaccac gggcctgctg accctgctgt gggggacatg gtgcagctcc 750

tctgtgaggc acagaggggc tcccctccga tcctgtattc cttctacctt 800

gatgagaaga ttgtggggaa ccactcagct ccctgtggtg gaaccacctc 850

cctcctcttc ccagtgaagt cagaacagga tgctgggaac tactcctgcg 900

aggctgagaa cagtgtctcc agagagagga gtgagcccaa gaagctgtct 950

ctgaagggtt ctcaagtctt gttcactccc gccagcaact ggctggttcc 1000

ttggcttcct gcgagcctgc ttggcctgat ggttattgct gctgcacttc 1050

tggtttatgt gagatcctgg agaaaagctg ggccccttcc atcccagata 1100

ccacccacag ctccaggtgg agagcagtgc ccactatatg ccaacgtgca 1150

tcaccagaaa gggaaagatg aaggtgttgt ctactctgtg gtgcatagaa 1200

cctcaaagag gagtgaagga cagttctatc atctgtgcgg aggtgagatg 1250

cctgcagccc agtgaggttt catccacgga ggtgaatatg agaagcagga 1300

ctctccaaga acccctagc gactgtgagg aggttctctg ctagtgatgg 1350

tgttctccta tcaacacacg cccacccca gtctccagtg ctcctcagga 1400

agacagtggg gtcctcaact ctttctgtgg gtccttcagt tcccaagccc 1450

agcatcacag agccccctga gcccttgtcc tggtcaggag cacctgaacc 1500

ctgggttctt ttcttagcag aagaccaacc aatggaatgg gaagggagat 1550

gctcccacca acacacacac ttaggttcaa tcagtgacac tggacacata 1600

agccacagat gtcttctttc catacaagca tgttagttcg ccccaatata 1650

catatatata tgaaatagtc atgtgccgca taacaacatt tcagtcagtg 1700

atagactgca tacacaacag tggtcccata agactgtaat ggagtttaaa 1750

aattcctact gcctagtgat atcatagttg ccttaacatc ataacacaac 1800

acatttctca cgcgtttgtg gtgatgctgg tacaaacaag ctacagcgcc 1850

gctagtcata tacaaatata gcacatacaa ttatgtacag tacactatac 1900

ttgataatga taataaacaa ctatgttact ggt 1933

<210> 44
<211> 392
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Leu Pro Ser Leu Val Pro Cys Val Gly Lys Thr Val Trp Leu
1 5 10 15

Tyr Leu Gln Ala Trp Pro Asn Pro Val Phe Glu Gly Asp Ala Leu
20 25 30

Thr Leu Arg Cys Gln Gly Trp Lys Asn Thr Pro Leu Ser Gln Val
35 40 45

Lys Phe Tyr Arg Asp Gly Lys Phe Leu His Phe Ser Lys Glu Asn
50 55 60

Gln Thr Leu Ser Met Gly Ala Ala Thr Val Gln Ser Arg Gly Gln
65 70 75

Tyr Ser Cys Ser Gly Gln Val Met Tyr Ile Pro Gln Thr Phe Thr
80 85 90

Gln Thr Ser Glu Thr Ala Met Val Gln Val Gln Glu Leu Phe Pro
95 100 105

Pro Pro Val Leu Ser Ala Ile Pro Ser Pro Glu Pro Arg Glu Gly
110 115 120

Ser Leu Val Thr Leu Arg Cys Gln Thr Lys Leu His Pro Leu Arg
125 130 135

Ser Ala Leu Arg Leu Leu Phe Ser Phe His Lys Asp Gly His Thr
140 145 150

Leu Gln Asp Arg Gly Pro His Pro Glu Leu Cys Ile Pro Gly Ala
155 160 165

Lys Glu Gly Asp Ser Gly Leu Tyr Trp Cys Glu Val Ala Pro Glu
170 175 180

Gly Gly Gln Val Gln Lys Gln Ser Pro Gln Leu Glu Val Arg Val
185 190 195

Gln Ala Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu His His Gly Pro
200 205 210

Ala Asp Pro Ala Val Gly Asp Met Val Gln Leu Leu Cys Glu Ala

215 220 225

Gln Arg Gly Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Phe Tyr Leu Asp Glu
230 235 240

Lys Ile Val Gly Asn His Ser Ala Pro Cys Gly Gly Thr Thr Ser
245 250 255

Leu Leu Phe Pro Val Lys Ser Glu Gln Asp Ala Gly Asn Tyr Ser
260 265 270

Cys Glu Ala Glu Asn Ser Val Ser Arg Glu Arg Ser Glu Pro Lys
275 280 285

Lys Leu Ser Leu Lys Gly Ser Gln Val Leu Phe Thr Pro Ala Ser
290 295 300

Asn Trp Leu Val Pro Trp Leu Pro Ala Ser Leu Leu Gly Leu Met
305 310 315

Val Ile Ala Ala Ala Leu Leu Val Tyr Val Arg Ser Trp Arg Lys
320 325 330

Ala Gly Pro Leu Pro Ser Gln Ile Pro Pro Thr Ala Pro Gly Gly
335 340 345

Glu Gln Cys Pro Leu Tyr Ala Asn Val His His Gln Lys Gly Lys
350 355 360

Asp Glu Gly Val Val Tyr Ser Val Val His Arg Thr Ser Lys Arg
365 370 375

Ser Glu Gly Gln Phe Tyr His Leu Cys Gly Gly Glu Met Pro Ala
380 385 390

Ala Gln

<210> 45
<211> 900
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 45
ccattgttct caacattcta gctgctcttg ctgcatttgc tctggaattc 50

ttgtagagat attacttgtc cttccaggct gttctttctg tagctccctt 100

gttttctttt tgtgatcatg ttgcagatgg ctgggcagtg ctcccaaaat 150

gaatattttg acagtttgtt gcatgcttgc ataccttgtc aacttcgatg 200

ttcttctaat actcctcctc taacatgtca gcgttattgt aatgcaagtg 250

tgaccaattc agtgaaagga acgaatgcga ttctctggac ctgtttggga 300

ctgagcttaa taatttcttt ggcagttttc gtgctaatgt ttttgctaag 350

gaagataagc tctgaaccat taaaggacga gtttaaaaac acaggatcag 400

gtctcctggg catggctaac attgacctgg aaaagagcag gactggtgat 450

gaaattattc ttccgagagg cctcgagtac acggtggaag aatgcacctg 500

tgaagactgc atcaagagca aaccgaaggt cgactctgac cattgctttc 550

cactcccagc tatggaggaa ggcgcaacca ttcttgtcac cacgaaaacg 600

aatgactatt gcaagagcct gccagctgct ttgagtgcta cggagataga 650

gaaatcaatt tctgctaggt aattaaccat ttcgactcga gcagtgccac 700

tttaaaaatc ttttgtcaga atagatgatg tgtcagatct ctttaggatg 750

actgtatttt tcagttgccg atacagcttt ttgtcctcta actgtggaaa 800

ctctttatgt tagatatatt tctctaggtt actgttggga gcttaatggt 850

agaaacttcc ttggtttcat gattaaagtc ttttttttttc ctgaaaaaaa 900

<210> 46
<211> 184
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Leu Gln Met Ala Gly Gln Cys Ser Gln Asn Glu Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Ser Leu Leu His Ala Cys Ile Pro Cys Gln Leu Arg Cys Ser Ser
20 25 30

Asn Thr Pro Pro Leu Thr Cys Gln Arg Tyr Cys Asn Ala Ser Val
35 40 45

Thr Asn Ser Val Lys Gly Thr Asn Ala Ile Leu Trp Thr Cys Leu
50 55 60

Gly Leu Ser Leu Ile Ile Ser Leu Ala Val Phe Val Leu Met Phe
65 70 75

Leu Leu Arg Lys Ile Ser Ser Glu Pro Leu Lys Asp Glu Phe Lys
80 85 90

Asn Thr Gly Ser Gly Leu Leu Gly Met Ala Asn Ile Asp Leu Glu
95 100 105

Lys Ser Arg Thr Gly Asp Glu Ile Ile Leu Pro Arg Gly Leu Glu
110 115 120

Tyr Thr Val Glu Glu Cys Thr Cys Glu Asp Cys Ile Lys Ser Lys
125 130 135

Pro Lys Val Asp Ser Asp His Cys Phe Pro Leu Pro Ala Met Glu
140 145 150

Glu Gly Ala Thr Ile Leu Val Thr Thr Lys Thr Asn Asp Tyr Cys
155 160 165

Lys Ser Leu Pro Ala Ala Leu Ser Ala Thr Glu Ile Glu Lys Ser
170 175 180

Ile Ser Ala Arg

<210> 47
<211> 337
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> No seguro
<222> 106, 108, 168, 298
<223> Base desconocida

<400> 47

cttcccagcc ttcggaacta tggagcccgc actctccagt tcatcaccac 50

cccagcatcc ctactcttgc atctaacagt ttccgctatt ttgcaccacc 100

tgcctngncc ttatgggcaa ctcaaggaag aaaggaaaga agagatagag 150

gaaaaatgga ttcaacanat gaaagtgttc tttctgacta ctgctgtgtt 200

tacaaacatt ttaatcatca aaacatgctt tatttgatag aaagatcaaa 250

tctgcctttg taaaacaaga gactatttta atcattaaga caacacanat 300

gtttgatttg gaggcgtgtt ctcattcaaa accttgc 337

<210> 48
<211> 1922
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 48
ggagagtctg accaccatgc cacctcctcg cctcctcttc ttcctcctct 50

tcctcacccc catggaagtc aggcccgagg aacctctagt ggtgaaggtg 100

gaagagggag ataacgctgt gctgcagtgc ctcaagggga cctcagatgg 150

ccccactcag cagctgacct ggtctcggga gtccccgctt aaacccttct 200

taaaactcag cctggggctg ccaggcctgg gaatccacat gaggcccctg 250

gccatctggc ttttcatctt caacgtctct caacagatgg ggggcttcta 300

cctgtgccag ccggggcccc cctctgagaa ggcctggcag cctggctgga 350

cagtcaatgt ggagggcagc ggggagctgt tccggtggaa tgtttcggac 400

ctaggtggcc tgggctgtgg cctgaagaac aggtcctcag agggccccag 450

ctccccttcc gggaagctca tgagccccaa gctgtatgtg tgggccaaag 500

accgccctga gatctgggag ggagagcctc cgtgtgtccc accgagggac 550

agcctgaacc agagcctcag ccaggacctc accatggccc ctggctccac 600

actctggctg tcctgtgggg taccccctga ctctgtgtcc aggggccccc 650

tctcctggac ccatgtgcac cccaaggggc ctaagtcatt gctgagccta 700

gagctgaagg acgatcgccc ggccagagat atgtgggtaa tggagacggg 750

tctgttgttg ccccgggcca cagctcaaga cgctggaaag tattattgtc 800

accgtggcaa cctgaccatg tcattccacc tggagatcac tgctcggcca 850

gtactatggc actggctgct gaggactggt ggctggaagg tctcagctgt 900

gactttggct tatctgatct tctgcctgtg ttcccttgtg ggcattcttc 950

atcttcaaag agccctggtc ctgaggagga aaagaaagcg aatgactgac 1000

cccaccagga gattcttcaa agtgacgcct cccccaggaa gcgggcccca 1050

gaaccagtac gggaacgtgc tgtctctccc cacacccacc tcaggcctcg 1100

gacgcgccca gcgttgggcc gcaggcctgg ggggcactgc cccgtcttat 1150

ggaaacccga gcagcgacgt ccaggcggat ggagccttgg ggtcccggag 1200

ccgccgggag tgggcccaga agaagaggaa ggggagggct atgaggaacc 1250

tgacagtgag gaggactccg agttctatga gaacgactcc aaccttgggc 1300

aggaccagct ctcccaggat ggcagcggct acgagaaccc tgaggatgag 1350

cccctgggtc ctgaggatga agactccttc tccaacgctg agtcttatga 1400

gaacgaggat gaagagctga cccagccggt cgccaggaca atggacttcc 1450

tgagccctca tgggtcagcc tgggacccca gccgggaagc aacctccctg 1500

gggtcccagt cctatgagga tatgagagga atcctgtatg cagcccccca 1550

gctccgctcc attcggggcc agcctggacc caatcatgag gaagatgcag 1600

actcttatga gaacatggat aatcccgatg ggccagaccc agcctgggga 1650

ggagggggcc gcatgggcac ctggagcacc aggtgatcct caggtggcca 1700

gcctggatct cctcaagtcc ccaagattca cacctgactc tgaaatctga 1750

agacctcgag cagatgatgc caacctctgg agcaatgttg cttaggatgt 1800

gtgcatgtgt gtaagtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtat 1850

acatgccagt gacacttcca gtccccctttg tattccttaa ataaactcaa 1900

tgagctcttc caaaaaaaaa aa 1922

<210> 49
<211> 467
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

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

Met Glu Val Arg Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu
20 25 30

Gly Asp Asn Ala Val Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly
35 40 45

Pro Thr Gln Gln Leu Thr Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro
50 55 60

Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met
65 70 75

Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln
80 85 90

Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro Gly Pro Pro Ser Glu Lys
95 100 105

Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val Glu Gly Ser Gly Glu
110 115 120

Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly Leu Gly Cys Gly
125 130 135

Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro Ser Gly Lys
140 145 150

Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg Pro Glu
155 160 165

Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Val Pro Pro Arg Asp Ser Leu
170 175 180

Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
185 190 195

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly
200 205 210

Pro Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu
215 220 225

Leu Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp
230 235 240

Val Met Glu Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp
245 250 255

Ala Gly Lys Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe
260 265 270

His Leu Glu Ile Thr Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu
275 280 285

Arg Thr Gly Gly Trp Lys Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu
290 295 300

Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg
305 310 315

Ala Leu Val Leu Arg Arg Lys Arg Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr
320 325 330

Arg Arg Phe Phe Lys Val Thr Pro Pro Pro Gly Ser Gly Pro Gln
335 340 345

Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu Ser Leu Pro Thr Pro Thr Ser Gly
350 355 360

Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala Ala Gly Leu Gly Gly Thr Ala
365 370 375

Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp Val Gln Ala Asp Gly Ala
380 385 390

Leu Gly Ser Arg Ser Arg Arg Glu Trp Ala Gln Lys Lys Arg Lys
395 400 405

Gly Arg Ala Met Arg Asn Leu Thr Val Arg Arg Thr Pro Ser Ser
410 415 420

Met Arg Thr Thr Pro Thr Leu Gly Arg Thr Ser Ser Pro Arg Met
425 430 435

Ala Ala Ala Thr Arg Thr Leu Arg Met Ser Pro Trp Val Leu Arg
440 445 450

Met Lys Thr Pro Ser Pro Thr Leu Ser Leu Met Arg Thr Arg Met
455 460 465

Lys Ser

<210> 50
<211> 3260
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 50
ccatcccata gtgagggaag acacgcggaa acaggcttgc acccagacac 50
gacaccatgc atctcctcgg cccctggctc ctgctcctgg ttctagaata 100
cttggctttc tctgactcaa gtaaatgggt ttttgagcac cctgaaaccc 150
tctacgcctg ggaggggggcc tgcgtctgga tcccctgcac ctacagagcc 200
ctagatggtg acctggaaag cttcatcctg ttccacaatc ctgagtataa 250
caagaacacc tcgaagtttg atgggacaag actctatgaa agcacaaagg 300
atgggaaggt tccttctgag cagaaaaggg tgcaattcct gggagacaag 350
aataagaact gcacactgag tatccacccg gtgcacctca atgacagtgg 400
tcagctgggg ctgaggatgg agtccaagac tgagaaatgg atggaacgaa 450
tacacctcaa tgtctctgaa aggccttttc cacctcatat ccagctccct 500
ccagaaattc aagagtccca ggaagtcact ctgacctgct tgctgaattt 550
ctcctgctat gggtatccga tccaattgca gtggctccta gaggggttc 600
caatgaggca ggctgctgtc acctcgacct ccttgaccat caagtctgtc 650
ttcacccgga gcgagctcaa gttctcccca cagtggagtc accatgggaa 700
gattgtgacc tgccagcttc aggatgcaga tgggaagttc ctctccaatg 750
acacggtgca gctgaacgtg aagcacaccc cgaagttgga gatcaaggtc 800
actcccagtg atgccatagt gagggagggg gactctgtga ccatgacctg 850
cgaggtcagc agcagcaacc cggagtacac gacggtatcc tggctcaagg 900
atgggacctc gctgaagaag cagaatacat tcacgctaaa cctgcgcgaa 950
gtgaccaagg accagagtgg gaagtactgc tgtcaggtct ccaatgacgt 1000
gggcccggga aggtcggaag aagtgttcct gcaagtgcag tatgccccgg 1050
aaccttccac ggttcagatc ctccactcac cggctgtgga gggaagtcaa 1100
gtcgagtttc tttgcatgtc actggccaat cctcttccaa caaattacac 1150
gtggtaccac aatgggaaag aaatgcaggg aaggacagag gagaaagtcc 1200
acatcccaaa gatcctcccc tggcacgctg ggacttattc ctgtgtggca 1250
gaaaacattc ttggtactgg acagaggggc ccgggagctg agctggatgt 1300
ccagtatcct cccaagaagg tgaccacagt gattcaaaac cccatgccga 1350
ttcgagaagg agacacagtg acccctttcct gtaactacaa ttccagtaac 1400
cccagtgtta cccggtatga atggaaaccc catggcgcct gggaggagcc 1450
atcgcttggg gtgctgaaga tccaaaaacgt tggctgggac aacacaacca 1500
tcgcctgcgc acgttgtaat agttggtgct cgtgggcctc ccctgtcgcc 1550
ctgaatgtcc agtatgcccc ccgagacgtg agggtccgga aaatcaagcc 1600
cctttccgag attcactctg gaaactcggt cagcctccaa tgtgacttct 1650

caagcagcca ccccaaagaa gtccagttct tctgggagaa aaatggcagg 1700

cttctgggga aagaaagcca gctgaatttt gactccatct ccccagaaga 1750

tgctgggagt tacagctgct gggtgaacaa ctccatagga cagacagcgt 1800

ccaaggcctg gacacttgaa gtgctgtatg cacccaggag gctgcgtgtg 1850

tccatgagcc cgggggacca agtgatggag gggaagagtg caaccctgac 1900

ctgtgagagt gacgccaacc ctcccgtctc ccactacacc tggtttgact 1950

ggaataacca aagcctcccc caccacagcc agaagctgag attggagccg 2000

gtgaaggtcc agcactcggg tgcctactgg tgccagggga ccaacagtgt 2050

gggcaagggc cgttcgcctc tcagcaccct tactgtctac tatagcccgg 2100

agaccatcgg caggcgagtg gctgtgggac tcgggtcctg cctcgccatc 2150

ctcatcctgg caatctgtgg gctcaagctc cagcgacgtt ggaagaggac 2200

acagagccag caggggcttc aggagaattc cagcggccag agcttctttg 2250

tgaggaataa aaaggttaga agggcccccc tctctgaagg cccccactcc 2300

ctgggatgct acaatccaat gatggaagat ggcattagct acaccaccct 2350

gcgctttccc gagatgaaca taccacgaac tggagatgca gagtcctcag 2400

agatgcagag acctccccgg acctgcgatg acacggtcac ttattcagca 2450

ttgcacaagc gccaagtggg cgactatgag aacgtcattc cagattttcc 2500

agaagatgag gggattcatt actcagagct gatccagttt ggggtcgggg 2550

agcggcctca ggcacaagaa aatgtggact atgtgatcct caaacattga 2600

cactggatgg gctgcagcag aggcactggg ggcagcgggg gccagggaag 2650

tccccgagtt tccccagaca ccgccacatg gcttcctcct gcgtgcatgt 2700

gcgcacacac acacacacac gcacacacac acacacacac tcactgcgga 2750

gaaccttgtg cctggctcag agccagtctt tttggtgagg gtaaccccaa 2800

acctccaaaa ctcctgcccc tgttctcttc cactctcctt gctacccaga 2850

aatcatctaa atacctgccc tgacatgcac acctcccctg ccccaccagc 2900

ccactggcca tctccacccg gagctgctgt gtcctctgga tctgctcgtc 2950

attttccttc ccttctccat ctctctggcc ctctacccct gatctgacat 3000

ccccactcac gaatattatg cccagtttct gcctctgagg gaaagcccag 3050

aaaaggacag aaacgaagta gaaaggggcc cagtcctggc ctggcttctc 3100

ctttggaagt gaggcattgc acggggagac gtacgtatca gcggcccctt 3150

gactctgggg actccgggtt tgagatggac acactggtgt ggattaacct 3200

gccagggaga cagagctcac aataaaaatg gctcagatgc cacttcaaag 3250

aaaaaaaaaa 3260

<210> 51
<211> 847

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

```
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
  1               5                  10                  15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
             20                  25                  30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
             35                  40                  45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
             50                  55                  60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
             65                  70                  75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
             80                  85                  90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
             95                 100                 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
            110                 115                 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
            125                 130                 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
            140                 145                 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
            155                 160                 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
            170                 175                 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
            185                 190                 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
            200                 205                 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
            215                 220                 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
            230                 235                 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
            245                 250                 255

Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
            260                 265                 270

Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser
            275                 280                 285

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
            290                 295                 300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
            305                 310                 315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala
```

320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu
335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu
350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly
365 370 375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His
380 385 390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly
395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys
410 415 420

Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
425 430 435

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser
440 445 450

Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro
455 460 465

Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser
485 490 495

Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val
500 505 510

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val
515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln
530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln
545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp
575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr
605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe
620 625 630

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg
635 640 645

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
650 655 660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
665 670 675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val
680 685 690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val
800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu
815 820 825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
845

<210> 52
<211> 1670
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 52
ccaaccacaa gcaccaaagc agaggggcag gcagcacacc acccagcagc 50

cagagcacca gcccagccat ggtccttgag gtgagtgacc accaagtgct 100

aaatgacgcc gaggttgccg ccctcctgga gaacttcagc tcttcctatg 150

actatggaga aaacgagagt gactcgtgct gtacctcccc gccctgccca 200

caggacttca gcctgaactt cgaccgggcc ttcctgccag ccctctacag 250

cctcctcttt ctgctggggc tgctgggcaa cggcgcggtg gcagccgtgc 300

tgctgagccg gcggacagcc ctgagcagca ccgacacctt cctgctccac 350

ctagctgtag cagacacgct gctggtgctg acactgccgc tctgggcagt 400

ggacgctgcc gtccagtggg tctttggctc tggcctctgc aaagtggcag 450

gtgccctctt caacatcaac ttctacgcag gagccctcct gctggcctgc 500

atcagctttg accgctacct gaacatagtt catgccaccc agctctaccg 550

ccgggggccc ccggcccgcg tgaccctcac ctgcctggct gtctgggggc 600

tctgcctgct tttcgccctc ccagacttca tcttcctgtc ggcccaccac 650

gacgagcgcc tcaacgccac ccactgccaa tacaacttcc cacaggtggg 700

ccgcacggct ctgcgggtgc tgcagctggt ggctggcttt ctgctgcccc 750

tgctggtcat ggcctactgc tatgcccaca tcctggccgt gctgctggtt 800

tccaggggcc agcggcgcct gcgggccatg cggctggtgg tggtggtcgt 850

ggtggccttt gccctctgct ggacccccta tcacctggtg gtgctggtgg 900

acatcctcat ggacctgggc gctttggccc gcaactgtgg ccgagaaagc 950

agggtagacg tggccaagtc ggtcacctca ggcctgggct acatgcactg 1000

ctgcctcaac ccgctgctct atgcctttgt aggggtcaag ttccgggagc 1050

ggatgtggat gctgctcttg cgcctgggct gccccaacca gagagggctc 1100

cagaggcagc catcgtcttc ccgccgggat tcatcctggt ctgagacctc 1150

agaggcctcc tactcgggct tgtgaggccg gaatccgggc tccctttcg 1200

cccacagtct gacttccccg cattccaggc tcctccctcc ctctgccggc 1250

tctggctctc cccaatatcc tcgctcccgg gactcactgg cagccccagc 1300

accaccaggt ctcccgggaa gccaccctcc cagctctgag gactgcacca 1350

ttgctgctcc ttagctgcca agccccatcc tgccgcccga ggtggctgcc 1400

tggagcccca ctgcccttct catttggaaa ctaaaacttc atcttcccca 1450

agtgcgggga gtacaaggca tggcgtagag ggtgctgccc catgaagcca 1500

cagcccaggc ctccagctca gcagtgactg tggccatggt ccccaagacc 1550

tctatatttg ctcttttatt tttatgtcta aaatcctgct taaaactttt 1600

caataaacaa gatcgtcagg accaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1650

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1670

<210> 53
<211> 368
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

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

Phe Leu Leu His Leu Ala Val Ala Asp Thr Leu Leu Val Leu Thr
95 100 105

Leu Pro Leu Trp Ala Val Asp Ala Ala Val Gln Trp Val Phe Gly
110 115 120

Ser Gly Leu Cys Lys Val Ala Gly Ala Leu Phe Asn Ile Asn Phe
125 130 135

Tyr Ala Gly Ala Leu Leu Leu Ala Cys Ile Ser Phe Asp Arg Tyr
140 145 150

Leu Asn Ile Val His Ala Thr Gln Leu Tyr Arg Arg Gly Pro Pro
155 160 165

Ala Arg Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Val Trp Gly Leu Cys Leu
170 175 180

Leu Phe Ala Leu Pro Asp Phe Ile Phe Leu Ser Ala His His Asp
185 190 195

Glu Arg Leu Asn Ala Thr His Cys Gln Tyr Asn Phe Pro Gln Val
200 205 210

Gly Arg Thr Ala Leu Arg Val Leu Gln Leu Val Ala Gly Phe Leu
215 220 225

Leu Pro Leu Leu Val Met Ala Tyr Cys Tyr Ala His Ile Leu Ala
230 235 240

Val Leu Leu Val Ser Arg Gly Gln Arg Arg Leu Arg Ala Met Arg
245 250 255

Leu Val Val Val Val Val Val Ala Phe Ala Leu Cys Trp Thr Pro
260 265 270

Tyr His Leu Val Val Leu Val Asp Ile Leu Met Asp Leu Gly Ala
275 280 285

Leu Ala Arg Asn Cys Gly Arg Glu Ser Arg Val Asp Val Ala Lys
290 295 300

Ser Val Thr Ser Gly Leu Gly Tyr Met His Cys Cys Leu Asn Pro
305 310 315

Leu Leu Tyr Ala Phe Val Gly Val Lys Phe Arg Glu Arg Met Trp
320 325 330

Met Leu Leu Leu Arg Leu Gly Cys Pro Asn Gln Arg Gly Leu Gln
335 340 345

Arg Gln Pro Ser Ser Ser Arg Arg Asp Ser Ser Trp Ser Glu Thr
350 355 360

Ser Glu Ala Ser Tyr Ser Gly Leu
365

<210> 54
<211> 2109
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 54
gagggaagaa cacaatggat ctggtgctaa aaagatgcct tcttcatttg 50

gctgtgatag gtgctttgct ggctgtgggg gctacaaaag tacccagaaa 100

ccaggactgg cttggtgtct caaggcaact cagaaccaaa gcctggaaca 150

ggcagctgta tccagagtgg acagaagccc agagacttga ctgctggaga 200

ggtggtcaag tgtccctcaa ggtcagtaat gatgggccta cactgattgg 250

tgcaaatgcc tccttctcta ttgccttgaa cttccctgga agccaaaagg 300

tattgccaga tgggcaggtt atctgggtca acaataccat catcaatggg 350

agccaggtgt ggggaggaca gccagtgtat ccccaggaaa ctgacgatgc 400

ctgcatcttc cctgatggtg gaccttgccc atctggctct tggtctcaga 450

agagaagctt tgtttatgtc tggaagacct ggggccaata ctggcaagtt 500

ctagggggcc cagtgtctgg gctgagcatt gggacaggca gggcaatgct 550

gggcacacac accatggaag tgactgtcta ccatcgccgg ggatcccgga 600

gctatgtgcc tcttgctcat tccagctcag ccttcaccat tactgaccag 650

gtgcctttct ccgtgagcgt gtcccagttg cgggccttgg atggagggaa 700

caagcacttc ctgagaaatc agcctctgac ctttgccctc cagctccatg 750

accccagtgg ctatctggct gaagctgacc tctcctacac ctgggacttt 800

ggagacagta gtggaaccct gatctctcgg gcacttgtgg tcactcatac 850

ttacctggag cctggcccag tcactgccca ggtggtcctg caggctgcca 900

ttcctctcac ctcctgtggc tcctccccag ttccaggcac cacagatggg 950

cacaggccaa ctgcagaggc ccctaacacc acagctggcc aagtgcctac 1000

tacagaagtt gtgggtacta cacctggtca ggcgccaact gcagagccct 1050

ctggaaccac atctgtgcag gtgccaacca ctgaagtcat aagcactgca 1100

cctgtgcaga tgccaactgc agagagcaca ggtatgacac ctgagaaggt 1150

gccagtttca gaggtcatgg gtaccacact ggcagagatg tcaactccag 1200

aggctacagg tatgacacct gcagaggtat caattgtggt gctttctgga 1250

accacagctg cacaggtaac aactacagag tgggtggaga ccacagctag 1300

agagctacct atccctgagc ctgaaggtcc agatgccagc tcaatcatgt 1350

ctacggaaag tattacaggt tccctgggcc ccctgctgga tggtacagcc 1400

accttaaggc tggtgaagag acaagtcccc ctggattgtg ttctgtatcg 1450

atatggttcc ttttccgtca ccctggacat tgtccagggt attgaaagtg 1500

ccgagatcct gcaggctgtg ccgtccggtg agggggatgc atttgagctg 1550

actgtgtcct gccaaggcgg gctgcccaag gaagcctgca tggagatctc 1600

atcgccaggg tgccagcccc ctgcccagcg gctgtgccag cctgtgctac 1650

ccagcccagc ctgccagctg gttctgcacc agatactgaa gggtggctcg 1700

gggacatact gcctcaatgt gtctctggct gataccaaca gcctggcagt 1750

ggtcagcacc cagcttatca tgcctggtca agaagcaggc cttgggcagg 1800

ttccgctgat cgtgggcatc ttgctggtgt tgatggctgt ggtccttgca 1850

tctctgatat ataggcgcag acttatgaag caagacttct ccgtacccca 1900

gttgccacat agcagcagtc actggctgcg tctaccccgc atcttctgct 1950

cttgtcccat tggtgagaac agccccctcc tcagtgggca gcaggtctga 2000

gtactctcat atgatgctgt gattttcctg gagttgacag aaacacctat 2050

atttccccca gtcttccctg ggagactact attaactgaa ataaatactc 2100

agagcctga 2109

<210> 55
<211> 661
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

Met Asp Leu Val Leu Lys Arg Cys Leu Leu His Leu Ala Val Ile
1 5 10 15

Gly Ala Leu Leu Ala Val Gly Ala Thr Lys Val Pro Arg Asn Gln
20 25 30

Asp Trp Leu Gly Val Ser Arg Gln Leu Arg Thr Lys Ala Trp Asn
35 40 45

Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp Cys
50 55 60

Trp Arg Gly Gly Gln Val Ser Leu Lys Val Ser Asn Asp Gly Pro
65 70 75

Thr Leu Ile Gly Ala Asn Ala Ser Phe Ser Ile Ala Leu Asn Phe
80 85 90

Pro Gly Ser Gln Lys Val Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Trp Val
95 100 105

Asn Asn Thr Ile Ile Asn Gly Ser Gln Val Trp Gly Gly Gln Pro
110 115 120

Val Tyr Pro Gln Glu Thr Asp Asp Ala Cys Ile Phe Pro Asp Gly
125 130 135

Gly Pro Cys Pro Ser Gly Ser Trp Ser Gln Lys Arg Ser Phe Val
140 145 150

Tyr Val Trp Lys Thr Trp Gly Gln Tyr Trp Gln Val Leu Gly Gly
155 160 165

Pro Val Ser Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Ala Met Leu Gly
170 175 180

Thr His Thr Met Glu Val Thr Val Tyr His Arg Arg Gly Ser Arg
185 190 195

Ser Tyr Val Pro Leu Ala His Ser Ser Ser Ala Phe Thr Ile Thr
200 205 210

Asp Gln Val Pro Phe Ser Val Ser Val Ser Gln Leu Arg Ala Leu
215 220 225

Asp Gly Gly Asn Lys His Phe Leu Arg Asn Gln Pro Leu Thr Phe
230 235 240

```
Ala Leu Gln Leu His Asp Pro Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Ala Asp
                245                 250                 255

Leu Ser Tyr Thr Trp Asp Phe Gly Asp Ser Ser Gly Thr Leu Ile
            260                 265                 270

Ser Arg Ala Leu Val Val Thr His Thr Tyr Leu Glu Pro Gly Pro
        275                 280                 285

Val Thr Ala Gln Val Val Leu Gln Ala Ala Ile Pro Leu Thr Ser
    290                 295                 300

Cys Gly Ser Ser Pro Val Pro Gly Thr Thr Asp Gly His Arg Pro
305                 310                 315

Thr Ala Glu Ala Pro Asn Thr Thr Ala Gly Gln Val Pro Thr Thr
                320                 325                 330

Glu Val Val Gly Thr Thr Pro Gly Gln Ala Pro Thr Ala Glu Pro
            335                 340                 345

Ser Gly Thr Thr Ser Val Gln Val Pro Thr Thr Glu Val Ile Ser
        350                 355                 360

Thr Ala Pro Val Gln Met Pro Thr Ala Glu Ser Thr Gly Met Thr
    365                 370                 375

Pro Glu Lys Val Pro Val Ser Glu Val Met Gly Thr Thr Leu Ala
380                 385                 390

Glu Met Ser Thr Pro Glu Ala Thr Gly Met Thr Pro Ala Glu Val
                395                 400                 405

Ser Ile Val Val Leu Ser Gly Thr Thr Ala Ala Gln Val Thr Thr
            410                 415                 420

Thr Glu Trp Val Glu Thr Thr Ala Arg Glu Leu Pro Ile Pro Glu
        425                 430                 435

Pro Glu Gly Pro Asp Ala Ser Ser Ile Met Ser Thr Glu Ser Ile
    440                 445                 450

Thr Gly Ser Leu Gly Pro Leu Leu Asp Gly Thr Ala Thr Leu Arg
455                 460                 465

Leu Val Lys Arg Gln Val Pro Leu Asp Cys Val Leu Tyr Arg Tyr
                470                 475                 480

Gly Ser Phe Ser Val Thr Leu Asp Ile Val Gln Gly Ile Glu Ser
            485                 490                 495

Ala Glu Ile Leu Gln Ala Val Pro Ser Gly Glu Gly Asp Ala Phe
        500                 505                 510

Glu Leu Thr Val Ser Cys Gln Gly Gly Leu Pro Lys Glu Ala Cys
    515                 520                 525

Met Glu Ile Ser Ser Pro Gly Cys Gln Pro Pro Ala Gln Arg Leu
530                 535                 540

Cys Gln Pro Val Leu Pro Ser Pro Ala Cys Gln Leu Val Leu His
                545                 550                 555

Gln Ile Leu Lys Gly Gly Ser Gly Thr Tyr Cys Leu Asn Val Ser
            560                 565                 570

Leu Ala Asp Thr Asn Ser Leu Ala Val Val Ser Thr Gln Leu Ile
        575                 580                 585
```

Met Pro Gly Gln Glu Ala Gly Leu Gly Gln Val Pro Leu Ile Val
590 595 600

Gly Ile Leu Leu Val Leu Met Ala Val Val Leu Ala Ser Leu Ile
605 610 615

Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys Gln Asp Phe Ser Val Pro Gln Leu
620 625 630

Pro His Ser Ser Ser His Trp Leu Arg Leu Pro Arg Ile Phe Cys
635 640 645

Ser Cys Pro Ile Gly Glu Asn Ser Pro Leu Leu Ser Gly Gln Gln
650 655 660

Val

<210> 56
<211> 2772
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 56
cagtcggcac cggcgaggcc gtgctggaac ccgggcctca gccgcagccg 50

cagcggggcc gacatgacga cagctcccca ggagcccccc gcccggcccc 100

tccaggcggg cagtggagct ggcccggcgc ctgggcgcgc catgcgcagc 150

accacgctcc tggccctgct ggcgctggtc ttgctttact tggtgtctgg 200

tgccctggtg ttccgggccc tggagcagcc ccacgagcag caggcccaga 250

gggagctggg ggaggtccga gagaagttcc tgagggccca tccgtgtgtg 300

agcgaccagg agctgggcct cctcatcaag gaggtggctg atgccctggg 350

agggggtgcg gacccagaaa ccaactcgac cagcaacagc agccactcag 400

cctgggacct gggcagcgcc ttctttttct cagggaccat catcaccacc 450

atcggctatg gcaatgtggc cctgcgcaca gatgccgggc gcctcttctg 500

catcttctat gcgctggtgg ggattccgct gtttgggatc ctactggcag 550

gggtcgggga ccggctgggc tcctccctgc gccatggcat cggtcacatt 600

gaagccatct tcttgaagtg gcacgtgcca ccggagctag taagagtgct 650

gtcggcgatg cttttcctgc tgatcggctg cctgctcttt gtcctcacgc 700

ccacgttcgt gttctgctat atggaggact ggagcaagct ggaggccatc 750

tactttgtca tagtgacgct taccaccgtg ggctttggcg actatgtggc 800

cggcgcggac cccaggcagg actccccggc ctatcagccg ctggtgtggt 850

tctggatcct gctcggcctg gcttacttcg cctcagtgct caccaccatc 900

gggaactggc tgcgagtagt gtcccgccgc actcgggcag agatgggcgg 950

cctcacggct caggctgcca gctggactgg cacagtgaca gcgcgcgtga 1000

cccagcgagc cgggcccgcc gccccgccgc cggagaagga gcagccactg 1050

ctgcctccac cgccctgtcc agcgcagccg ctgggcaggc cccgatcccc 1100

ttcgcccccc gagaaggctc agctgccttc cccgcccacg gcctcggccc 1150

tggattatcc cagcgagaac ctggccttca tcgacgagtc ctcggatacg 1200

cagagcgagc gcggctgccc gctgccccgc gcgccgagag gtcgccgccg 1250

cccaaatccc cccaggaagc ccgtgcggcc ccgcggcccc gggcgtcccc 1300

gagacaaagg cgtgccggtg taggggcagg atccctggcc gggcctctca 1350

agggcttcgt ttctgctctc cccggcatgc ctggcttgtt tgaccaaaga 1400

gccctctttc cacgagactg aagtctgggg aggaggctac agttgcctct 1450

ccgcctcctc cctggccccg gcccttccct cacttccatc catctctaga 1500

ccccccccaag gctttctgtg tcgctgcccc gggcgggtgt atccctcaca 1550

gcacctcacg actgtgcctc aaagcctgca tcaataaatg aaaacggtct 1600

gcaccgctgc gggcgtgacg ctcccggacg cgagtgggtg tggaattgct 1650

ttcctcgggc caccgtgggg gcacctctgg cctcccgtga cccccaggcc 1700

gagggtcccc gggcacccag gtcggtcaag tctcggccct ctcaggcccg 1750

cgtctctgcc tggaggagac tgtgtagggt ccggcgtggg gatcagccgg 1800

gatgggctgc gcgtctccag cctctgcaca cacattggcg ggtggggtgc 1850

agggagggag aggcagggga gagagaatgg catctcgcgt ggagggctgt 1900

cgtttgaact ctcccagcgc gagagaccct gccccgcccc cttcctggag 1950

cgttgactcc cttctcgtct cgaggcctgt ggcgtctggg tccgttgggg 2000

cagaaccatg gaggaaaagc cttcgaaagt gtcgctcaag tcttccgacc 2050

gccaaggctc ggacgaggag agcgtgcata gcgacactcg ggacctgtgg 2100

accacgacca cgctgtccca ggcacagctg aacatgccgc tgtccgaggt 2150

ctgcgagggc ttcgacgagg agggccgcaa cattagcaag acccgcgggt 2200

ggcacagccc ggggcggggc tcgttggacg aggggtacaa ggccagccac 2250

aagccggagg aactggacga gcacgcgctg gtggagctgg agttgcaccg 2300

cggcagctcc atggaaatca atctggggga gaaggacact gcatcccaga 2350

tcgaggccga aaagtcttcc tcaatgtcat cactcaatat tgcgaagcac 2400

atgccccatc gagcctactg ggcagagcag cagagcaggc tgccactgcc 2450

cctgatggaa ctcatggaga atgaagctct ggaaatcctc accaaagccc 2500

tccggagcta ccagttaggg atcggcaggg accacttcct gactaaggag 2550

ctgcagcgat acatcgaagg gctcaagaag cgccggagca agaggctgta 2600

cgtgaattaa aaacgccacc ttgggctcga gcagcgaccc gaaccagccc 2650

cgtgccagcc cggtccccag acccaagcct gaccccatcc gagtggaatt 2700

tgagtcctaa agaaataaaa gagtcgatgc atgaaaaaaa aaaaaaaaaa 2750

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2772

<210> 57
<211> 419
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57

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

305 310 315

Ala Gly Pro Ala Ala Pro Pro Pro Glu Lys Glu Gln Pro Leu Leu
320 325 330

Pro Pro Pro Pro Cys Pro Ala Gln Pro Leu Gly Arg Pro Arg Ser
335 340 345

Pro Ser Pro Pro Glu Lys Ala Gln Leu Pro Ser Pro Pro Thr Ala
350 355 360

Ser Ala Leu Asp Tyr Pro Ser Glu Asn Leu Ala Phe Ile Asp Glu
365 370 375

Ser Ser Asp Thr Gln Ser Glu Arg Gly Cys Pro Leu Pro Arg Ala
380 385 390

Pro Arg Gly Arg Arg Arg Pro Asn Pro Pro Arg Lys Pro Val Arg
395 400 405

Pro Arg Gly Pro Gly Arg Pro Arg Asp Lys Gly Val Pro Val
410 415

<210> 58
<211> 2814
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 58
gccaacactg gccaaacaga agcctccggt cggcctgcag tgcccaagtc 50

ccatggcgag ggcagcccga gtggccgtcg cggctgtagg tccgcatgcc 100

gggcaccgca ccaggcgtct agcagatgga cacaggaaga tccagaagct 150

agtggcacat ctagcaacag agccagatca gaacccagat gctaaactcc 200

tggtggactg cagaggagag ggattcagtc ttctcctgat gtcgattgcg 250

atttctgctg ggagctcaag acgggcgagc tgcccgagat ctcttcgaga 300

taccccaggg gaggaggaga tgggcaggat ttagtaggac aactcggtta 350

ctaatgactt ggcggctggc tgcgaccccc cgggaaatca ggtgcaagca 400

tgtttgcctg taggtacctg agttgacacc gaaggtgcct aaagatgctg 450

agcggcgttt ggttcctcag tgtgttaacc gtggccggga tcttacagac 500

agagagtcgc aaaactgcca aagacatttg caagatccgc tgtctgtgcg 550

aagaaaagga aaacgtactg aatatcaact gtgagaacaa aggatttaca 600

acagttagcc tgctccagcc cccccagtat cgaatctatc agctttttct 650

caatggaaac ctcttgacaa gactgtatcc aaacgaattt gtcaattact 700

ccaacgcggt gactcttcac ctaggtaaca acgggttaca ggagatccga 750

acgggggcat tcagtggcct gaaaactctc aaaagactgc atctcaacaa 800

caacaagctt gagatattga gggaggacac cttcctaggc ctggagagcc 850

tggagtatct ccaggccgac tacaattaca tcagtgccat cgaggctggg 900

gcattcagca aacttaacaa gctcaaagtg ctcatcctga atgacaacct 950

tctgctttca ctgcccagca atgtgttccg ctttgtcctg ctgacccact 1000

tagacctcag ggggaatagg ctaaaagtaa tgcctttgc tggcgtcctt 1050

gaacatattg gagggatcat ggagattcag ctggaggaaa atccatggaa 1100

ttgcacttgt gacttacttc ctctcaaggc ctggctagac accataactg 1150

tttttgtggg agagattgtc tgtgagactc cctttaggtt gcatgggaaa 1200

gacgtgaccc agctgaccag gcaagacctc tgtcccagaa aaagtgccag 1250

tgattccagt cagaggggca gccatgctga cacccacgtc caaaggctgt 1300

cacctacaat gaatcctgct ctcaacccaa ccagggctcc gaaagccagc 1350

cggccgccca aaatgagaaa tcgtccaact ccccgagtga ctgtgtcaaa 1400

ggacaggcaa agttttggac ccatcatggt gtaccagacc aagtctcctg 1450

tgcctctcac ctgtcccagc agctgtgtct gcacctctca gagctcagac 1500

aatggtctga atgtaaactg ccaagaaagg aagttcacta atatctctga 1550

cctgcagccc aaaccgacca gtccaaagaa actctaccta acagggaact 1600

atcttcaaac tgtctataag aatgacctct tagaatacag ttctttggac 1650

ttactgcact taggaaacaa caggattgca gtcattcagg aaggtgcctt 1700

tacaaacctg accagtttac gcagacttta tctgaatggc aattaccttg 1750

aagtgctgta cccttctatg tttgatggac tgcagagctt gcaatatctc 1800

tatttagagt ataatgtcat taaggaaatt aagcctctga cctttgatgc 1850

tttgattaac ctacagctac tgtttctgaa caacaacctt cttcggtcct 1900

tacctgataa tatatttggg gggacggccc taaccaggct gaatctgaga 1950

aacaaccatt tttctcacct gcccgtgaaa ggggttctgg atcagctccc 2000

ggctttcatc cagatagatc tgcaggagaa cccctgggac tgtacctgtg 2050

acatcatggg gctgaaagac tggacagaac atgccaattc ccctgtcatc 2100

attaatgagg tgacttgcga atctcctgct aagcatgcag gggagatact 2150

aaaatttctg gggagggagg ctatctgtcc agacagccca aacttgtcag 2200

atggaaccgt cttgtcaatg aatcacaata cagacacacc tcggtcgctt 2250

agtgtgtctc ctagttccta tcctgaacta cacactgaag ttccactgtc 2300

tgtcttaatt ctgggattgc ttgttgtttt catcttatct gtctgttttg 2350

gggctggttt attcgtcttt gtcttgaaac gccgaaaggg agtgccgagc 2400

gttcccagga ataccaacaa cttagacgta agctcctttc aattacagta 2450

tgggtcttac aacactgaga ctcacgataa aacagacggc catgtctaca 2500

actatatccc cccacctgtg ggtcagatgt gccaaaaccc catctacatg 2550

cagaaggaag gagacccagt agcctattac cgaaacctgc aggagttcaa 2600

gaccagccta gagaacatat ggagaccctg tcttcacaaa aaataaaaaa 2650

gtcagccaag cgtggtggtg tgtgcctgta gttacttagg aggctgaggc 2700

aggacgatcg cttaagccca ggagtttgag gctgtggtga gctacaattg 2750

cgccactgca cgccagcctg gctacagaac gagaccctgc ctctctaaaa 2800

aaaaaaaaaa aaaa 2814

<210> 59
<211> 733
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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

275 280 285

Ser Pro Thr Met Asn Pro Ala Leu Asn Pro Thr Arg Ala Pro Lys
290 295 300

Ala Ser Arg Pro Pro Lys Met Arg Asn Arg Pro Thr Pro Arg Val
305 310 315

Thr Val Ser Lys Asp Arg Gln Ser Phe Gly Pro Ile Met Val Tyr
320 325 330

Gln Thr Lys Ser Pro Val Pro Leu Thr Cys Pro Ser Ser Cys Val
335 340 345

Cys Thr Ser Gln Ser Ser Asp Asn Gly Leu Asn Val Asn Cys Gln
350 355 360

Glu Arg Lys Phe Thr Asn Ile Ser Asp Leu Gln Pro Lys Pro Thr
365 370 375

Ser Pro Lys Lys Leu Tyr Leu Thr Gly Asn Tyr Leu Gln Thr Val
380 385 390

Tyr Lys Asn Asp Leu Leu Glu Tyr Ser Ser Leu Asp Leu Leu His
395 400 405

Leu Gly Asn Asn Arg Ile Ala Val Ile Gln Glu Gly Ala Phe Thr
410 415 420

Asn Leu Thr Ser Leu Arg Arg Leu Tyr Leu Asn Gly Asn Tyr Leu
425 430 435

Glu Val Leu Tyr Pro Ser Met Phe Asp Gly Leu Gln Ser Leu Gln
440 445 450

Tyr Leu Tyr Leu Glu Tyr Asn Val Ile Lys Glu Ile Lys Pro Leu
455 460 465

Thr Phe Asp Ala Leu Ile Asn Leu Gln Leu Leu Phe Leu Asn Asn
470 475 480

Asn Leu Leu Arg Ser Leu Pro Asp Asn Ile Phe Gly Gly Thr Ala
485 490 495

Leu Thr Arg Leu Asn Leu Arg Asn Asn His Phe Ser His Leu Pro
500 505 510

Val Lys Gly Val Leu Asp Gln Leu Pro Ala Phe Ile Gln Ile Asp
515 520 525

Leu Gln Glu Asn Pro Trp Asp Cys Thr Cys Asp Ile Met Gly Leu
530 535 540

Lys Asp Trp Thr Glu His Ala Asn Ser Pro Val Ile Ile Asn Glu
545 550 555

Val Thr Cys Glu Ser Pro Ala Lys His Ala Gly Glu Ile Leu Lys
560 565 570

Phe Leu Gly Arg Glu Ala Ile Cys Pro Asp Ser Pro Asn Leu Ser
575 580 585

Asp Gly Thr Val Leu Ser Met Asn His Asn Thr Asp Thr Pro Arg
590 595 600

Ser Leu Ser Val Ser Pro Ser Ser Tyr Pro Glu Leu His Thr Glu
605 610 615

Val Pro Leu Ser Val Leu Ile Leu Gly Leu Leu Val Val Phe Ile
620 625 630

Leu Ser Val Cys Phe Gly Ala Gly Leu Phe Val Phe Val Leu Lys
635 640 645

Arg Arg Lys Gly Val Pro Ser Val Pro Arg Asn Thr Asn Asn Leu
650 655 660

Asp Val Ser Ser Phe Gln Leu Gln Tyr Gly Ser Tyr Asn Thr Glu
665 670 675

Thr His Asp Lys Thr Asp Gly His Val Tyr Asn Tyr Ile Pro Pro
680 685 690

Pro Val Gly Gln Met Cys Gln Asn Pro Ile Tyr Met Gln Lys Glu
695 700 705

Gly Asp Pro Val Ala Tyr Tyr Arg Asn Leu Gln Glu Phe Lys Thr
710 715 720

Ser Leu Glu Asn Ile Trp Arg Pro Cys Leu His Lys Lys
725 730

<210> 60
<211> 3679
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 60
aaggaggctg ggaggaaaga ggtaagaaag gttagagaac ctacctcaca 50

tctctctggg ctcagaagga ctctgaagat aacaataatt tcagcccatc 100

cactctcctt ccctcccaaa cacacatgtg catgtacaca cacacataca 150

cacacataca ccttcctctc cttcactgaa gactcacagt cactcactct 200

gtgagcaggt catagaaaag gacactaaag ccttaaggac aggcctggcc 250

attacctctg cagctccttt ggcttgttga gtcaaaaaac atgggagggg 300

ccaggcacgg tgactcacac ctgtaatccc agcattttgg gagaccgagg 350

tgagcagatc acttgaggtc aggagttcga gaccagcctg gccaacatgg 400

agaaaccccc atctctacta aaaatacaaa aattagccag gagtggtggc 450

aggtgcctgt aatcccagct actcaggtgg ctgagccagg agaatcgctt 500

gaatccagga ggcggaggat gcagtcagct gagtgcaccg ctgcactcca 550

gcctgggtga cagaatgaga ctctgtctca aacaaacaaa cacgggagga 600

ggggtagata ctgcttctct gcaacctcct taactctgca tcctcttctt 650

ccagggctgc ccctgatggg gcctggcaat gactgagcag gcccagcccc 700

agaggacaag gaagagaagg catattgagg agggcaagaa gtgacgcccg 750

gtgtagaatg actgccctgg gagggtggtt ccttgggccc tggcagggtt 800

gctgaccctt accctgcaaa acacaaagag caggactcca gactctcctt 850

gtgaatggtc ccctgccctg cagctccacc atgaggcttc tcgtggcccc 900

actcttgcta gcttgggtgg ctggtgccac tgccactgtg cccgtggtac 950

cctggcatgt tccctgcccc cctcagtgtg cctgccagat ccggccctgg 1000

tatacgcccc gctcgtccta ccgcgaggct accactgtgg actgcaatga 1050

cctattcctg acggcagtcc ccccggcact ccccgcaggc acacagaccc 1100

tgctcctgca gagcaacagc attgtccgtg tggaccagag tgagctgggc 1150

tacctggcca atctcacaga gctggacctg tcccagaaca gcttttcgga 1200

tgcccgagac tgtgatttcc atgccctgcc ccagctgctg agcctgcacc 1250

tagaggagaa ccagctgacc cggctggagg accacagctt tgcagggctg 1300

gccagcctac aggaactcta tctcaaccac aaccagctct accgcatcgc 1350

ccccagggcc ttttctggcc tcagcaactt gctgcggctg cacctcaact 1400

ccaacctcct gagggccatt gacagccgct ggtttgaaat gctgcccaac 1450

ttggagatac tcatgattgg cggcaacaag gtagatgcca tcctggacat 1500

gaacttccgg cccctggcca acctgcgtag cctggtgcta gcaggcatga 1550

acctgcggga gatctccgac tatgccctgg aggggctgca aagcctggag 1600

agcctctcct tctatgacaa ccagctggcc cgggtgccca ggcgggcact 1650

ggaacaggtg cccgggctca agttcctaga cctcaacaag aacccgctcc 1700

agcgggtagg gccgggggac tttgccaaca tgctgcacct taaggagctg 1750

ggactgaaca acatggagga gctggtctcc atcgacaagt ttgccctggt 1800

gaacctcccc gagctgacca agctggacat caccaataac ccacggctgt 1850

ccttcatcca cccccgcgcc ttccaccacc tgccccagat ggagaccctc 1900

atgctcaaca acaacgctct cagtgccttg caccagcaga cggtggagtc 1950

cctgcccaac ctgcaggagg taggtctcca cggcaacccc atccgctgtg 2000

actgtgtcat ccgctgggcc aatgccacgg gcacccgtgt ccgcttcatc 2050

gagccgcaat ccaccctgtg tgcggagcct ccggacctcc agcgcctccc 2100

ggtccgtgag gtgcccttcc gggagatgac ggaccactgt ttgcccctca 2150

tctccccacg aagcttcccc ccaagcctcc aggtagccag tggagagagc 2200

atggtgctgc attgccgggc actggccgaa cccgaacccg agatctactg 2250

ggtcactcca gctgggcttc gactgacacc tgcccatgca ggcaggaggt 2300

accgggtgta ccccgagggg accctggagc tgcggagggt gacagcagaa 2350

gaggcagggc tatacacctg tgtggcccag aacctggtgg gggctgacac 2400

taagacggtt agtgtggttg tgggccgtgc tctcctccag ccaggcaggg 2450

acgaaggaca ggggctggag ctccgggtgc aggagaccca cccctatcac 2500

atcctgctat cttgggtcac cccacccaac acagtgtcca ccaacctcac 2550

ctggtccagt gcctcctccc tccggggcca gggggccaca gctctggccc 2600

gcctgcctcg gggaacccac agctacaaca ttacccgcct ccttcaggcc 2650

acggagtact gggcctgcct gcaagtggcc tttgctgatg cccacaccca 2700

gttggcttgt gtatgggcca ggaccaaaga ggccacttct tgccacagag 2750

ccttagggga tcgtcctggg ctcattgcca tcctggctct cgctgtcctt 2800

ctcctggcag ctgggctagc ggcccacctt ggcacaggcc aacccaggaa 2850

gggtgtgggt gggaggcggc ctctccctcc agcctgggct ttctggggct 2900

ggagtgcccc ttctgtccgg gttgtgtctg ctcccctcgt cctgccctgg 2950

aatccaggga ggaagctgcc cagatcctca gaaggggaga cactgttgcc 3000

accattgtct caaaattctt gaagctcagc ctgttctcag cagtagagaa 3050

atcactagga ctacttttta ccaaaagaga agcagtctgg gccagatgcc 3100

ctgccaggaa agggacatgg acccacgtgc ttgaggcctg gcagctgggc 3150

caagacagat ggggctttgt ggccctgggg gtgcttctgc agccttgaaa 3200

aagttgccct tacctcctag ggtcacctct gctgccattc tgaggaacat 3250

ctccaaggaa caggagggac tttggctaga gcctcctgcc tccccatctt 3300

ctctctgccc agaggctcct gggcctggct tggctgtccc ctacctgtgt 3350

ccccgggctg cacccttcc tcttctcttt ctctgtacag tctcagttgc 3400

ttgctcttgt gcctcctggg caagggctga aggaggccac tccatctcac 3450

ctcgggggc tgccctcaat gtgggagtga ccccagccag atctgaagga 3500

catttgggag agggatgccc aggaacgcct catctcagca gcctgggctc 3550

ggcattccga agctgacttt ctataggcaa ttttgtacct ttgtggagaa 3600

atgtgtcacc tcccccaacc cgattcactc ttttctcctg ttttgtaaaa 3650

aataaaaata aataataaca ataaaaaaa 3679

<210> 61
<211> 713
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

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

```
Ser Asp Ala Arg Asp Cys Asp Phe His Ala Leu Pro Gln Leu Leu
                110                 115                 120

Ser Leu His Leu Glu Glu Asn Gln Leu Thr Arg Leu Glu Asp His
                125                 130                 135

Ser Phe Ala Gly Leu Ala Ser Leu Gln Glu Leu Tyr Leu Asn His
                140                 145                 150

Asn Gln Leu Tyr Arg Ile Ala Pro Arg Ala Phe Ser Gly Leu Ser
                155                 160                 165

Asn Leu Leu Arg Leu His Leu Asn Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile
                170                 175                 180

Asp Ser Arg Trp Phe Glu Met Leu Pro Asn Leu Glu Ile Leu Met
                185                 190                 195

Ile Gly Gly Asn Lys Val Asp Ala Ile Leu Asp Met Asn Phe Arg
                200                 205                 210

Pro Leu Ala Asn Leu Arg Ser Leu Val Leu Ala Gly Met Asn Leu
                215                 220                 225

Arg Glu Ile Ser Asp Tyr Ala Leu Glu Gly Leu Gln Ser Leu Glu
                230                 235                 240

Ser Leu Ser Phe Tyr Asp Asn Gln Leu Ala Arg Val Pro Arg Arg
                245                 250                 255

Ala Leu Glu Gln Val Pro Gly Leu Lys Phe Leu Asp Leu Asn Lys
                260                 265                 270

Asn Pro Leu Gln Arg Val Gly Pro Gly Asp Phe Ala Asn Met Leu
                275                 280                 285

His Leu Lys Glu Leu Gly Leu Asn Asn Met Glu Glu Leu Val Ser
                290                 295                 300

Ile Asp Lys Phe Ala Leu Val Asn Leu Pro Glu Leu Thr Lys Leu
                305                 310                 315

Asp Ile Thr Asn Asn Pro Arg Leu Ser Phe Ile His Pro Arg Ala
                320                 325                 330

Phe His His Leu Pro Gln Met Glu Thr Leu Met Leu Asn Asn Asn
                335                 340                 345

Ala Leu Ser Ala Leu His Gln Gln Thr Val Glu Ser Leu Pro Asn
                350                 355                 360

Leu Gln Glu Val Gly Leu His Gly Asn Pro Ile Arg Cys Asp Cys
                365                 370                 375

Val Ile Arg Trp Ala Asn Ala Thr Gly Thr Arg Val Arg Phe Ile
                380                 385                 390

Glu Pro Gln Ser Thr Leu Cys Ala Glu Pro Pro Asp Leu Gln Arg
                395                 400                 405

Leu Pro Val Arg Glu Val Pro Phe Arg Glu Met Thr Asp His Cys
                410                 415                 420

Leu Pro Leu Ile Ser Pro Arg Ser Phe Pro Pro Ser Leu Gln Val
                425                 430                 435

Ala Ser Gly Glu Ser Met Val Leu His Cys Arg Ala Leu Ala Glu
```

440 445 450

Pro Glu Pro Glu Ile Tyr Trp Val Thr Pro Ala Gly Leu Arg Leu
455 460 465

Thr Pro Ala His Ala Gly Arg Arg Tyr Arg Val Tyr Pro Glu Gly
470 475 480

Thr Leu Glu Leu Arg Arg Val Thr Ala Glu Glu Ala Gly Leu Tyr
485 490 495

Thr Cys Val Ala Gln Asn Leu Val Gly Ala Asp Thr Lys Thr Val
500 505 510

Ser Val Val Val Gly Arg Ala Leu Leu Gln Pro Gly Arg Asp Glu
515 520 525

Gly Gln Gly Leu Glu Leu Arg Val Gln Glu Thr His Pro Tyr His
530 535 540

Ile Leu Leu Ser Trp Val Thr Pro Pro Asn Thr Val Ser Thr Asn
545 550 555

Leu Thr Trp Ser Ser Ala Ser Ser Leu Arg Gly Gln Gly Ala Thr
560 565 570

Ala Leu Ala Arg Leu Pro Arg Gly Thr His Ser Tyr Asn Ile Thr
575 580 585

Arg Leu Leu Gln Ala Thr Glu Tyr Trp Ala Cys Leu Gln Val Ala
590 595 600

Phe Ala Asp Ala His Thr Gln Leu Ala Cys Val Trp Ala Arg Thr
605 610 615

Lys Glu Ala Thr Ser Cys His Arg Ala Leu Gly Asp Arg Pro Gly
620 625 630

Leu Ile Ala Ile Leu Ala Leu Ala Val Leu Leu Leu Ala Ala Gly
635 640 645

Leu Ala Ala His Leu Gly Thr Gly Gln Pro Arg Lys Gly Val Gly
650 655 660

Gly Arg Arg Pro Leu Pro Pro Ala Trp Ala Phe Trp Gly Trp Ser
665 670 675

Ala Pro Ser Val Arg Val Val Ser Ala Pro Leu Val Leu Pro Trp
680 685 690

Asn Pro Gly Arg Lys Leu Pro Arg Ser Ser Glu Gly Glu Thr Leu
695 700 705

Leu Pro Pro Leu Ser Gln Asn Ser
710

<210> 62
<211> 1186
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> No seguro
<222> 54-55
<223> Base desconocida

<400> 62
ggcacgagcc ggcaagccga gctagggtga aaactggggg cgcaccagga 50

tgtnngacag aaaagcagaa gatgagactc tgttcattca cttttcctag 100

gcccatcctg tggtcatctt tccccctccc atcatacctc ctccttcctg 150

gagcctctgc cggcttggct gtaatggtgg cacttacctg gatatttcag 200

tgggaggatg aaaggcgaga ctcaccctac gcggtgggac agatggggag 250

aggaaaaagg cagagatggc caggagaggg gtgcaggaca aaccagagag 300

gttgggtcag gggaaaaggg tggggagaaa gaggggtgca ggccctgcag 350

gccggttagc cagcagctgc ggcctccccg ggcccttggc atccaacttc 400

gcagacaggg taccagcctc ctggtgtgta tcataggatt tgttcacata 450

gtgttatgca tgatcttcgt aaggttaaga agccgtggtg gtgcaccatg 500

acatccaacc cgtatatata aagataaata tatatatata tgtatgtaaa 550

ttatggcacg agaaattata gcactgaggg ccctgctgcc ctgctggacc 600

aagcaaaact aagccttttg gtttgggtat tatgtttcgt tttgttattt 650

gtttgttttt gtggcttgtc ttatgtcgtg atagcacaag tgccagtcgg 700

attgctctgt attacagaat agtgttttta attcatcaat gttctagtta 750

atgtctacct cagcacctcc tcttagccta attttaggag gttgcccaat 800

tttgtttctt caattttact ggttactttt ttgtacaaat caatctcttt 850

ctctctttct ctcctcccca cctctcaccc ttgccctctc catctccctc 900

tcccgccctc ccctcctccc tctggctccc cgtctcattt ctgtccactc 950

cattctctct ccctctctcc tgcctcctgc tgccccctcc ccagcccact 1000

tccccgagtt gtgcttgccg ctccttatct gttctagttc cgaagcagtt 1050

tcactcgaag ttgtgcagtc ctggttgcag ctttccgcat ctgccttcgt 1100

ttcgtgtaga ttgacgcgtt tctttgtaat ttcagtgttt ctgacaagat 1150

ttaaaaaaaa aaaaaggaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1186

<210> 63
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 63

Met Ser Thr Ser Ala Pro Pro Leu Ser Leu Ile Leu Gly Gly Cys
1 5 10 15

Pro Ile Leu Phe Leu Gln Phe Tyr Trp Leu Leu Phe Cys Thr Asn
20 25 30

Gln Ser Leu Ser Leu Phe Leu Ser Ser Pro Pro Leu Thr Leu Ala
35 40 45

Leu Ser Ile Ser Leu Ser Arg Pro Pro Leu Leu Pro Leu Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Ile Ser Val His Ser Ile Leu Ser Pro Ser Leu Leu Pro
65 70 75

Pro Ala Ala Pro Ser Pro Ala His Phe Pro Glu Leu Cys Leu Pro
80 85 90

Leu Leu Ile Cys Ser Ser Ser Glu Ala Val Ser Leu Glu Val Val
95 100 105

Gln Ser Trp Leu Gln Leu Ser Ala Ser Ala Phe Val Ser Cys Arg
110 115 120

Leu Thr Arg Phe Phe Val Ile Ser Val Phe Leu Thr Arg Phe Lys
125 130 135

Lys Lys Lys Arg Lys Lys Lys Lys Lys Lys
140 145

<210> 64
<211> 1685
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 64
cccacgcgtc cgcacctcgg ccccgggctc cgaagcggct cgggggcgcc 50

ctttcggtca acatcgtagt ccacccccctc cccatcccca gcccccgggg 100

attcaggctc gccagcgccc agccagggag ccggccggga agcgcgatgg 150

gggccccagc cgcctcgctc ctgctcctgc tcctgctgtt cgcctgctgc 200

tgggcgcccg gcggggccaa cctctcccag gacgacagcc agccctggac 250

atctgatgaa acagtggtgg ctggtggcac cgtggtgctc aagtgccaag 300

tgaaagatca cgaggactca tccctgcaat ggtctaaccc tgctcagcag 350

actctctact ttggggagaa gagagccctt cgagataatc gaattcagct 400

ggttacctct acgccccacg agctcagcat cagcatcagc aatgtggccc 450

tggcagacga gggcgagtac acctgctcaa tcttcactat gcctgtgcga 500

actgccaagt ccctcgtcac tgtgctagga attccacaga agcccatcat 550

cactggttat aaatcttcat tacgggaaaa agacacagcc accctaaact 600

gtcagtcttc tgggagcaag cctgcagccc ggctcacctg gagaaagggt 650

gaccaagaac tccacggaga accaacccgc atacaggaag atcccaatgg 700

taaaaccttc actgtcagca gctcggtgac attccaggtt acccgggagg 750

atgatggggc gagcatcgtg tgctctgtga accatgaatc tctaaaggga 800

gctgacagat ccacctctca acgcattgaa gttttataca caccaactgc 850

gatgattagg ccagaccctc cccatcctcg tgagggccag aagctgttgc 900

tacactgtga gggtcgcggc aatccagtcc cccagcagta cctatgggag 950

aaggagggca gtgtgccacc cctgaagatg acccaggaga gtgccctgat 1000

cttccctttc ctcaacaaga gtgacagtgg cacctacggc tgcacagcca 1050

ccagcaacat gggcagctac aaggcctact acaccctcaa tgttaatgac 1100

cccagtccgg tgccctcctc ctccagcacc taccacgcca tcatcggtgg 1150

gatcgtggct ttcattgtct tcctgctgct catcatgctc atcttccttg 1200

gccactactt gatccggcac aaaggaacct acctgacaca tgaggcaaaa 1250

ggctccgacg atgctccaga cgcggacacg gccatcatca atgcagaagg 1300

cgggcagtca ggaggggacg acaagaagga atatttcatc tagaggcgcc 1350

tgcccacttc ctgcgccccc caggggccct gtggggactg ctggggccgt 1400

caccaacccg gacttgtaca gagcaaccgc agggccgccc ctcccgcttg 1450

ctccccagcc cacccacccc cctgtacaga atgtctgctt tgggtgcggt 1500

tttgtactcg gtttggaatg gggagggagg agggcggggg gaggggaggg 1550

ttgccctcag ccctttccgt ggcttctctg catttgggtt attattattt 1600

ttgtaacaat cccaaatcaa atctgtctcc aggctggaga ggcaggagcc 1650

ctggggtgag aaaagcaaaa aacaaacaaa aaaca 1685

<210> 65
<211> 398
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

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

Val Asn His Glu Ser Leu Lys Gly Ala Asp Arg Ser Thr Ser Gln
215 220 225

Arg Ile Glu Val Leu Tyr Thr Pro Thr Ala Met Ile Arg Pro Asp
230 235 240

Pro Pro His Pro Arg Glu Gly Gln Lys Leu Leu Leu His Cys Glu
245 250 255

Gly Arg Gly Asn Pro Val Pro Gln Gln Tyr Leu Trp Glu Lys Glu
260 265 270

Gly Ser Val Pro Pro Leu Lys Met Thr Gln Glu Ser Ala Leu Ile
275 280 285

Phe Pro Phe Leu Asn Lys Ser Asp Ser Gly Thr Tyr Gly Cys Thr
290 295 300

Ala Thr Ser Asn Met Gly Ser Tyr Lys Ala Tyr Tyr Thr Leu Asn
305 310 315

Val Asn Asp Pro Ser Pro Val Pro Ser Ser Ser Ser Thr Tyr His
320 325 330

Ala Ile Ile Gly Gly Ile Val Ala Phe Ile Val Phe Leu Leu Leu
335 340 345

Ile Met Leu Ile Phe Leu Gly His Tyr Leu Ile Arg His Lys Gly
350 355 360

Thr Tyr Leu Thr His Glu Ala Lys Gly Ser Asp Asp Ala Pro Asp
365 370 375

Ala Asp Thr Ala Ile Ile Asn Ala Glu Gly Gly Gln Ser Gly Gly
380 385 390

Asp Asp Lys Lys Glu Tyr Phe Ile
395

<210> 66
<211> 681
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 66
cttggatctg cctgccaggc catcctgggc gctgcaggaa gcaacatgac 50

ttaggtaact gcccagaggt gcaccagaca tgatgcagca gccgcgagtg 100

gagacagata ccatcggggc tggcgagggg ccacagcagg cagtgcctgg 150

tcagcctggg tcacgaggca tggctgggtg cgctggtggg tgagccacat 200

gcccccgagc tggatccagt ggtggagcac ctcgaactgg cggcaaccgc 250

tgcagcgcct gctgtggggt ctggagggga tactctacct gctgctggca 300

ctgatgttgt gccatgcact cttcaccact ggctcccacc tgctgagctc 350

cttgtggcct gtcgtggccg cggtgtggcg ccacctgcta ccggctctcc 400

tgctgctggt gctcagtgct ctgcctgccc tcctcttcac ggcctccttc 450

ctgctgctct tctccacact gctgagcctt gtgggcctcc tcacctccat 500

gactcaccca ggcgacactc aggatttgga tcaatagaag ggcaacccca 550

tcccactgcc tgtgtttgtt gagccctggc ctagggcctg agaccccacg 600

gggagaggga gggcaatggg atcagggctc cctgccttgg cagggcccag 650

accctagtc cctaacaggt aggctggcct g 681

<210> 67
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

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

<210> 68
<211> 2600
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 68
acatgcgccc tgacagccca acaatggcgg cgcccgcgga gtcgctgagg 50

aggcggaaga ctgggtactc ggatccggag cctgagtcgc cgcccgcgcc 100

ggggcgtggc cccgcaggct ctccggccca tcttcacacg ggcaccttct 150

ggctgacccg gatcgtgctc ctgaaggccc tagccttcgt gtacttcgtg 200

gcattcctgg tggctttcca tcagaacaag cagctcatcg gtgacagggg 250

gctgcttccc tgcagagtgt tcctgaagga cttccagcag tacttccagg 300

acaggacaag ctgggaagtc ttcagctaca tgcccaccat cctctggctg 350

atggactggt cagacatgaa ctccaacctg gacttgctgg ctcttctcgg 400

actgggcatc tcgtctttcg tactgatcac gggttgcgcc aacatgcttc 450

tcatggctgc cctgtggggc ctctacatgt ccctggttaa tgtgggccat 500

gtctggtact ctttcggatg ggagtcccag cttctggaga cgggattcct 550

ggggatcttc ctgtgccctc tgtggacgct gtcaaggctg ccccagcata 600

cccccacatc ccggattgtc ctgtggggct tccggtggct gatcttcagg 650

atcatgcttg gagcaggcct gatcaagatc cgggggacc ggtgctggcg 700

agacctcacc tgcatggact tccactatga gacccagccg atgcccaatc 750

ctgtggcata ctacctgcac cactcaccct ggtggttcca tcgcttcgag 800

acgctcagca accacttcat cgagctcctg gtgcccttct tcctcttcct 850

cggccggcgg gcgtgcatca tccacggggt gctgcagatc ctgttccagg 900

ccgtcctcat cgtcagcggg aacctcagct tcctgaactg gctgactatg 950

gtgcccagcc tggcctgctt tgatgacgcc accctgggat tcttgttccc 1000

ctctgggcca ggcagcctga aggaccgagt tctgcagatg cagagggaca 1050

tccgaggggc ccggcccgag cccagattcg gctccgtggt gcggcgtgca 1100

gccaacgtct cgctgggcgt cctgctggcc tggctcagcg tgcccgtggt 1150

cctcaacttg ctgagctcca ggcaggtcat gaacacccac ttcaactctc 1200

ttcacatcgt caacacttac ggggccttcg gaagcatcac caaggagcgg 1250

gcggaggtga tcctgcaggg cacagccagc tccaacgcca gcgccccga 1300

tgccatgtgg gaggactacg agttcaagtg caagccaggt gaccccagca 1350

gacggccctg cctcatctcc ccgtaccact accgcctgga ctggctgatg 1400

tggttcgcgg ccttccagac ctacgagcac aacgactgga tcatccacct 1450

ggctggcaag ctcctggcca gcgacgccga ggccttgtcc ctgctggcac 1500

acaacccctt cgcgggcagg cccccgccca ggtgggtccg aggagagcac 1550

tacaggtaca agttcagccg tcctgggggc aggcacgccg ccgagggcaa 1600

gtggtgggtg cggaagagga tcggagccta cttccctccg ctcagcctgg 1650

aggagctgag gccctacttc agggaccgtg ggtggcctct gcccgggccc 1700

ctctagacgt gcaccagaaa taaaggcgaa gacccagccc ctcggcggct 1750

cagcaacgtt tgcccttccc tgcgcccagc ccaagctggg catcgccaag 1800

agagacgtgg agaggagagc ggtgggaccc agcccccagc acgggggtcc 1850

agggtggggt ctgttgtcac atactgtggc ggctcccagg ccctgcccac 1900

ctggggcccc acatccaggc caacccttgt cccaggcgcc aggggctctg 1950

atctcccatc catcccaccc tcctcccaga ggcccagcct ggggctgtgc 2000

cgcccacagg agttgagaca atggcaatcc tgacaccttc ctccactaca 2050

gccctgacca tagacccagc caggtagctc ttggggtctc tagcgtccca 2100

gggcctggtt tctgttccct cttcaatggt gtgttcccag ccaggtcctg 2150

accctcagag ccaagtccct gtcacgtctg gggcagccaa accctcgccc 2200

cacagggacc tggacacgcc cggccaggat gtggggttgg atgggccatt 2250

ttctgtccta tccctcatct ccacccccgc cacagcctac acgcatccca 2300

cacatgcagg cacacacagc ctgtgcacac atgtgttctt ggcccggttt 2350

catcccccca tgactggtgt ctgtgaggtg cagatggaca cagcgcacac 2400

ccagaccctc caccaggctg tgacctcgct gcctctgagg ccttgacaag 2450

gcccctcaat cggaggacag ccggccgtgc acactttcat catcgtcgga 2500

caaacagcgt ctactgcaca tttttcttat tcctattctt gagccatagc 2550

tatggcatat tcttctacta ttcctattat accacttacc agcttactcg 2600

<210> 69
<211> 567
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 69

Met Arg Pro Asp Ser Pro Thr Met Ala Ala Pro Ala Glu Ser Leu
1 5 10 15

Arg Arg Arg Lys Thr Gly Tyr Ser Asp Pro Glu Pro Glu Ser Pro
20 25 30

Pro Ala Pro Gly Arg Gly Pro Ala Gly Ser Pro Ala His Leu His
35 40 45

Thr Gly Thr Phe Trp Leu Thr Arg Ile Val Leu Leu Lys Ala Leu
50 55 60

Ala Phe Val Tyr Phe Val Ala Phe Leu Val Ala Phe His Gln Asn
65 70 75

Lys Gln Leu Ile Gly Asp Arg Gly Leu Leu Pro Cys Arg Val Phe
80 85 90

Leu Lys Asp Phe Gln Gln Tyr Phe Gln Asp Arg Thr Ser Trp Glu
95 100 105

Val Phe Ser Tyr Met Pro Thr Ile Leu Trp Leu Met Asp Trp Ser
110 115 120

Asp Met Asn Ser Asn Leu Asp Leu Leu Ala Leu Leu Gly Leu Gly
125 130 135

Ile Ser Ser Phe Val Leu Ile Thr Gly Cys Ala Asn Met Leu Leu
140 145 150

Met Ala Ala Leu Trp Gly Leu Tyr Met Ser Leu Val Asn Val Gly
155 160 165

His Val Trp Tyr Ser Phe Gly Trp Glu Ser Gln Leu Leu Glu Thr
170 175 180

Gly Phe Leu Gly Ile Phe Leu Cys Pro Leu Trp Thr Leu Ser Arg
185 190 195

Leu Pro Gln His Thr Pro Thr Ser Arg Ile Val Leu Trp Gly Phe
200 205 210

Arg Trp Leu Ile Phe Arg Ile Met Leu Gly Ala Gly Leu Ile Lys
215 220 225

Ile Arg Gly Asp Arg Cys Trp Arg Asp Leu Thr Cys Met Asp Phe
230 235 240

His Tyr Glu Thr Gln Pro Met Pro Asn Pro Val Ala Tyr Tyr Leu
245 250 255

His His Ser Pro Trp Trp Phe His Arg Phe Glu Thr Leu Ser Asn

260 265 270

His Phe Ile Glu Leu Leu Val Pro Phe Phe Leu Phe Leu Gly Arg
275 280 285

Arg Ala Cys Ile Ile His Gly Val Leu Gln Ile Leu Phe Gln Ala
290 295 300

Val Leu Ile Val Ser Gly Asn Leu Ser Phe Leu Asn Trp Leu Thr
305 310 315

Met Val Pro Ser Leu Ala Cys Phe Asp Asp Ala Thr Leu Gly Phe
320 325 330

Leu Phe Pro Ser Gly Pro Gly Ser Leu Lys Asp Arg Val Leu Gln
335 340 345

Met Gln Arg Asp Ile Arg Gly Ala Arg Pro Glu Pro Arg Phe Gly
350 355 360

Ser Val Val Arg Arg Ala Ala Asn Val Ser Leu Gly Val Leu Leu
365 370 375

Ala Trp Leu Ser Val Pro Val Val Leu Asn Leu Leu Ser Ser Arg
380 385 390

Gln Val Met Asn Thr His Phe Asn Ser Leu His Ile Val Asn Thr
395 400 405

Tyr Gly Ala Phe Gly Ser Ile Thr Lys Glu Arg Ala Glu Val Ile
410 415 420

Leu Gln Gly Thr Ala Ser Ser Asn Ala Ser Ala Pro Asp Ala Met
425 430 435

Trp Glu Asp Tyr Glu Phe Lys Cys Lys Pro Gly Asp Pro Ser Arg
440 445 450

Arg Pro Cys Leu Ile Ser Pro Tyr His Tyr Arg Leu Asp Trp Leu
455 460 465

Met Trp Phe Ala Ala Phe Gln Thr Tyr Glu His Asn Asp Trp Ile
470 475 480

Ile His Leu Ala Gly Lys Leu Leu Ala Ser Asp Ala Glu Ala Leu
485 490 495

Ser Leu Leu Ala His Asn Pro Phe Ala Gly Arg Pro Pro Pro Arg
500 505 510

Trp Val Arg Gly Glu His Tyr Arg Tyr Lys Phe Ser Arg Pro Gly
515 520 525

Gly Arg His Ala Ala Glu Gly Lys Trp Trp Val Arg Lys Arg Ile
530 535 540

Gly Ala Tyr Phe Pro Pro Leu Ser Leu Glu Glu Leu Arg Pro Tyr
545 550 555

Phe Arg Asp Arg Gly Trp Pro Leu Pro Gly Pro Leu
560 565

<210> 70
<211> 1900
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 70

ggcacgagga gaagactttg gtggggtagt ctcggggcag ctcagcggcc 50

cgctgtgccc gtttctggcc tcgctcgcag cttgcacgtc gagactcgta 100

ggccgcaccg tagggcgagc gtgcgggtcg ccgccgcggc cgcctcgggg 150

tctgggccca gccgcagcct cttctaccgc ggccggttgg gagtcgccgc 200

gagatgcagc ctccgggccc gcccccggcc tatgccccca ctaacgggga 250

cttcaccttt gtctcctcag cagacgcgga agatctcagt ggttcaatag 300

catccccaga tgtcaaatta aatcttggtg gagattttat caaagaatct 350

acagctacta catttctgag acaaagaggt tatggctggc ttctggaagt 400

tgaagatgat gatcctgaag ataacaagcc actcttggaa gaattggaca 450

ttgatctaaa ggatatttac tacaaaatcc gatgtgtttt gatgccaatg 500

ccatcacttg gttttaatag acaagtggtg agagacaatc ctgacttttg 550

gggtcctctg gctgttgttc ttttcttttc catgatatca ttatatggac 600

agtttagggt ggtctcatgg attataacca tttggatatt tggttcacta 650

acaattttct tactggccag agttcttggt ggagaagttg catatggcca 700

agtccttgga gttataggat attcattact tcctctcatt gtaatagccc 750

ctgtactttt ggtggttgga tcatttgaag tggtgtctac acttataaaa 800

ctgtttggtg tgttttgggc tgcctacagt gctgcttcat tgttagtggg 850

tgaagaattc aagaccaaaa agcctcttct gatttatcca atcttttat 900

tatacattta ttttttgtcg ttatatactg gtgtgtgatc caagttatac 950

atgaatagaa aaagatggtg ttaaatttgt gtgtaggctg ggaattcttg 1000

ctgaaggaat tggagaaaac ctgttgctgc aaaattttac atgttccaga 1050

tggaaaggga agtctaagcg ctttttaaaa caatttttt ttgtatttaa 1100

ttaagcaatt gcagttatct gggatttttg ggtcagaatt ttaaattctg 1150

tttgattctc catattccag tgaataaaat acaaaagcat tgtgttttta 1200

agattgtgtc gatattcacc taaaaacttg tgccaaaagc acctggattg 1250

gtaattatat ttcacttaaa gggtaaattt gacaatatct tgataatcaa 1300

aagtgcaatt tttttcttca aaatgttttc tccagcatca cagatcctgc 1350

agatatatat ttatatttat acatatatat ttatgaaata attcttactc 1400

acaaaatata tttctgataa acattaagat attaaatctg atgcacaaac 1450

tttaatttgg ccattaatct tttttattta aaaatttaaa tttgttttta 1500

aaattgtata tagtttttaa aatctcacac atgcttcgat acttccttgt 1550

taagaattct taataactac taaaactgat ttttaatagt tgctgatata 1600

tatttggttt gtttgggtat acttttcaaa accatttttg aatgtccaaa 1650

catctgattt aaagtttctg tttatctttc tgaccaaagg agcaagaggt 1700

ataatggata tggcattcat taaaatcttt actatgtaca aaaacagtaa 1750

tatttacagc atcagtaaat atttttaagt ggtacttcta aatcataaaa 1800

gttggggaaa gagaccttta aaatcttgtg gtgttgaaca atgttatatg 1850

aagtagaaaa aataaaatac ttcccagttg tgaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1900

<210> 71
<211> 240
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 71

Met Gln Pro Pro Gly Pro Pro Pro Ala Tyr Ala Pro Thr Asn Gly
1 5 10 15

Asp Phe Thr Phe Val Ser Ser Ala Asp Ala Glu Asp Leu Ser Gly
20 25 30

Ser Ile Ala Ser Pro Asp Val Lys Leu Asn Leu Gly Gly Asp Phe
35 40 45

Ile Lys Glu Ser Thr Ala Thr Thr Phe Leu Arg Gln Arg Gly Tyr
50 55 60

Gly Trp Leu Leu Glu Val Glu Asp Asp Asp Pro Glu Asp Asn Lys
65 70 75

Pro Leu Leu Glu Glu Leu Asp Ile Asp Leu Lys Asp Ile Tyr Tyr
80 85 90

Lys Ile Arg Cys Val Leu Met Pro Met Pro Ser Leu Gly Phe Asn
95 100 105

Arg Gln Val Val Arg Asp Asn Pro Asp Phe Trp Gly Pro Leu Ala
110 115 120

Val Val Leu Phe Phe Ser Met Ile Ser Leu Tyr Gly Gln Phe Arg
125 130 135

Val Val Ser Trp Ile Ile Thr Ile Trp Ile Phe Gly Ser Leu Thr
140 145 150

Ile Phe Leu Leu Ala Arg Val Leu Gly Gly Glu Val Ala Tyr Gly
155 160 165

Gln Val Leu Gly Val Ile Gly Tyr Ser Leu Leu Pro Leu Ile Val
170 175 180

Ile Ala Pro Val Leu Leu Val Val Gly Ser Phe Glu Val Val Ser
185 190 195

Thr Leu Ile Lys Leu Phe Gly Val Phe Trp Ala Ala Tyr Ser Ala
200 205 210

Ala Ser Leu Leu Val Gly Glu Glu Phe Lys Thr Lys Lys Pro Leu
215 220 225

Leu Ile Tyr Pro Ile Phe Leu Leu Tyr Ile Tyr Phe Leu Ser Leu
230 235 240

<210> 72
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 72

gggcaccaag aaccgaatca t 21

<210> 73
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 73
cctagaggca gcgattaagg g 21

<210> 74
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 74
tcagcacgtg gattcgagtc a 21

<210> 75
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 75
gtgaggacgg ggcgagac 18

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo aislado que se une a un polipéptido de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51, con o sin su péptido señal asociado, en el que dicho anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento o a un agente citotóxico y está internalizado por una célula de linfoma difuso de célula grande, una célula de linfoma folicular o una célula de linfoma de células del manto que expresan dicho polipéptido, e inhibe el crecimiento de las mismas, para utilizar en un método de tratamiento del linfoma difuso de célula grande, linfoma folicular o linfoma de células del manto en un sujeto.

2. Utilización de un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 51, con o sin su péptido señal asociado, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del linfoma difuso de célula grande, linfoma folicular o linfoma de células del manto, en la que dicho anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento o a un agente citotóxico y está internalizado por una célula de linfoma difuso de célula grande, una célula de linfoma folicular o una célula de linfoma de células del manto que expresan dicho polipéptido, e inhibe el crecimiento de las mismas.

3. Anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 1, o la utilización, según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo está conjugado al agente inhibidor del crecimiento o al agente citotóxico a través de un enlazador.

4. Anticuerpo para utilizar o la utilización, según la reivindicación 3, en el que dicho anticuerpo está conjugado a través de un enlazador sensible a peptidasa.

5. Anticuerpo para utilizar o la utilización, según la reivindicación 4, en el que el agente citotóxico es monometil auristatina (MMAE) y/o en el que el enlazador sensible a peptidasa comprende un reactivo enlazador dipéptido valina-citrulina (vc) que tiene un componente maleimida y un componente auto-inmolador para-aminobencilcarbamoílo (PAB) (MC-vc-PAB).

6. Anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 1, o la utilización, según la reivindicación 2, en el que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

7. Anticuerpo para utilizar o la utilización, según la reivindicación 6, en el que la toxina se selecciona del grupo que consiste en monometil auristatina (MMAE), maitansinoide y caliqueamicina.

8. Anticuerpo para utilizar o la utilización, según la reivindicación 7, en el que el maitansinoide o la caliqueamicina están conjugados al anticuerpo a través de un enlazador seleccionado del grupo que consiste en sulfosuccinimidil maleimidometil ciclohexano carboxilato (SMCC) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP).

9. Anticuerpo para utilizar o la utilización, según la reivindicación 7, en el que la MMAE está conjugada al anticuerpo a través de un enlazador sensible a peptidasa.

10. Anticuerpo para utilizar o la utilización, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, o es un fragmento de anticuerpo, o es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.

11. Utilización o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el anticuerpo se produce en bacterias o se produce en células CHO.

12. Utilización o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho tratamiento comprende además exponer dicha célula a un tratamiento con radiación o a un agente quimioterapéutico.

13. Utilización o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que provoca la muerte de dicha célula.

Figura 50A

DNA88116

CCATCCCATAGTGAGGGAAGACACGCGGAAACAGGCTTGCACCCAGACACGACACCATGC
ATCTCCTCGGCCCCTGGCTCCTGCTCCTGGTTCTAGAATACTTGGCTTTCTCTGACTCAA
GTAAATGGGTTTTTGAGCACCCTGAAACCCTCTACGCCTGGGAGGGGGCCTGCGTCTGGA
TCCCCTGCACCTACAGAGCCCTAGATGGTGACCTGGAAAGCTTCATCCTGTTCCACAATC
CTGAGTATAACAAGAACACCTCGAAGTTTGATGGGACAAGACTCTATGAAAGCACAAAGG
ATGGGAAGGTTCCTTCTGAGCAGAAAAGGGTGCAATTCCTGGGAGACAAGAATAAGAACT
GCACACTGAGTATCCACCCGGTGCACCTCAATGACAGTGGTCAGCTGGGGCTGAGGATGG
AGTCCAAGACTGAGAAATGGATGGAACGAATACACCTCAATGTCTCTGAAAGGCCTTTTC
CACCTCATATCCAGCTCCCTCCAGAAATTCAAGAGTCCCAGGAAGTCACTCTGACCTGCT
TGCTGAATTTCTCCTGCTATGGGTATCCGATCCAATTGCAGTGGCTCCTAGAGGGGGTTC
CAATGAGGCAGGCTGCTGTCACCTCGACCTCCTTGACCATCAAGTCTGTCTTCACCCGGA
GCGAGCTCAAGTTCTCCCCACAGTGGAGTCACCATGGGAAGATTGTGACCTGCCAGCTTC
AGGATGCAGATGGGAAGTTCCTCTCCAATGACACGGTGCAGCTGAACGTGAAGCACACCC
CGAAGTTGGAGATCAAGGTCACTCCCAGTGATGCCATAGTGAGGGAGGGGGACTCTGTGA
CCATGACCTGCGAGGTCAGCAGCAGCAACCCGGAGTACACGACGGTATCCTGGCTCAAGG
ATGGGACCTCGCTGAAGAAGCAGAATACATTCACGCTAAACCTGCGCGAAGTGACCAAGG
ACCAGAGTGGGAAGTACTGCTGTCAGGTCTCCAATGACGTGGGCCCGGGAAGGTCGGAAG
AAGTGTTCCTGCAAGTGCAGTATGCCCCGGAACCTTCCACGGTTCAGATCCTCCACTCAC
CGGCTGTGGAGGGAAGTCAAGTCGAGTTTCTTTGCATGTCACTGGCCAATCCTCTTCCAA
CAAATTACACGTGGTACCACAATGGGAAAGAAATGCAGGGAAGGACAGAGGAGAAAGTCC
ACATCCCAAAGATCCTCCCCTGGCACGCTGGGACTTATTCCTGTGTGGCAGAAAACATTC
TTGGTACTGGACAGAGGGGCCCGGGAGCTGAGCTGGATGTCCAGTATCCTCCCAAGAAGG
TGACCACAGTGATTCAAAACCCCATGCCGATTCGAGAAGGAGACACAGTGACCCTTTCCT
GTAACTACAATTCCAGTAACCCCAGTGTTACCCGGTATGAATGGAAACCCCATGGCGCCT
GGGAGGAGCCATCGCTTGGGGTGCTGAAGATCCAAAACGTTGGCTGGGACAACACAACCA
TCGCCTGCGCACGTTGTAATAGTTGGTGCTCGTGGGCCTCCCCTGTCGCCCTGAATGTCC
AGTATGCCCCCCGAGACGTGAGGGTCCGGAAAATCAAGCCCCTTTCCGAGATTCACTCTG
GAAACTCGGTCAGCCTCCAATGTGACTTCTCAAGCAGCCACCCCAAAGAAGTCCAGTTCT
TCTGGGAGAAAAATGGCAGGCTTCTGGGGAAAGAAAGCCAGCTGAATTTTGACTCCATCT
CCCCAGAAGATGCTGGGAGTTACAGCTGCTGGGTGAACAACTCCATAGGACAGACAGCGT
CCAAGGCCTGGACACTTGAAGTGCTGTATGCACCCAGGAGGCTGCGTGTGTCCATGAGCC
CGGGGGACCAAGTGATGGAGGGGAAGAGTGCAACCCTGACCTGTGAGAGTGACGCCAACC
CTCCCGTCTCCCACTACACCTGGTTTGACTGGAATAACCAAAGCCTCCCCCACCACAGCC
AGAAGCTGAGATTGGAGCCGGTGAAGGTCCAGCACTCGGGTGCCTACTGGTGCCAGGGGA
CCAACAGTGTGGGCAAGGGCCGTTCGCCTCTCAGCACCCTTACTGTCTACTATAGCCCGG
AGACCATCGGCAGGCGAGTGGCTGTGGGACTCGGGTCCTGCCTCGCCATCCTCATCCTGG
CAATCTGTGGGCTCAAGCTCCAGCGACGTTGGAAGAGGACACAGAGCCAGCAGGGGCTTC
AGGAGAATTCCAGCGGCCAGAGCTTCTTTGTGAGGAATAAAAAGGTTAGAAGGGCCCCCC
TCTCTGAAGGCCCCCACTCCCTGGGATGCTACAATCCAATGATGGAAGATGGCATTAGCT
ACACCACCCTGCGCTTTCCCGAGATGAACATACCACGAACTGGAGATGCAGAGTCCTCAG
AGATGCAGAGACCTCCCCGGACCTGCGATGACACGGTCACTTATTCAGCATTGCACAAGC

Figura 50B

GCCAAGTGGGCGACTATGAGAACGTCATTCCAGATTTTCCAGAAGATGAGGGGATTCATT
ACTCAGAGCTGATCCAGTTTGGGGTCGGGGAGCGGCCTCAGGCACAAGAAAATGTGGACT
ATGTGATCCTCAAACATTGACACTGGATGGGCTGCAGCAGAGGCACTGGGGGCAGCGGGG
GCCAGGGAAGTCCCCGAGTTTCCCCAGACACCGCCACATGGCTTCCTCCTGCGTGCATGT
GCGCACACACACACACACACGCACACACACACACACACACTCACTGCGGAGAACCTTGTG
CCTGGCTCAGAGCCAGTCTTTTTGGTGAGGGTAACCCCAAACCTCCAAAACTCCTGCCCC
TGTTCTCTTCCACTCTCCTTGCTACCCAGAAATCATCTAAATACCTGCCCTGACATGCAC
ACCTCCCCTGCCCCACCAGCCCACTGGCCATCTCCACCCGGAGCTGCTGTGTCCTCTGGA
TCTGCTCGTCATTTTCCTTCCCTTCTCCATCTCTCTGGCCCTCTACCCCTGATCTGACAT
CCCCACTCACGAATATTATGCCCAGTTTCTGCCTCTGAGGGAAAGCCCAGAAAAGGACAG
AAACGAAGTAGAAAGGGGCCCAGTCCTGGCCTGGCTTCTCCTTTGGAAGTGAGGCATTGC
ACGGGGAGACGTACGTATCAGCGGCCCCTTGACTCTGGGGACTCCGGGTTTGAGATGGAC
ACACTGGTGTGGATTAACCTGCCAGGGAGACAGAGCTCACAATAAAAATGGCTCAGATGC
CACTTCAAAGAAAAAAAAAA

Figura 51A

```
><usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA88116
><subunit 1 of 1, 847 aa, 1 stop
><MW: 95452, pI: 6.82, NX(S/T): 13

MHLLGPWLLLLVLEYLAFSDSSKWVFEHPETLYAWEGACVWIPCTYRALDGDLESFILFH
NPEYNKNTSKFDGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGDKNKNCTLSIHPVHLNDSGQLGLR
MESKTEKWMERIHLNVSERPFPPHIQLPPEIQESQEVTLTCLLNFSCYGYPIQLQWLLEG
VPMRQAAVTSTSLTIKSVFTRSELKFSPQWSHHGKIVTCQLQDADGKFLSNDTVQLNVKH
TPKLEIKVTPSDAIVREGDSVTMTCEVSSSNPEYTTVSWLKDGTSLKKQNTFTLNLREVT
KDQSGKYCCQVSNDVGPGRSEEVFLQVQYAPEPSTVQILHSPAVEGSQVEFLCMSLANPL
PTNYTWYHNGKEMQGRTEEKVHIPKILPWHAGTYSCVAENILGTGQRGPGAELDVQYPPK
KVTTVIQNPMPIREGDTVTLSCNYNSSNPSVTRYEWKPHGAWEEPSLGVLKIQNVGWDNT
TIACARCNSWCSWASPVALNVQYAPRDVRVRKIKPLSEIHSGNSVSLQCDFSSSHPKEVQ
FFWEKNGRLLGKESQLNFDSISPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSM
SPGDQVMEGKSATLTCESDANPPVSHYTWFDWNNQSLPHHSQKLRLEPVKVQHSGAYWCQ
GTNSVGKGRSPLSTLTVYYSPETIGRRVAVGLGSCLAILILAICGLKLQRRWKRTQSQQG
LQENSSGQSFFVRNKKVRRAPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYTTLRFPEMNIPRTGDAES
SEMQRPPRTCDDTVTYSALHKRQVGDYENVIPDFPEDEGIHYSELIQFGVGERPQAQENV
DYVILKH
```

Secuencia señal
Aminoácidos 1-19

Dominio transmembrana
Aminoácidos 685-705

Dominio de inmunoglobulina
Aminoácidos 154-221, 258-311, 346-398, 435-486, 522-573, 609-611

Sitio de N-glicosilación
Aminoácidos 67-7, 101-104, 112-115, 135-138, 164-167, 231-234, 363-366, 445-448, 479-482, 574-577, 634-637, 724-727

Sitio de fosforilación de la proteína quinasa dependiente de AMPc y GMPc
Aminoácidos 420-423

Sitio de fosforilación de la proteína quinasa C
Aminoácidos 21-23, 45-47, 68-70, 79-81, 125-127, 137-139, 194-196, 241-243, 285-287, 304-306, 641-643, 764-766

Figura 51B

Sitio de fosforilación de caseína quinasa II
Aminoácidos 69-72, 79-82, 123-126, 200-2503, 249-252, 270-273, 347-350, 452-455, 562-565, 601-604, 628-631, 789-792

Sitio de fosforilación de tirosina quinasa
Aminoácidos 788-796

Sitio de N-miristoilación
Aminoácidos 392-397, 522-527, 567-572, 578-583, 655-660, 691-696, 693-698, 720-725, 759-764, 819-824

Sitio de amidación
Aminoácidos 684-687

Sitio de unión a lípido de lipoproteína de membrana procariota
Aminoácidos 386-396

Figura 91A

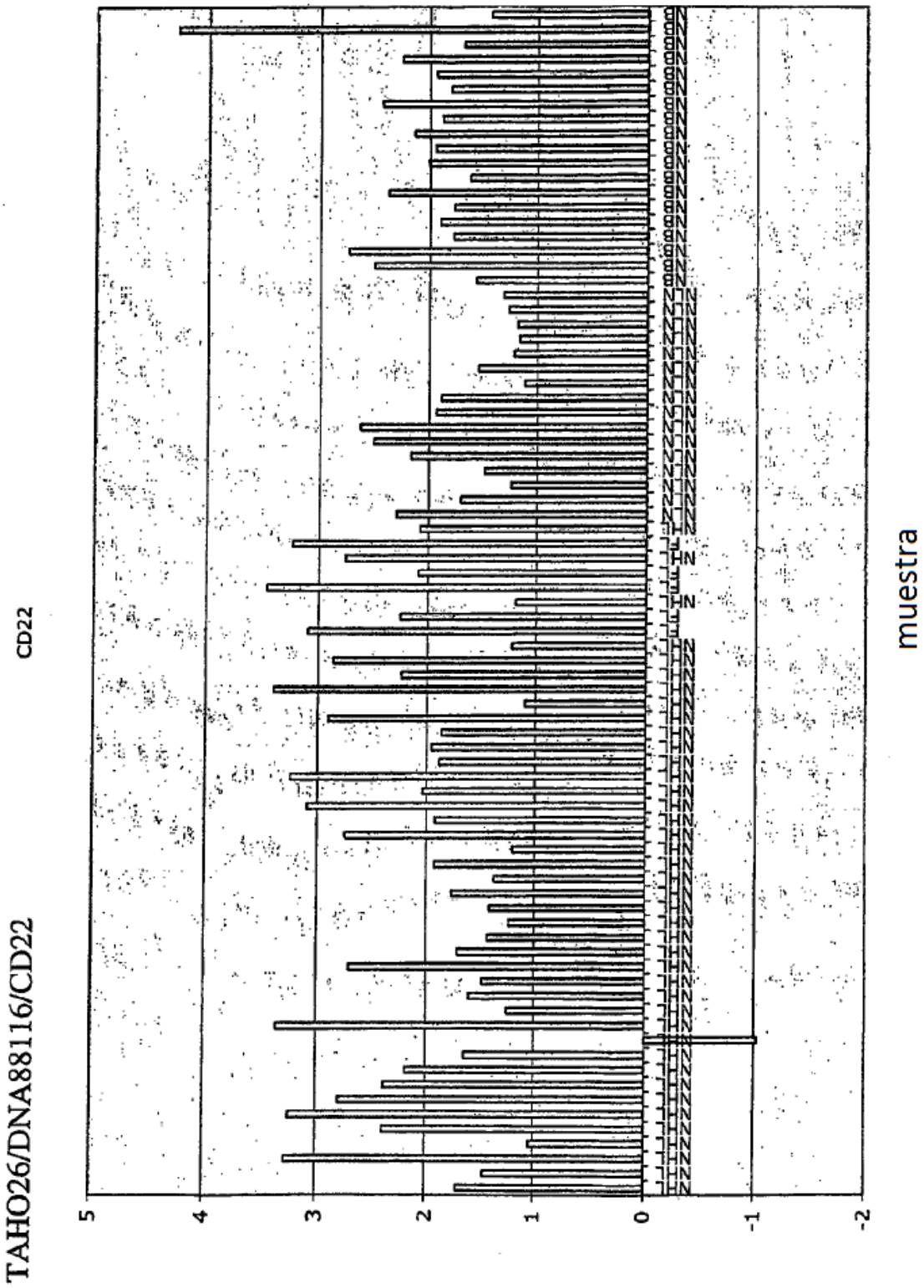


Figura 91B

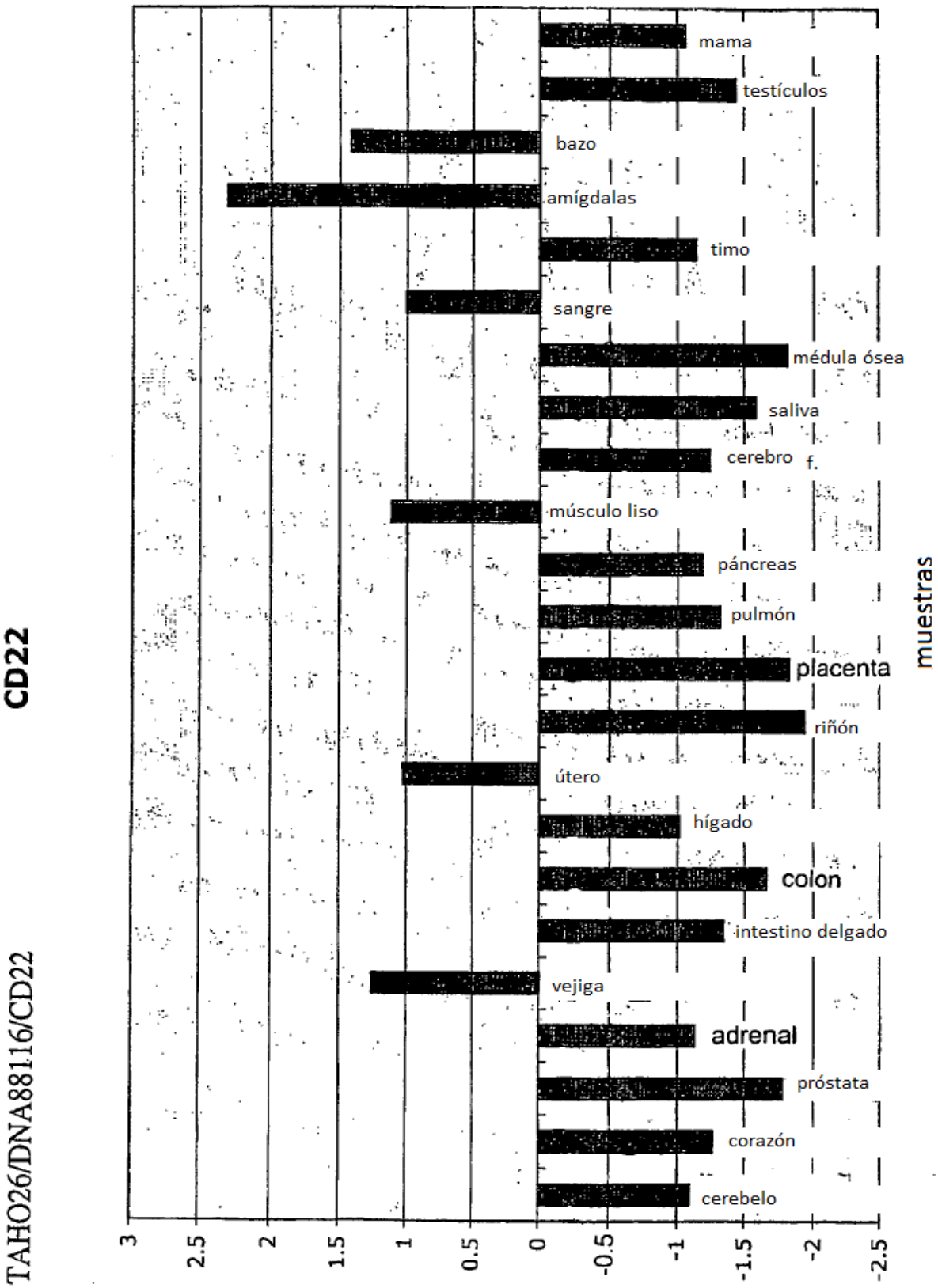

TAHO26/DNA88116/CD22
CD22
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
-2.5
mama
testículos
bazo
amígdalas
timo
sangre
médula ósea
saliva
cerebro f.
músculo liso
páncreas
pulmón
placenta
riñón
útero
hígado
colon
intestino delgado
vejiga
adrenal
próstata
corazón
cerebelo
muestras

Figura 91C

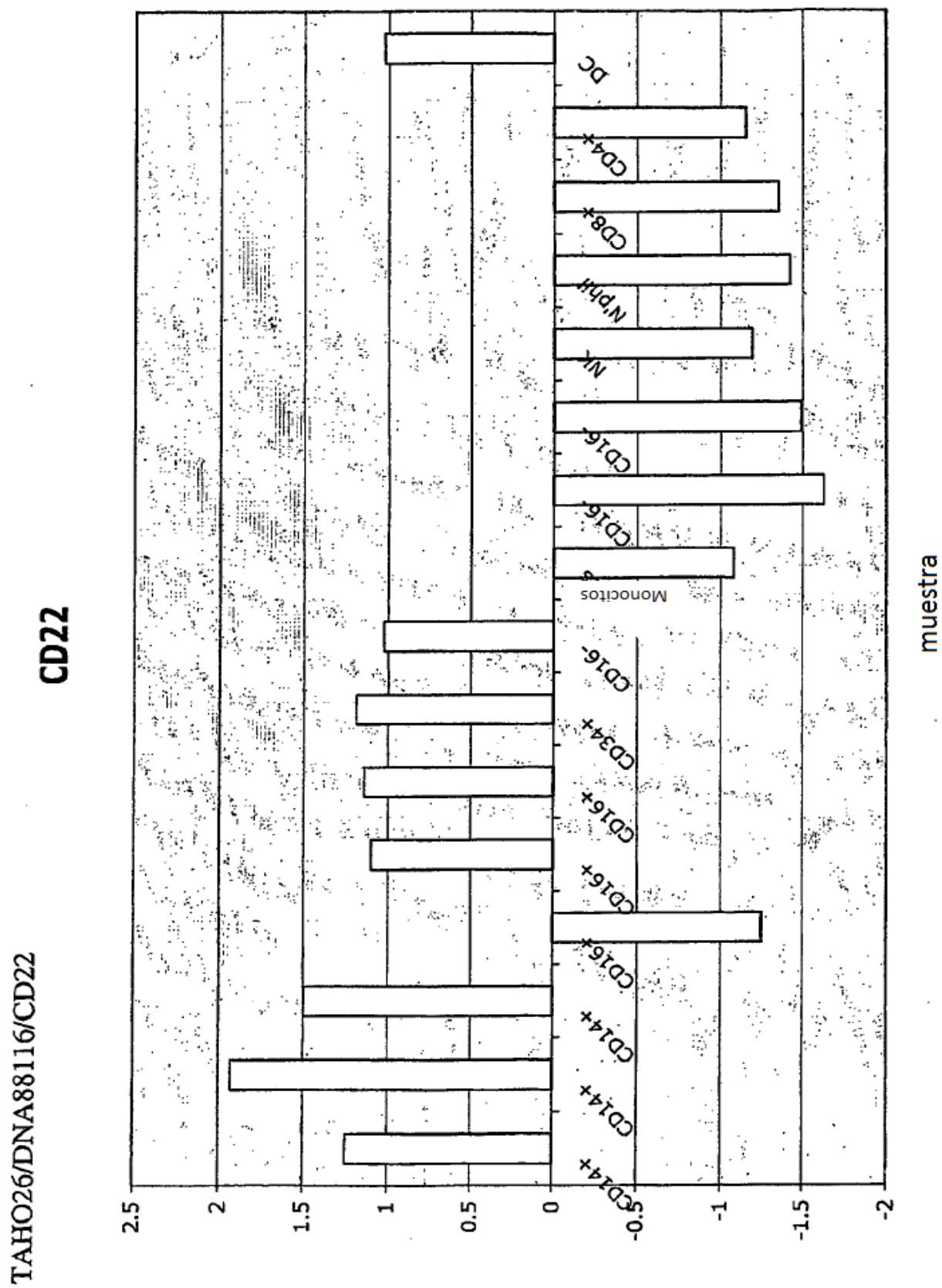
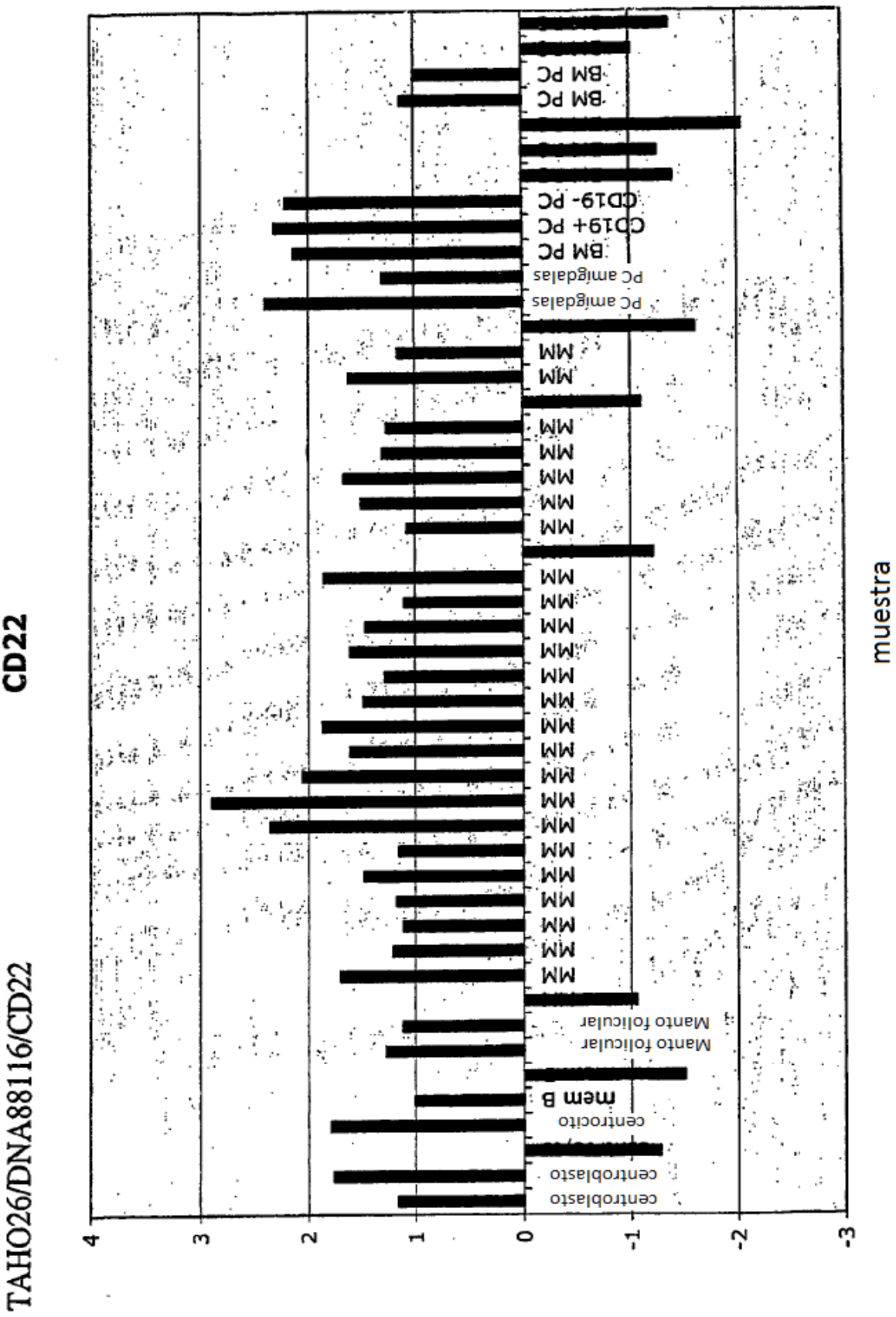

TAHO26/DNA88116/CD22
CD22
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
-1
-1.5
-2
CD14+
CD14+
CD14+
CD16+
CD16+
CD16+
CD34+
CD16-
Monocitos
CD16+
CD16+
NK
N.Phil
CD8+
CD4+
DC
muestra

Figura 91D


TAHO26/DNA88116/CD22
CD22
muestra
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
centroblasto
centroblasto
centrocito
mem B
Manto follicular
Manto follicular
MM
BM PC
BM PC
CD19- PC
CD19+ PC
BM PC
PC amigdalas
PC amigdalas