

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 506 665**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/12** (2006.01)  
**C07K 14/715** (2006.01)  
**C07K 14/54** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2000 E 09009972 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2163625**

54 Título: **Polipéptidos homólogos IL-17 e IL-17R y usos terapéuticos de los mismos**

30 Prioridad:

**23.12.1999 US 172096 P**  
**30.12.1999 WO PCT/US99/31274**  
**11.01.2000 US 175481 P**  
**18.02.2000 WO PCT/US00/04341**  
**02.03.2000 WO PCT/US00/05841**  
**21.03.2000 US 191007 P**  
**21.03.2000 WO PCT/US00/07532**  
**02.06.2000 WO PCT/US00/15264**  
**22.06.2000 US 213807 P**  
**22.08.2000 US 664848**  
**24.08.2000 WO PCT/US00/23328**  
**24.10.2000 US 242837 P**  
**10.11.2000 WO PCT/US00/30873**  
**28.11.2000 US 253646 P**  
**01.12.2000 WO PCT/US00/32678**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**13.10.2014**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**  
**1 DNA WAY**  
**SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, JIAN;**  
**FILVAROFF, ELLEN;**  
**FONG, SHERMAN;**  
**GODDARD, AUDREY;**  
**GODOWSKI, PAUL J.;**  
**GRIMALDI, CHRISTOPHER J.;**  
**GURNEY, AUSTIN L.;**  
**LI, HANZHONG;**  
**HILLAN, KENNETH J.;**  
**TUMAS, DANIEL;**  
**VAN LOOKEREN, MENNO;**  
**VANDLEN, RICHARD L.;**  
**WATANABE, COLIN K.;**  
**WILLIAMS, P. MICKEY;**  
**WOOD, WILLIAM I. y**  
**YANSURA, DANIEL G.**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 506 665 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos homólogos IL-17 e IL-17R y usos terapéuticos de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere generalmente a la identificación y aislamiento de ADN y a la producción recombinante de polipéptidos nuevos con similitud de secuencia con la interleucina-17 y la proteína receptora interleucina-17, designada aquí como polipéptidos "PRO".

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las proteínas extracelulares juegan un papel importante en, entre otras cosas, la formación, la diferenciación y el mantenimiento de los organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, es decir, la proliferación, migración, diferenciación, o la interacción con otras células, normalmente se rigen por la información recibida de otras células y/o el entorno inmediato. Esta información se suele transmitir por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénicos, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que es, a su vez, recibida e interpretada por diversos receptores de las células o proteínas de membrana. Estos polipéptidos secretados o moléculas de señalización normalmente pasan por la vía de secreción celular para llegar a su sitio de acción en el medio extracelular.

15

Las proteínas secretadas tienen diversas aplicaciones industriales, incluyendo los productos farmacéuticos, de diagnóstico, biosensores y biorreactores. La mayoría de los fármacos de proteínas disponibles en la actualidad, tales como agentes trombolíticos, interferones, interleucinas, eritropoyetina, factores estimulantes de colonias, y otras varias citoquinas, son proteínas secretoras. De sus receptores, que son proteínas de membrana, también tienen potencial como agentes terapéuticos o de diagnóstico.

20

Las proteínas unidas a la membrana y receptores pueden desempeñar un papel importante en, entre otras cosas, la formación, la diferenciación y el mantenimiento de los organismos multicelulares. El destino de muchas células individuales, es decir, proliferación, migración, diferenciación, o interacción con otras células, normalmente se rigen por la información recibida de otras células y/o el entorno inmediato. Esta información se suele transmitir por polipéptidos secretados (por ejemplo, factores mitogénica, factores de supervivencia, factores citotóxicos, factores de diferenciación, neuropéptidos y hormonas) que es, a su vez, recibida e interpretada por diversos receptores de las células o proteínas de membrana.

25

Dichas proteínas unidas a la membrana y receptores de la célula incluyen, pero no están limitados a, los receptores de las citoquinas, receptores quinasas, fosfatasa de los receptores, los receptores implicados en las interacciones célula-célula, y las moléculas de adhesión celular como selectinas e integrinas. Por ejemplo, la transducción de señales que regulan el crecimiento y la diferenciación celular está regulada en parte por la fosforilación de varias proteínas celulares. Quinasas tirosina de proteínas, enzimas que catalizan este proceso, también puede actuar como receptores del factor de crecimiento. Los ejemplos incluyen los receptores de factor de crecimiento de fibroblastos y factor de crecimiento del nervio receptor de factor.

30

De manera similar a las proteínas secretadas, las proteínas unidas a la membrana y las moléculas de los receptores tienen diversas aplicaciones industriales, incluso como agentes farmacéuticos y de diagnóstico. Inmunoadhesinas receptoras, por ejemplo, pueden ser empleadas como agentes terapéuticos para bloquear las interacciones receptor-ligando. Las proteínas unidas a la membrana también pueden ser empleadas para la detección de péptido o inhibidores de molécula pequeña potenciales de la interacción receptor/ligando relevante.

35

Se están realizando esfuerzos tanto por la industria y el mundo académico para identificar nuevas proteínas secretadas nativas y el receptor nativo o proteínas unidas a la membrana. Muchos esfuerzos se centran en la selección de las librerías de ADN recombinante de mamíferos para identificar las secuencias que codifican las nuevas proteínas secretadas. Ejemplos de procedimientos y técnicas están descritos en la literatura [ver, por ejemplo, Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:7108-7113 (1996); U. S. Patent No. 5.536.637].

40

En este sentido, la presente invención se refiere a la identificación de nuevos polipéptidos y receptores secretados de la familia de la interleucina-17 (IL-17) que han demostrado estar relacionados con las enfermedades inmuno-mediadas e inflamatorias. Enfermedades inmunes e inflamatorias relacionadas son la manifestación o consecuencia a menudo de varias vías biológicas interconectadas bastante complejas, que en la fisiología normal son críticas para responder al ataque o lesión, iniciar la reparación del ataque o lesión, y montar la defensa innata y adquirida frente a los organismos extraños. La enfermedad o patología se produce cuando estas vías fisiológicas normales causan un ataque o lesión adicional ya sea directamente relacionado con la intensidad de la respuesta, como consecuencia de la regulación anormal o excesiva estimulación, como reacción a la misma, o como una combinación de éstas.

45

Aunque la génesis de estas enfermedades a menudo involucra vías de varias etapas y a menudo caminos múltiples sistemas y vías biológicos diferentes, la intervención en los puntos críticos en una o más de estas vías puede tener un

50

55

60

65

efecto paliativo o terapéutico. La intervención terapéutica puede ocurrir ya sea por antagonismo de un proceso/vía de detrimento o la estimulación de un proceso/vía beneficioso.

5 Muchas enfermedades autoinmunes relacionadas son conocidas y han sido ampliamente estudiados. Esas enfermedades incluyen son las enfermedades inflamatorias inmuno-mediadas (como la artritis reumatoide, enfermedad renal inmuno-mediada, enfermedades hepato biliares, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), psoriasis y asma), enfermedades inflamatorias no inmuno mediadas, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, la neoplasia, etc.

10 Los linfocitos T (células T) son un componente importante de una respuesta inmunitaria de los mamíferos. Las células T reconocen los antígenos que están asociados con una auto-molécula codificada por los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). El antígeno se puede mostrar junto con las moléculas de MHC en la superficie de células que presentan antígenos, células infectadas por virus, células cancerosas, injertos, etc. El sistema de células T elimina estas células alteradas que representan una amenaza para la salud del mamífero huésped. Las células T incluyen  
15 linfocitos colaboradores T y células T citotóxicas. Las células T colaboradoras proliferan de manera extensiva a raíz del reconocimiento de un complejo antígeno-MHC en la presentación de un antígeno de la célula. Las células T colaboradoras también secretan una gran variedad de citocinas, por ejemplo, linfocinas, que desempeñan un papel central en la activación de células B, células T citotóxicas y una variedad de otras células que participan en la respuesta inmunitaria.

20 Un acto central, tanto en las respuestas inmunes humoral y mediada por células es la activación y expansión clonal de las células T colaboradoras. La activación de células T colaboradoras se inicia por la interacción del receptor de células T (TCR) - complejo CD3 con un antígeno-MHC en la superficie de una célula que presente un antígeno. Esta interacción media en una cascada de eventos bioquímicos que inducen al descanso de células T auxiliares para entrar en un ciclo celular (el G0 a la transición G1) y resulta en la expresión de un receptor de alta afinidad para IL-2 y algunas veces IL-4. La célula T activada avanza a través del ciclo proliferando y diferenciándose en las células de memoria o células efectoras.

30 Además de las señales mediadas por el TCR, la activación de células T implica coestimulación adicional inducida por citocinas liberadas por las células que presentan antígenos o por medio de interacciones con las moléculas unidas a la membrana de la célula que presenta el antígeno y la célula T. Las citocinas IL-1 e IL-6 se ha demostrado que proporcionan una señal de coestimuladora. Además, la interacción entre la molécula B7 expresada en la superficie de células presentadoras de un antígeno y moléculas CD28 y CTLA-4 expresadas en la superficie de las células T efectúan la activación de células T. Las células T activadas expresan un mayor número de moléculas de adhesión celular, como el ICAM-1, integrinas, VLA-4, LFA-1, CD56, etc.

40 La proliferación de células T en un cultivo mixto de linfocitos o de reacción mixta de linfocitos (MLR) es una indicación establecida de la capacidad de un compuesto para estimular el sistema inmunológico. En muchas respuestas inmunes, células inflamatorias se infiltran en el sitio de la lesión o infección. Las células migratorias pueden ser neutrófilos, eosinófilos, monocitos o linfocitos, como puede ser determinado por el examen histológico de los tejidos afectados. Current Protocols in Immunology, ed. John E. Coligan, 1994, John Wiley & Sons, Inc.

45 Las enfermedades inmunes relacionadas podrían ser tratadas suprimiendo la respuesta inmunitaria. Utilizando anticuerpos neutralizantes que inhiben las moléculas que tengan actividad inmunitaria estimulante serían beneficiosos en el tratamiento de enfermedades inmunes e inflamatorias. Las moléculas que inhiben la respuesta inmunitaria pueden ser utilizadas (proteínas directamente o a través del uso de agonistas de anticuerpos) para inhibir la respuesta inmunitaria y así mejorar las enfermedades inmunológicas relacionadas.

50 La interleucina-17 (IL-17) ha sido identificada como una célula ortóloga de una proteína codificada por el virus del herpes linfotrópico T Saimiri (VHS) [ver, Rouvier et al., J. Immunol., 150 (12): 5445-5456 (1993); Yao et al., J. Immunol., 122 (12):5483-5486 (1995) Y Yao et al., Immunity, 3 (6):811-821 (1995)]. Caracterizaciones posteriores han demostrado que esta proteína es una citocina potente que actúa para inducir respuestas proinflamatorias en una amplia variedad de tejidos periféricos. IL-17 es una citocina homodimérica de aproximadamente 32 kDa que se sintetiza y se secreta sólo por células T de memoria activada CD4<sup>+</sup> (revisado en Fossiez et al., Int. Rev. Immunol., 16: 541-551 [1998]).

60 A pesar de su limitada distribución en los tejidos, IL-17 presenta actividades biológicas pleiotrópicas en distintos tipos de células. Se ha encontrado que IL-17 estimula la producción de muchas citocinas. Induce la secreción de IL-6, IL-8, la prostaglandina E2, MCP-1 y G-CSF en células adherentes, como los fibroblastos, los queratinocitos, las células epiteliales y endoteliales. IL-17 también tiene la capacidad de inducir la expresión de superficie ICAM-1, la proliferación de las células T, y el crecimiento y la diferenciación de las células CD34<sup>+</sup> progenitoras humanas en neutrófilos. IL-17 también se ha implicado en el metabolismo óseo, y se ha sugerido que desempeñar un papel importante en condiciones patológicas caracterizadas por la presencia de células T activadas y la producción de TNF- $\alpha$ , como la artritis reumatoide y el aflojamiento de los implantes de hueso (Van Bezooijen et al., J. Bone Miner. Res., 14: E1 1513-1521 [1999]). Las células T activadas de tejido sinovial derivado de pacientes con artritis reumatoide se encontró que secretan cantidades más altas de IL-17 que los procedentes de personas sanas o pacientes con artrosis (Chabaud et al., Arthritis Rheum.,

42: 963-970 [1999]). Se sugirió que esta citocina proinflamatoria contribuye activamente en la inflamación sinovial en la artritis reumatoide. Además de su función proinflamatoria, IL-17 parece contribuir a la patología de la artritis reumatoide por otro mecanismo. Por ejemplo, IL-17 ha demostrado que induce la expresión del factor de diferenciación de los osteoclastos (ODF) de ARNm en osteoblastos (Kotake et al., J. Clin. Invest., 103: 1345-1352 [1999]). ODF estimula la diferenciación de las células progenitoras en los osteoclastos, las células implicadas en la reabsorción ósea. Dado que el nivel de IL-17 es significativamente mayor en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide, parece que la IL-17 induce la formación de los osteoclastos, desempeña un papel fundamental en la resorción ósea en la artritis reumatoide. IL-17 también se cree que juegan un papel clave en algunos otros trastornos autoinmunes como la esclerosis múltiple (Matusevicius et al. Mult. Scler., 5: 101-104 [1999]). IL-17 también ha sido demostrado que, por la señalización intracelular, estimula la afluencia  $Ca^{2+}$  y una reducción en el [cAMP], en los macrófagos humanos (Jovanovic et al., J. Immunol., 160:3513 [1998]). Fibroblastos tratados con IL-17 inducen la activación de NP-kB, [Yao et al., Immunity, 3:811 (1995), Jovanovic *et al.*, *supra*], mientras que los macrófagos tratados con ella activan NF-kB y quinasas proteínas activadas con mitógenos (Shalom-Barek et al., J. Biol. Chem., 273:27467 [1998]).

15 Por otra parte, IL-17 también comparte la similitud de secuencia con factor 7 a modo de citocinas de mamíferos, que está implicado en el crecimiento óseo y del cartílago. Otras proteínas con las que polipéptidos IL-17 comparten similitud de secuencia son factores relacionados con interleucina derivados de embríos humanos (EDMF) y la interleucina-20.

20 En consonancia con el amplio rango de efectos de IL-17, el receptor de la superficie celular de la IL-17 se ha encontrado que está ampliamente expresado en muchos tejidos y tipos de células (Yao et al., Cytokine, 9:794 [1997]). Si bien la secuencia de aminoácidos de receptor humano de IL-17 (IL-1) (866 aminoácidos) predice una proteína con un único dominio de transmembrana y un dominio largo intracelular, 525 aminoácidos, la secuencia del receptor es única y no es similar a la de cualquiera de los receptores de la familia de receptores de la citocina/factor de crecimiento. Esto, unido a la falta de similitud de la IL-17 en sí a otras proteínas conocidas indica que la IL-17 y su receptor pueden ser parte de una nueva familia de proteínas y los receptores de señalización. Se ha demostrado que la actividad IL-17 está mediada por la unión a su único receptor de la superficie celular, en la que estudios anteriores han demostrado que las células T en contacto con una forma soluble del polipéptido receptor IL-17 inhibe la proliferación de células T y la producción de IL-2 inducida por la PHA, una concanavalina A y anticuerpos monoclonales anti-TCR (Yao et al., J. Immunol., 155:5483-5486 [1995]). Como tal, existe un interés significativo en la identificación y caracterización de polipéptidos nuevos con homología con los receptores de citocina conocidos, específicamente los receptores de IL-17.

35 Recientemente, se han identificado dos nuevas proteínas llamadas IL-17B y EL-17C que están claramente relacionadas con la IL-17, estableciendo que existe una familia de moléculas como la IL-17- (Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 97 (2):773-778 [2000]). Curiosamente, no parecen ser ligandos para los receptores de IL-17, lo que sugiere que existen otras moléculas que actúan como receptores afines para estos factores. El interés en esta familia de moléculas se ha incrementado, al hacerse evidente que la IL-17 puede contribuir a una serie de importantes problemas de salud relacionados con la función inmune: incluyendo artritis reumatoide, las enfermedades renales mediadas por el sistema inmunitario, enfermedades hepatobiliares, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, asma, esclerosis múltiple, aterosclerosis, promoción del crecimiento del tumor, o enfermedad degenerativa de las articulaciones. El documento WO99/14240 se refiere a una proteína IL17RLP que es un miembro de la familia de receptores de la interleucina (IL)-17. Dado el potencial de moléculas relacionadas con IL-17 para ocupar un papel importante en el control de la función inmune, hay un interés en la identificación de otros miembros de esta familia y los receptores que dirigen las acciones de estas moléculas a través de poblaciones particulares de células diana. En este sentido, la presente invención describe la clonación y caracterización de proteínas nuevas (designada aquí como polipéptidos "PRO") que son similares en la secuencia de aminoácidos a la IL-17, y sus variantes activas, así como las moléculas nuevas receptoras de interleucinas que se ha demostrado que interactúan con los nuevos ligandos de la proteína IL-17.

50 El documento WO 99/61617 se refiere a polinucleótidos recombinantes y polipéptidos de IL-21 e IL-22, elementos de unión y el diagnóstico/tratamiento de trastornos relacionados.

El documento WO 99/60127 describe la identificación de clones de ADNc que tienen una similitud con IL-17 designado PRO1031 y PRO1122.

## 55 DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

### A. Realizaciones

60 La presente invención se refiere a composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario en mamíferos, incluyendo seres humanos. La presente invención se basa en la identificación de anticuerpos antagonistas que inhiben la respuesta inmunitaria en mamíferos. Las enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario pueden ser tratadas mediante la supresión de la respuesta inmunitaria. Las moléculas que suprimen la respuesta inmunitaria atenúan o reducen la respuesta inmunitaria a un antígeno (por ejemplo, neutralizando los anticuerpos) se pueden utilizar terapéuticamente donde la atenuación de la respuesta inmunitaria podría ser beneficiosa (por ejemplo, inflamación). Por consiguiente, los anticuerpos antagonistas anti-polipéptido IL-17E (PRO10272) de la invención, tal como se definen en las reivindicaciones, son útiles para preparar medicinas y medicamentos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario y enfermedades inflamatorias. En un aspecto

específico, estas medicinas y medicamentos comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del polipéptido IL-17E (PRO10272) con un portador farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente, la mezcla es estéril.

5 La presente memoria también se refiere a un procedimiento de identificación de agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO que comprenden poner en contacto el polipéptido PRO con una molécula candidato y monitorizar una actividad biológica mediada por dicho polipéptido PRO.

10 En otra realización, tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende una anticuerpo antagonista anti-polipéptido IL-17E (PRO10272) que se une al polipéptido mezclado con un portador o excipiente. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo. La composición es útil para: (a) disminuir la infiltración de las células inflamatorias en un tejido de un mamífero que necesita de la misma, (b) inhibir o reducir una respuesta inmunitaria en un mamífero con necesidad de la misma, (c) disminuir la actividad de linfocitos T o (d) disminuir la proliferación de linfocitos T en un mamífero con necesidad de la misma en respuesta a un antígeno. En otro aspecto, cuando la composición comprende un principio activo adicional que puede ser, por ejemplo, un anticuerpo adicional o un agente citotóxico o un agente quimioterapéutico. Preferiblemente, la composición es estéril.

20 En otra realización, la presente invención se refiere a medios para tratar un trastorno relacionado con el sistema inmunitario en un mamífero con necesidad de los mismos, mediante la administración a un mamífero de una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista del polipéptido IL-17E (PRO10272). En un aspecto preferido, el trastorno relacionado con el sistema inmunitario es la osteoartritis o la artritis psoriásica.

25 Tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención proporciona un anticuerpo antagonista que se une específicamente a un polipéptido IL-17E (PRO10272). Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena única. Según la presente invención, el anticuerpo inhibe o neutraliza las actividad de un polipéptido IL-17E (PRO10272) (un anticuerpo antagonista). En otro aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, que preferiblemente tiene residuos de la región determinante de complementariedad (CDR) no humana y residuos de la región estructura ("framework") (FR) humana. El anticuerpo se puede marcar e inmovilizar sobre un soporte sólido. En un aspecto adicional, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena única, o un anticuerpo anti-idiotípico.

35 Tal como se define en las reivindicaciones, la presente invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-IL-17E (PRO10272) mezclado con un portador farmacéuticamente aceptable. En un aspecto, la composición comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo. Preferiblemente, la composición es estéril. La composición se puede administrar en forma de una formulación farmacéutica líquida, que se puede conservar para conseguir una mayor estabilidad de almacenamiento. Alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo de cadena única.

#### 40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1) de una secuencia de ADNc nativo PRO1031, en donde la SEQ ID NO: 1 es un clon designado aquí como "DNA59294-1381-1".

45 La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) derivados de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 1 se muestra en la Figura 1.

La Figura 3 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 3) de una secuencia de ADNc nativo PRO1122, en donde la SEQ ID NO: 3 es un clon designado aquí como "DNA62377-1381-1".

50 La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) derivada de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 3 se muestra en la Figura 3.

La figura 5 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 5) de una secuencia de ADNc nativa PRO10272, en donde SEQ ID NO: 5 es un clon designada aquí como "DNA147531-2821".

55 La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) procedente de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 5 que se muestra en la Figura 5.

60 La figura 7 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) de una secuencia de ADNc nativo PRO21175, en donde SEQ ID NO: 7 es un clon designado aquí como "DNA173894-2947".

La figura 8 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) derivada de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 7 se muestra en la Figura 7.

65 La Figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 9) de una secuencia de ADNc nativo PRO20110, en donde la SEQ ID NO: 9 es un clon designado aquí como "DNA166819".

## ES 2 506 665 T3

- La figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) derivado de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 9 se muestra en la Figura 9.
- 5 La figura 11 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 11) de una secuencia de ADNc nativo PRO5801, en donde la SEQ ID NO: 11 es un clon designado aquí como "DNA115291-2681".
- La figura 12 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) derivada de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 11 se muestra en la Figura 11.
- 10 La figura 13 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 13) de una secuencia de ADNc nativo PRO20040, en donde SEQ ID NO: 13 es un clon designado aquí como "DNA164625-2890".
- La figura 14 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) derivada de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 13 se muestra en la Figura 13.
- 15 La figura 15 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 15) de una secuencia de ADNc nativo PRO9877, en donde la SEQ ID NO: 15 es un clon designado aquí como "DNA119502-2789".
- 20 La figura 16 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) derivada de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 15 se muestra en la Figura 15.
- La figura 17 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 17) de una secuencia de ADNc nativo PRO20026, en donde SEQ ID NO: 17 es un clon designado aquí como "DNA154095-2998".
- 25 La figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) derivado de la secuencia de codificación de la SEQ ID NO: 17 se muestra en la Figura 17.
- La figura 19 muestra la alineación de los miembros de la familia de la IL-17 humana: H-IL17 [SEQ ID NO: 40];-h IL17B [PRO1031, SEQ ID NO: 2];-h IL17C [PRO1122, SEQ ID NO: 4] ; -h IL17D [PRO21175; SEQ ID NO: 8];-h ILE [PRO10272; SEQ ID NO: 6], y h-IL17F [PRO20110; SEQ ID NO: 10].
- 30 La figura 20 muestra la distribución de la expresión del tejido relativa del ligando IL-17B (PRO1031).
- La figura 21 muestra la distribución de la expresión del tejido relativa del ligando IL-17C (PRO1122).
- 35 La Figura 22 muestra la distribución de la expresión del tejido relativa del ligando IL-17D (PRO21175).
- La figura 23 muestra la expresión de ARNm de la IL-17E (PRO10272) por análisis RT-PCR. De ARN de los tejidos indicados fue sometido a RT-PCR con iniciadores que fueron diseñados para amplificar toda la secuencia de codificación de la IL-17E. El producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa, transferidos a membrana de nylon y sondeado con sonda de ADNc IL-17E <sup>37</sup>P-etiquetadas.
- 40 La figura 24 muestra la distribución de la expresión del tejido relativa del ligando IL-17F (PRO20110).
- 45 La figura 25 muestra la distribución de la expresión del tejido relativa del receptor IL-17RH1 (PRO5801).
- La figura 26 muestra la distribución de la expresión del tejido relativa del receptor IL-17RH2 (PRO20040).
- 50 La figura 27 muestra la distribución de la expresión del tejido relativa del receptor IL-17RH3 (PRO9877).
- La figura 28 muestra la distribución de la expresión del tejido relativa del receptor IL-17RH4 (PRO20026).
- La figura 29 muestra la inmunoprecipitación del dominio extracelular IL-17R (ECD) con IL-17, IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122). La IL-17R etiquetada con His ECD se expresó en 293 células y metabólicamente etiquetada con <sup>35</sup>S como se describe en el Ejemplo 21. El sobrenadante se recuperó y se utilizaron cuentas de Ni-NTA para precipitar por afinidad la IL-17R ECD etiquetado con His en el sobrenadante (carril 1). En la parte A., IL-17, IL-17B.Fc e IL-17C.Fc, o proteínas de control de fusión Fc se incubaron con el sobrenadante y se añadieron cuentas de proteína-A-agarosa para precipitar las proteínas de fusión Fc. Para la reacción de inmunoprecipitación IL-17, se incluyeron anticuerpos anti-IL17.
- 60 La parte B muestra los resultados de un experimento de enlace competitivo en el que la inmunoprecipitación de IL-17R ECD por IL-17 se realizó en presencia de un exceso de cinco veces de IL-17B.His y proteínas de control etiquetadas His. Los precipitados tanto en la parte A. y B. fueron analizados por electroforesis en gels NuPAGE (4-12% Bis-Tris). Marcadores de peso molecular se indican a la izquierda de cada panel.
- 65 La figura 30 muestra la alineación de miembros de la familia de la IL-17 humana (h-IL17;-h IL17B;-h IL17C, y h-ILE). Las secuencias de la señal predichas están subrayadas. Cisteínas conservadas están indicadas por la bala, y posibles

lugares de glicosilación N-ligados están en caja.

La Figura 31 muestra la expresión de ARNm del receptor IL-17RH1 (PRO5801). La figura 31A muestra el análisis Northern blot de los receptores IL-17RH1 en tejidos seleccionados. La figura 31B muestra el análisis cuantitativo de PCR de la expresión de ARNm IL-17RH1 en los tejidos seleccionados.

La figura 32 muestra IL-17E (PRO10272) la unión del ligando al receptor IL-17RH1 (PRO5801). La figura 32A muestra una comparación del ligando IL-17 e IL-17E (PRO10272) unido al receptor IL-17R (en adelante designado PRO1) y del receptor IL-17RH1 (PRO5801). 293 células fueron transitoriamente cotransfectadas con vectores de expresión de la proteína verde fluorescente (BPC) y de IL-17R o receptores IL-17RH1 como se indica. Las células fueron incubadas con IL-17-Fc o proteína IL-17E-Fc como se indica y la unión fue revelada con anticuerpo conjugado con PE anti-humano Fc. Las curvas de FACS muestran PE teñido en la población de células positivas cotransfectadas GFP. En la Figura 32B, el dominio extracelular del receptor IL-17RH1 epítipo His etiquetado se incubó con ligando-proteína de fusión Fc para los miembros de la familia de IL-17 humana descrita como sigue: carril 1, IL-17RH1-His carga directa, carril 2, IL -17; carril 3, IL-17B (PRO1031), carril 4, IL-17C (PRO1122), y el carril 5, IL-17E (PRO10272). Inmunoadhesinas ligando se inmunoprecipitaron con cuentas de la proteína A y se analizó el receptor IL-17RH1 unido por análisis Western blot con un anticuerpo con la etiqueta de epítipo His. Las posiciones de los marcadores de peso molecular (kDa) se indican en la izquierda.

La figura 33 muestra la inducción de NF-κB por la IL-17E (PRO10272). Figura 33 (parte A) muestra los resultados de transfección transitoria de células humanas y TK-10 con el reportero NF-κB de luciferasa de respuesta pGL3.ELAM.tk y vector de expresión de IL-17E, como se indica. La actividad de la luciferasa se determinó como se indica en el Ejemplo 22. La Figura 33 (parte B) muestra la valoración de NF-κB por inducción de IL-17E. Células 293 humanas fueron transfectadas con el reportero NF-κB de luciferasa de respuesta pGL3.ELAM.tk y el vector de expresión indicado para IL-17E, como se indica.

La figura 34 muestra el efecto de la IL-17E (PRO10272) en la producción de IL-8. Líneas de células derivadas de riñón humanas TK-10 se incubaron mediante Elisa. Se muestra el nivel de IL-8 medido menos el nivel de IL-8 de producción observados en ausencia de la adición de citocinas. Los experimentos se repitieron en varias ocasiones con resultados similares.

La figura 35 muestra la familia de las citocinas IL-17 y el complejo patrón de superposición de las especificidades de receptor-ligando. De izquierda a derecha, la Figura 35 muestra que el ligando IL-17 se une al receptor IL-17 (IL-17R; aquí designado PRO1), el ligando IL-17B (PRO1031) se une al receptor IL-17RH1 (PRO5801), el ligando IL - 17E (PRO10272) se une al receptor IL-17RH1 (PRO5801), el ligando IL-17F (PRO20110) se une tanto al receptor IL-17 (IL-17R, en lo sucesivo designado PRO1), así como al receptor IL-17RH2 (PRO20040), el ligando IL-17C (PRO1122) y el ligando IL-17D (PRO21175) no interactúan con los receptores IL-17R, IL-17RH1 o IL-17RH2.

La figura 36 muestra gráficos de barras que representan la actividad biológica de la IL-17, IL-17B (PRO1031), y de la IL-17C (PRO1122). La figura 36 (parte A) muestra células cultivadas de fibroblastos de prepucio humano (HFF) con la proteína de fusión Fc de control, IL-17, IL-17B.Fc o IL-17C.3Fc a 100 ng/ml durante 18 horas y los medios acondicionados estaban ensayados para IL-6 como se describe en el Ejemplo 28. Figura 36 (parte B) muestra la línea de células leucémicas humanas, THP-1, que fue tratada con las mismas citocinas (100 ng/ml) que anteriormente bajo las mismas condiciones en donde los sobrenadantes fueron ensayados para el nivel de liberación de TNF-α. Los resultados se expresan como media +/- SE de determinaciones por triplicado de un experimento representativo.

La figura 37 muestra un curso de tiempo que representa la dependencia de la IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122) TNF-α activado liberado de las células THP-1. En la figura 37 (parte A), THP-1 células fueron incubadas con 100 ng/ml (2,2 nM) de IL-17B.Fc o IL-17C.Fc 0,5 a 32 horas, los medios acondicionados se recogieron, y la concentración de de TNF-α cuantificada como se describe en el Ejemplo 28. En la Figura 37 (parte B), células THP-1 fueron tratadas con IL-17B.Fc e IL-17C.Fc en un rango de concentración de 0 a 120 nM durante 18 horas y se determinó la liberación de TNF-α.

La figura 38 muestra análisis FACS de la unión de la IL-17B.Fc y la IL-17C.Fc a células THP-1 como se describe en el Ejemplo 29. Células THP-1 fueron incubadas con IL-17B.Fc (Figura 38 parte A.) o IL-17C.Fc (Figura 38 parte B.) o proteínas de fusión Fc de control en PBS (5% suero de caballo) y seguido por la adición de anticuerpos secundarios anti-Fc conjugados FITC.

La figura 39 muestra el efecto de la IL-17 sobre el cartílago articular. Explantes del cartílago fueron cultivados con la concentración indicada de IL-17 sola (sólida) o en presencia de IL-1α en la concentración indicada (tramado) o IL-1ra (IL-1 antagonista de los receptores, R & D Systems, 1 mg / ml, durante 72 horas). La liberación de los proteoglicanos (PG) en el medio (panel superior) indica desglose de la matriz. La síntesis de matriz fue determinada por la incorporación de <sup>35</sup>S-sulfato en el tejido (panel inferior).

La figura 40 muestra el efecto de la IL-17, sobre la liberación de óxido nítrico. Los explantes fueron tratados con IL-17 (10 ng/ml) sola (columna izquierda) o en presencia de IL-1α (10 ng/ml) (columnas de la derecha). Después de 48 horas,

se ensayó el medio para la concentración de nitrito.

La figura 41 muestra el efecto del óxido nítrico (NO) en la IL-17 indujo cambios en el metabolismo de la matriz. Los explantes fueron tratados con IL-17 (5 ng/ml) sola (+) o con un inhibidor irreversible de la sintetasa de óxido nítrico, NOS (L-NIO, Caymen Chemical, 0,5 mm). Después de 72 horas de tratamiento, el medio fue ensayado para nitrito (figura 41 parte A.) y proteoglicanos (PG) (Figura 41 parte B). La figura 41 parte C. muestra la síntesis de proteoglicanos según lo determinado por la incorporación de <sup>35</sup>S-sulfato en el tejido.

La figura 42 muestra el efecto de la inhibición de la óxido nítrico (NO) en la IL-17 los induce cambios en el metabolismo de los proteoglicanos (PG). Explantes de cartílago articular fueron tratados con IL-1 $\alpha$  (5 ng/ml) sola (+) o con inhibidores de la NOS (L-NIO o L-NIL) (NIL, NOS inhibidor reversible, Caymen Chemical) o IL-1ra (IL - 1 antagonista receptor, R & D Systems, 1 mg/ml). Después de 72 horas de tratamiento, se ensayó el medio para la concentración de nitritos y la cantidad de proteoglicanos. La síntesis de matriz fue determinada por la incorporación de <sup>35</sup>S-sulfato en el tejido.

La figura 43 muestra el efecto de la IL-17C (PRO1122) sobre el cartílago articular. Los explantes fueron tratados con IL-17C al 1% o al 0,1% en ausencia (3 columnas más a la izquierda) o la presencia (más a la derecha 3 columnas) de la IL-1 $\alpha$  (+) (10 ng/ml. La liberación y la síntesis de proteoglicanos (PG) se muestran como cantidad por encima del control.

Figura 44 muestra la expresión relativa de la familia IL-17 humana en el modelo de ratón de la enfermedad inflamatoria intestinal [BID], como se demuestra mediante valores relativos -Ct delta a GAPDH. IL-17 muestra una mayor expresión en este modelo de ratón durante las fases leves y graves de la enfermedad inflamatoria intestinal. En contraste, la IL-17E (PRO10272) muestra una marcada disminución en la expresión durante las fases graves de la EII, mientras que la IL-17B (PRO1031) muestra una disminución moderada de la expresión en la EII grave.

La figura 45 muestra un estudio que mide la evolución en el tiempo la expresión relativa de la IL-17D (PRO21175) en un modelo de ratón de ataque en las primeras 72 horas. La IL-17D expresión en el cerebro disminuye drásticamente desde el tiempo en que se induce el ataque al punto final de 72 horas.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

### I. Definiciones

Los términos "polipéptido PRO" y "PRO" como se usan aquí, y cuando son seguidos inmediatamente por una designación numérica se refieren a varios polipéptidos, en los que la designación completa (por ejemplo, PRO/número) se refiere a secuencias de polipéptido específico como se describe en este documento. Los términos "PRO/polipéptido número" y "PRO/número" en que el término "número" se presenta como una designación numérica real como se utiliza aquí abarca polipéptidos de secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que se definen adicionalmente aquí). Los polipéptidos PRO descritos en este documento pueden ser aislados de una variedad de fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o preparados por procedimientos recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido PRO" se refiere a cada individuo PRO/polipéptido número divulgado aquí. Todos los datos que figuran en esta especificación que se refieren al "polipéptido PRO" se refieren a cada uno de los polipéptidos tanto individual como conjuntamente. Por ejemplo, descripciones de la preparación, purificación, derivación, formación de anticuerpos para o en contra, administración de, composiciones que contienen, tratamiento de una enfermedad con, etc., pertenecen a cada polipéptido individualmente. El término "polipéptido PRO" también incluye variantes de los polipéptidos PRO/número de aquí descritos.

Un "polipéptido PRO de secuencia nativa" comprende un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos en el polipéptido PRO correspondiente derivado de la naturaleza. Estos polipéptidos PRO de secuencia nativa pueden ser aislados de la naturaleza o pueden ser producidos por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido PRO de secuencia nativa" abarca específicamente formas truncadas que ocurren naturalmente o secretadas del polipéptido PRO específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes que ocurren naturalmente (por ejemplo, formas unidas alternativamente) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido. La secuencia nativa de polipéptidos PRO divulgadas aquí es plenamente madura o polipéptidos de secuencia nativa de longitud completa que comprende las secuencias de aminoácidos de longitud completa que se muestran en las figuras adjuntas. Codones de inicio y detención se muestran en negrita y subrayado en las figuras. Sin embargo, mientras que el polipéptido PRO divulgado en las figuras adjuntas se muestran que comienzan con residuos metionina designada aquí como el aminoácido de posición 1 en las figuras, es concebible y posible que otros residuos metionina situadas antes o después de la posición 1 del aminoácido en las figuras pueden ser empleados como residuo de aminoácido de inicio para los polipéptidos PRO.

El "dominio extracelular" del polipéptido PRO o "ECD" se refiere a una forma de polipéptido PRO, que es esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplasmático. Por lo general, un polipéptido PRO ECD tendrá menos del 1% de tales dominios transmembrana y/o citoplasmáticos y, de preferencia, tendrá menos del 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos PRO del presente documento se identifican conforme a los criterios empleados habitualmente en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio de transmembrana pueden variar, pero muy probablemente en no más

de 5 aminoácidos en ambos extremos del dominio como se han identificado aquí inicialmente. Opcionalmente, por lo tanto, también se contemplan un dominio extracelular de un polipéptido PRO puede contener alrededor de 5 o menos aminoácidos a ambos lados del límite del dominio de transmembrana/dominio extracelular como se señala en los ejemplos o las especificaciones y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica.

La ubicación aproximada de los "péptidos señal" de los diferentes polipéptidos PRO aquí descritos se muestran en la presente memoria y/o en las figuras adjuntas. Cabe señalar, sin embargo, que el C-terminal del límite de un péptido señal puede variar, pero muy probablemente en no más de 5 aminoácidos de cada lado de la señal de péptido C-terminal del límite, tal como inicialmente se identificó aquí, en donde el límite terminal C del péptido señal puede ser identificado con arreglo a los criterios empleados habitualmente en la técnica para determinar ese tipo de elemento de la secuencia aminoácidos (por ejemplo, Nielsen et al., Prot. Eng., 10:1-6 (1997) Y Von Heinje et al., Nucl. Acids. Res., 14:4683-4690 (1986)). Por otra parte, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia de la señal de un polipéptido secretado no es totalmente uniforme, lo que resulta en más de una especie segregada. También se contemplan estos polipéptidos maduros, donde el péptido señal se corta en no más de 5 aminoácidos en ambos lados del límite C-terminal del péptido señal aquí identificado, y los polinucleótidos que codifica.

"Variante de polipéptido PRO" significa un polipéptido PRO activo, tal como se define anterior o posteriormente que tiene por lo menos un 80% identidad de la secuencia de aminoácido con una secuencia de longitud completa de la secuencia nativa de Polipéptido PRO tal como se describe aquí, una secuencia polipeptídica PRO que carece de péptido señal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, como se describe aquí o cualquier otro fragmento de una secuencia de longitud completa de polipéptido PRO como se describe aquí. Estas variantes de polipéptido PRO incluyen, por ejemplo, polipéptidos PRO en los que uno o más residuos de aminoácidos se agregan o se eliminan, en el terminal N- o C- de la secuencia de aminoácidos nativos de longitud completa. Por lo general, una variante de polipéptido PRO tendrá por lo menos un 80% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos aproximadamente un 81% identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 82% identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 83% identidad de la secuencia de aminoácidos, en su defecto, por lo menos, un 84% identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos el 85% identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 86% identidad de la secuencia de aminoácidos, en su defecto, por lo menos un 87% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos aproximadamente un 88% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, aproximadamente un 89% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 90% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 91% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 92% de identidad de secuencia de aminoácidos, en su defecto, por lo menos, un 93% de identidad de secuencia de aminoácidos, en su defecto, por lo menos, aproximadamente un 94% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos, un 95% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 96% de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente, por lo menos un 97% de identidad de secuencia de aminoácidos, en su defecto, por lo menos, un 98% de identidad de secuencia de aminoácidos y, alternativamente, por lo menos un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos en una secuencia de longitud completa de la secuencia nativa de polipéptido PRO tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido PRO que falta el péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido PRO de longitud completa tal como se describe aquí. Normalmente, los polipéptidos PRO variantes tienen por lo menos unos 10 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 20 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 30 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 40 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 50 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 60 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 70 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 80 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 90 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 100 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 200 aminoácidos de longitud, en su defecto, por lo menos, unos 300 aminoácidos de longitud, o más.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias de polipéptido PRO identificadas aquí se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que sean idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia específica de polipéptido PRO, después de alinear las secuencias y de introducir separaciones, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, y no tener en cuenta algunas sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La alineación a los efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede lograrse de varias maneras que son de las habilidades de la técnica, por ejemplo, utilizando los programas informáticos a disposición del público como software BLAST, BLAST-2, alinear o Megalign (DNASTAR). Los entendidos en la técnica pueden determinar los parámetros adecuados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan. A efectos de la presente, sin embargo, valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos se generan mediante el programa de ordenador de comparación de secuencia ALIGN-2, donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1 a continuación. El programa de ordenador de comparación de secuencia ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la tabla 1 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de EE.UU.,

Washington DC, 20559, donde se registró con el N° de registro de autor de EE.UU. . TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible para el público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado desde el código fuente en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente Digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se utiliza ALIGN-2 para la comparación de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos determinada A respecto a, con, o en contra de una secuencia de aminoácidos B determinada (que, alternativamente, se puede expresar como una secuencia de aminoácidos determinada que tiene o cuenta con un determinado % de identidad de secuencia de aminoácido respecto a, con, o en contra de una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos calificados como exactamente iguales por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se puede apreciar 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 de la secuencia de aminoácidos de la A a la B no será igual al % de identidad de la secuencia aminoácido de B a la A. Como ejemplos cálculos de % de identidad de la secuencia de aminoácidos utilizando este procedimiento, las tablas 2 y 3 muestran cómo calcular el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designado "Proteínas de Comparación" para la secuencia de aminoácidos denominada "PRO", donde "PRO" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido PRO hipotético de interés, "Proteínas de Comparación", representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido contra el se cual compara el polipéptido "PRO" de interés, y "X" Y "y" Z ", representa cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos.

A menos que se indique lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos utilizados en este documento son obtenidos como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa de ordenador ALIGN-2. Sin embargo, % valores de identidad de secuencia de aminoácido también puede ser obtenido como se describe a continuación utilizando el programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda WU-BLAST-2 se ajustan a los valores por defecto. Los valores no ajustados por defecto, por ejemplo, los parámetros ajustables, se establecen con los siguientes valores: separación de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, límite de palabra (T) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina un valor % de identidad de secuencia de aminoácidos dividiendo (a) el número de residuos de aminoácidos idénticos coincidentes entre la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada del polipéptido PRO nativo y la secuencia de aminoácidos de comparación de interés (por ejemplo, la secuencia contra la cual el polipéptido PRO de interés se está comparando que puede ser una variante de polipéptido PRO) según lo determinado por WU-BLAST-2 por (b) el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la declaración de "un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos A que tiene o que tenga por lo menos el 80% de identidad de secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos B", la secuencia de aminoácidos A es la comparación de secuencia de aminoácidos de interés y la secuencia de aminoácidos B es la secuencia de aminoácidos del polipéptido PRO de interés.

El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácido también puede determinarse utilizando el programa de comparación de las secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenido de la National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza varios parámetros de búsqueda, en donde todos los parámetros de búsqueda se fijan a los valores predeterminados, incluyendo, por ejemplo, desenmascarar = sí, cadena = todo, sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, valor-e pase múltiple = 0,01, constante de pase múltiple = 25, caída de alineación separada final = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62.

En las situaciones en que se utiliza NCBI-BLAST2 para la comparación de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos A determinada respecto a, con, o en contra de una determinada secuencia de aminoácidos B (que, alternativamente, se puede expresar como una secuencia de aminoácidos determinada que tiene o cuenta con un determinado % de identidad de secuencia de aminoácidos respecto a, con, o en contra de una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos que se calificó como coincidencias idénticas mediante el programa BLAST2 NCBI en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se puede apreciar 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 de la secuencia de aminoácidos de la A a la B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácido de B respecto a A.

"Variante de polinucleótido PRO" o "secuencia de ácidos nucleicos variante PRO" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido proactivo, tal como se define a continuación y que tiene por lo menos un 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa como se describe aquí, una secuencia nativa de longitud completa de polipéptido PRO que carece de la secuencia del péptido señal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin el péptido señal, como se revela aquí o cualquier otro fragmento de una secuencia de un polipéptido PRO de longitud completa como se describe aquí. Normalmente, un polinucleótido PRO variante tendrá por lo menos un 80% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, en su defecto, por lo menos aproximadamente el 81% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 82% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 83% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 84% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 85% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 86% identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 87% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 88 % de la identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente por lo menos aproximadamente 89% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 90% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 91% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 92% identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente, por lo menos aproximadamente 93% de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente por lo menos aproximadamente 94% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 95% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 96% identidad de secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos, aproximadamente 97% identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente 98% identidad de secuencia de ácidos nucleicos y, alternativamente, por lo menos aproximadamente 99% identidad de secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de polipeptido PRO de secuencia nativa de longitud completa como se describe aquí, una secuencia de polipéptido PRO de secuencia nativa de longitud completa que carece del péptido señal como se describió aquí, un dominio extracelular de un polipéptido PRO, con o sin la secuencia de señal, como se revela aquí o cualquier otro fragmento de una secuencia de longitud completa de polipéptido PRO como se describe aquí. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

Normalmente, los polinucleótidos variantes PRO son de por lo menos aproximadamente 30 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 90 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 120 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 150 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 180 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 210 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 240 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 270 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 300 nucleótidos de longitud, alternativamente, por lo menos aproximadamente 450 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 600 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 900 nucleótidos de longitud, o más.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácidos nucleicos" respecto a la secuencias de ácido nucleico que codifican PRO aquí identificadas se define como el porcentaje de los nucleótidos en una secuencia de candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos PRO de interés, después de alinear el secuencias y la introducción de separaciones, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. La alineación a los efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos se puede lograr de varias maneras que están dentro de los conocimientos del experto, por ejemplo, utilizando los programas informáticos de software a disposición del público como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). A efectos del presente documento, sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos se generan mediante el programa de ordenador de comparación de secuencia ALIGN-2, donde el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. El programa de ordenador de comparación de secuencia ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente que se muestra en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de EE.UU., Washington DC, 20559, donde se registró con el N ° de registro de autor de EE.UU. . TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado desde el código fuente en la Tabla 1 a continuación. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente Digital UNIX V4.0D. Todos los parámetros de comparación de secuencias son fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde ALIGN-2 se utiliza para la comparación de secuencias de ácido nucleico, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una determinada secuencia de ácidos nucleicos C respecto a, con o contra una determinada secuencia de ácidos nucleicos D (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de ácido nucleico determinada C que tiene o comprende un determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico respecto a, con, o contra una determinada secuencia de ácido nucleico D) se calcula como sigue:

100 veces la fracción W/Z

donde  $W$  es el número de nucleótidos calificados como exactamente iguales por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de  $C$  y  $D$ , y donde  $Z$  es el número total de nucleótidos en  $D$ . Se puede apreciar 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 de la secuencia de ácidos nucleicos de  $C$  a  $D$ , no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de  $D$  a  $C$ . Como ejemplos de los cálculos de % de identidad de secuencia de ácidos nucleicos, Tablas 4 y 5, muestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácidos nucleicos designados "Comparación de ADN" a la secuencia de ácido nucleico designado "PRO-ADN", donde "PRO-ADN", representa una hipotética secuencia de ácido nucleico que codifica PRO de interés, "Comparación de ADN", representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico en contra la cual se compara la molécula de de ácido nucleico "PRO-ADN" de interés, y "N", "L" y "V" representa cada una diferentes nucleótidos hipotéticos.

A menos que se indique lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico utilizados aquí son obtenidos como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa de ordenador ALIGN-2. Sin embargo, los valores de % de identidad de secuencia de ácido nucleico también pueden ser obtenidos como se describe a continuación utilizando el programa de ordenador WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology 266:460-480 (1996)). La mayoría de los parámetros de búsqueda de WU-BLAST-2 se ajustan a valores por defecto. Los que no se ajustan a valores por defecto, por ejemplo, los parámetros ajustables, se establecen con los siguientes valores: separación de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, límite de palabra ( $T$ ) = 11, y matriz de puntuación = BLOSUM62. Cuando se emplea WU-BLAST-2, se determina un valor % de identidad de secuencia de ácido nucleico dividiendo (a) el número de nucleótidos idénticos coincidentes entre la secuencia de ácido nucleico de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés que tiene una secuencia derivada de la secuencia nativa de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO y la molécula de comparación de ácido nucleico de interés (por ejemplo, la secuencia contra la que la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés se compara lo que puede ser un polinucleótido PRO variante), según lo determinado por WU-BLAST-2 por (b) el número total de nucleótidos de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés. Por ejemplo, en la declaración "una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de ácido nucleico A que tiene o que tenga por lo menos el 80% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos nucleicos B", la secuencia de ácidos nucleicos A es la molécula de comparación de ácido nucleico de interés y la secuencia de ácidos nucleicos B es la secuencia de la molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido PRO de interés.

El porcentaje de ácido nucleico de identidad de secuencia también puede determinarse utilizando el programa de comparación de las secuencias NCBI-BLAST2 (Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)). El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> u obtenerse de la National Institute of Health, Bethesda, MD. NCBI-BLAST2 utiliza parámetros de búsqueda, en donde todos los parámetros de búsqueda se fijan a los valores predeterminados, incluyendo, por ejemplo, desenmascarar = sí, cadena = sucesos esperados = 10, longitud mínima de baja complejidad = 15/5, valor- $e$  de pase múltiple = 0,01, constante de pase múltiple = 25, caída para la alineación separada final = 25 y baremo de puntuación = BLOSUM62.

En situaciones en que NCBI-BLAST2 se utiliza para la comparación de secuencias, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una determinada secuencia de ácidos nucleicos  $C$  respecto a, con o contra una determinada secuencia de ácidos nucleicos  $D$  (que alternativamente se puede expresar como una secuencia determinada de ácido nucleico  $C$  que tiene o cuenta con un determinado % de identidad de secuencia de ácido nucleico respecto a, con, o en contra de una determinada secuencia de ácido nucleico  $D$ ) se calcula como sigue:

100 veces la fracción  $W/Z$

donde  $W$  es el número de nucleótidos calificados como exactamente iguales por el programa de alineación de secuencia NCBI-BLAST2 en la alineación de ese programa de  $C$  y  $D$ , y donde  $Z$  es el número total de nucleótidos en  $D$ . Se puede apreciar que, cuando la longitud de secuencia de ácidos nucleicos de  $C$  no es igual a la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos de  $D$ , el % de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de  $C$  a  $D$ , no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de la  $D$  a  $C$ .

En otras realizaciones, polinucleótidos variante PRO son moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido activo PRO, y que son capaces de hibridación, de preferencia bajo condiciones estrictas de hibridación y lavado, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido PRO de longitud completa que figuran aquí. Polipéptidos variante PRO pueden ser los que están codificados por un polinucleótido variante PRO.

"Aislado", cuando se utiliza para describir los diferentes polipéptidos aquí divulgados, significa un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que típicamente interferirían con usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido será purificado (1) en un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de N-terminal o secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) a la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, la tinción de plata. Un polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que por lo menos uno de los

componentes del medio ambiente natural del polipéptido PRO no estará presente. Por lo general, sin embargo, polipéptido aislado será preparado por lo menos una etapa de purificación.

5 Un ácido nucleico que codifica un polipéptido PRO "aislado" u otros ácidos nucleicos que codifican un polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con los que normalmente se asocian en la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado es distinta en la forma o medio en el que se encuentra en la naturaleza. Moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos aislados por lo tanto se distinguen de la molécula específica del ácido nucleico que codifica polipéptidos, tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una  
10 molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido aislado incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en las células que normalmente expresan el polipéptido donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico se encuentra en una localización cromosómica distinta de la de las células naturales.

15 El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia de codificación unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuados para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente, una secuencia de operador, y un sitio de unión del ribosoma. Las células eucariotas son conocidas por utilizar los promotores, las señales de poliadenilación, y potenciadores.

20 El ácido nucleico está "unido operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN de un líder presecuencia o secretor unido operativamente a un 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 de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia, o un sitio de unión del ribosoma está unido operativamente a una secuencia de codificación si se coloca con el fin de facilitar la traducción. En  
25 general, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que están vinculadas son contiguas, y, en el caso de un líder de secreción, contigua y en la fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión es realizada por bandas en los sitios de restricción convenientes. Si los sitios no existen, los adaptadores de oligonucleótidos sintéticos o enlaces se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.

30 El término "anticuerpo" se utiliza en el sentido más amplio y abarca específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-PRO únicos (como agonistas, antagonistas y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-PRO con especificidad poliepitópica, anticuerpos anti-PRO de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-PRO (véase más abajo). El término "anticuerpos monoclonales" como se usa aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, por ejemplo, los anticuerpos que  
35 integran la población son idénticos, salvo posibles mutaciones que ocurren naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores.

"Estringencia" de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por alguien de conocimientos básicos en la técnica, y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y la  
40 concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más altas para el recocido adecuado, mientras sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. En general la hibridación depende de la capacidad del ADN desnaturalizado de volverse a recocer cuando están presentes hebras complementarias en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridizable, mayor es la temperatura relativa que puede ser utilizada. Como resultado, se deduce que las temperaturas  
45 relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más estrictas, mientras que temperaturas más bajas, menos. Para obtener detalles adicionales y la explicación de estringencia de las reacciones de hibridación, véase Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condiciones estrictas" o "condiciones de alta estringencia", tal como se definen aquí, pueden ser identificadas por  
50 aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo 0,015 M cloruro de sodio/0,0015 M citrato de sodio/0,1% sulfato dodecil de sodio a 50°C, (2) emplean a un agente desnaturalizante durante la hibridación, tales como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) formamida con un 0,1% de suero bovino albumina/0,1% Ficoll/0,1 polivinilpirrolidona/50mM% de fosfato de sodio tampón a pH 6,5 con 750 mM cloruro sódico, citrato sódico 75 mM a 42°C, o (3) emplean 50% formamida, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M citrato de sodio), fosfato de sodio 50 mM  
55 (pH 6,8), 0,1% de pirofosfato de sodio, 5 x solución Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 mg/ml), 0,1% SDS, y 10% sulfato de dextrano a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro de sodio / citrato de sodio) y 50% formamida a 55°C, seguido de un lavado de estringencia alta, consistente en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

"Las condiciones moderadamente restrictivas" pueden ser definidas y descritas por Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de la solución de lavado y las  
60 condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % SDS) menos estrictos que los descritos anteriormente. Un ejemplo de las condiciones moderadamente restrictivas es una noche de incubación a 37°C en una solución que comprende: 20% formamida, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM de citrato trisódico), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x solución Denhardt's, sulfato de dextrano 10%, y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado  
65 cortado, seguido por el lavado de los filtros en 1 x SSC en alrededor de 37-50°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para dar cabida a factores como la longitud de la sonda y similares.

- El término "epítope etiquetado" cuando se usa aquí, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido PRO fusionado al "polipéptido etiqueta". El polipéptido etiqueta tiene los residuos suficientes como para proporcionar un epítope contra el cual puede realizarse un anticuerpo, pero es lo suficientemente corta de manera que no interfiera con la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta, preferiblemente, también es bastante único de forma que los anticuerpos sustancialmente no reaccionan de forma cruzada con otros epítopes. Polipéptidos etiqueta adecuados generalmente tienen por lo menos seis residuos de aminoácidos y usualmente aproximadamente entre 8 y 50 residuos de aminoácidos (de preferencia, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).
- Como se usa aquí, el término "inmunoadhesina" designa anticuerpos a modo de moléculas que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesinas") con las funciones efectoras de los dominios constantes inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada, que es otra que el reconocimiento de antígenos y sitio de unión de un anticuerpo (por ejemplo, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende por lo menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede ser obtenida de cualquier inmunoglobulina, tales como la IgG 1, IgG-2, IgG-3, o 4 subtipos de IgG, IgA (incluidos los de IgA e IgA-1-2), IgE, IgD o IgM.
- El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente, bloquea, inhibe o neutraliza la actividad biológica de un polipéptido PRO natural aquí descrito. De manera similar, el término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio e incluye a cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido PRO nativo aquí descrito. Moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de polipéptido PROs nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, pequeñas moléculas orgánicas, etc. Procedimientos para identificar los agonistas o antagonistas de un polipéptido PRO puede incluir contactar un polipéptido PRO con una molécula candidata agonista o antagonista y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido PRO.
- "Tratamiento" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico y profiláctico o medidas preventivas, en donde el objetivo es prevenir o retardar (disminuir) la condición patológica específica o desorden. Los que están en necesidad de tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno, o aquellos en los que el trastorno se debe prevenir.
- Administración "crónica" se refiere a la administración del agente(s) en un modo continuo en lugar de un modo agudo, a fin de mantener el efecto terapéutico (actividad) inicial por un período prolongado de tiempo. La administración "intermitentes" es un tratamiento que no es hecho de forma consecutiva sin interrupción, pero que es cíclico en naturaleza.
- "Mamíferos" a los efectos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluidos los seres humanos, animales domésticos y de granja y zoo, deportivos o de animales de compañía, como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.
- Administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administraciones simultáneas (concurrentes) y consecutivos en cualquier orden.
- "Portadores" como se utilizan aquí son portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, que son no tóxicos para la célula o mamífero expuestos a ellos a las dosis y las concentraciones empleadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tampón de pH. Ejemplos de portadores fisiológicamente aceptables incluyen amortiguadores, como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, incluyendo el ácido ascórbico, polipéptido de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como la albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona, aminoácidos como la glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes, como EDTA, alcoholes de azúcar como el sorbitol, manitol o, sales que forman contraiones tales como el sodio, y/o de los tensioactivos no iónicos como TWEEN™, polietileno glicol (PEG), y PLURONICS™.
- "Fragmentos de anticuerpos," comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente, la región de unión del antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos son Fab, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al., Protein Eng., 8 (10) :1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.
- La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión idénticos del antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión de antígeno, y un fragmento "FC" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar con facilidad. El tratamiento de la pepsina se obtiene un fragmento F(ab)<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación de antígenos y todavía es capaz de entrecruzamiento de antígenos.

"FV" es el fragmento mínimo de anticuerpos que contiene un antígeno sitio completo de reconocimiento y de unión. Esta región se compone de un dímero de dominio variable de una cadena pesada y una ligera en apretado, asociación no covalente. Es en esta configuración que los tres CDRs de cada dominio variable actúan para definir un sitio de unión del antígeno en la superficie del dímero V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>. En conjunto, los seis CDRs confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicos para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unir al antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante de (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se diferencian de los fragmentos Fab' mediante la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del dominio de la cadena pesada CH1 incluyendo una o más cisternas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en la que el residuo(s) cisteína de los dominios constantes soporta un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')<sub>2</sub> originalmente fueron producidos como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. Otros acoplamientos químicos de los fragmentos de anticuerpos también son conocidos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquiera de las especies de vertebrados pueden ser asignados a uno de dos tipos claramente diferenciadas, llamada kappa y lambda, basado en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellos pueden ser divididas en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, y IgA2.

"Fv de cadena única" o fragmentos "SFV" de anticuerpos comprenden los dominios de anticuerpos V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido Fv comprende además un enlace polipéptido entre los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, que permite a la sFv para formar la estructura deseada para la unión del antígeno. Para una revisión de SFV, ver The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore, eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión del antígeno, dichos fragmentos incluyen un dominio variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V<sub>L</sub>) en la misma cadena polipeptídica (V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>). Mediante el uso de un enlace que es demasiado corto para permitir una vinculación entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión del antígeno. Los diacuerpos se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161 y Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:6444-6448 (1993).

Un anticuerpo "aislado" es el que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que puedan interferir con los usos terapéuticos o de diagnóstico para el anticuerpo, y puede incluir enzimas, hormonas, y otros solutos protéicos o no protéicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95% en peso de anticuerpos determinado por el procedimiento de Lowry, y más preferiblemente más del 99% en peso, (2) a un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos N-terminal o internos de secuencia de aminoácidos por el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, la tinción de plata. Los anticuerpos aislados incluyen los anticuerpos *in situ* dentro de células recombinantes dado que por lo menos uno de los componentes del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. Por lo general, sin embargo, los anticuerpos aislados serán preparados por por lo menos una etapa de purificación.

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido en particular o un epítipo de un polipéptido en particular es uno que se une a ese polipéptido particular o epítipo de un polipéptido particular, sin vincularse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo polipéptido.

La palabra "etiqueta" cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo a fin de generar un anticuerpo "etiquetado". La etiqueta puede ser detectable por sí misma (por ejemplo etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la modificación química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable.

Por "en fase sólida" se entiende una matriz no acuosa a la que el anticuerpo de la presente invención se puede adherir. Ejemplos de fases sólidas abarcadas aquí incluyen las constituidas total o parcialmente de vidrio (por ejemplo vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poli(acrilamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En algunas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pozo de una placa de ensayo, en otros es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, como las descritas en la patente US 4.275.149.

5 Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactantes que es útil para la entrega de un medicamento (por ejemplo, un polipéptido PRO o de su anticuerpo) a un mamífero. Los componentes de los liposomas están comúnmente dispuestos en una formación de doble capa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

Una "pequeña molécula" se define en aquí por tener un peso molecular inferior a 500 Daltons.

10 El término "modular" significa afectar (por ejemplo, ya sea regular al alza, regular a la baja o controlar de otra forma) el nivel de una vía de señalización. Los procesos celulares bajo el control de la transducción de señales incluyen, pero no están limitados a, la transcripción de genes específicos, las funciones celulares normales, como metabolismo, proliferación, diferenciación, adhesión, apoptosis y supervivencia, así como los procesos anormales, como la transformación, el bloqueo de la diferenciación y metástasis.

15 "Activo" o "actividad" para los fines aquí indicados se refiere a la forma(s) de un polipéptido PRO que mantiene una actividad biológica y/o inmunológica de polipéptidos PRO nativos o de origen natural, en el que actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibitoria o estimulante) causada por un polipéptido PRO nativo o de origen natural distinta de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido PRO nativo o de origen natural y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido PRO nativo o de origen natural. Una actividad biológica preferida incluye inducir la activación de la NF- $\kappa$ B y la estimulación de la producción de las quimioquinas proinflamatorias IL-8. Otra actividad biológica preferida incluye la estimulación de las células de sangre periférica mononuclear o células CD4<sup>+</sup>. Otra actividad biológica preferida incluye la estimulación de la proliferación de los linfocitos T. Otra actividad biológica preferida incluye, por ejemplo, la liberación de TNF- $\alpha$  a partir de células THP1. 20 Una actividad alternativa es la reducción en la producción de IL-1 $\alpha$  inducida por NO (óxido nítrico) a partir del cartílago articular. Otra actividad que incluye una mejora de la síntesis de matriz en el cartílago articular. Como alternativa, otra de las actividades incluye la promoción de desglose de la matriz del cartílago articular, así como la inhibición de la síntesis de matriz. Otra actividad biológica preferida incluye una adaptación del nivel la vía de señalización de la interleucina-17 durante las etapas de leve a severa de la enfermedad inflamatoria intestinal o durante un accidente cerebrovascular. 25 30

Una actividad "inmunológica" sólo se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un polipéptido PRO nativo o de origen natural.

35 "Trastorno cartilaginoso degenerativo", describe una serie de trastornos que se caracterizan principalmente por la destrucción de la matriz del cartílago. Patologías adicionales incluye la producción de óxido nítrico, y elevada degradación de proteoglicanos. Trastornos ejemplares abarcados por esta definición, incluyen, por ejemplo, la artritis (por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica).

40 El término "enfermedad inmune relacionada" indica una enfermedad en la que un componente del sistema inmunitario de un mamífero, media o contribuye de otro modo a la morbilidad en los mamíferos. También se incluyen las enfermedades en las que la estimulación o la intervención de la respuesta inmunitaria tiene un efecto paliativo sobre la progresión de la enfermedad. Incluido dentro de este término están enfermedades inflamatorias inmune mediadas, enfermedades inmunes no inflamatorias, enfermedades infecciosas, enfermedades de inmunodeficiencia, neoplasias, etc. 45

El término "enfermedad mediada por células T" significa una enfermedad en la que las células T, directa o indirectamente, median o contribuyen de otra manera a la morbilidad en un mamífero. La enfermedad mediada por células T puede ser asociada con efectos mediados por células, los efectos mediados por linfocinas, etc., e incluso los efectos asociados a las células B si las células B son estimuladas, por ejemplo, por las linfocinas secretadas por las células T. 50

Ejemplos de enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario e inflamatorias, algunas de las cuales son inmunes o mediadas con células T, que puede ser tratadas de acuerdo con la invención incluyen el lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica progresiva (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inmune mediada), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica de menores, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal inmune mediada (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico, como la esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante, hepatobiliar enfermedades como la hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus hepatotropos), hepatitis autoinmune crónica activa, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedad inflamatoria intestinal (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al gluten y enfermedad de Whipple, por enfermedades de la piel autoinmunes o inmune mediadas, incluidas las enfermedades de la piel ampollas, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades 55 60 65

alérgicas como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón, tales como neumonías eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas al trasplante, tales como rechazo del injerto y enfermedad del injerto contra el huésped. Las enfermedades infecciosas, incluidas las enfermedades virales como el sida (VIH), hepatitis A, B, C, D y E, herpes, etc, infecciones bacterianas, infecciones por hongos, infecciones por protozoos e infecciones parasitarias. El término "cantidad efectiva" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO y/o agonistas/antagonistas que resultan en el logro de un propósito establecido en particular. Una "cantidad efectiva" de un polipéptido PRO o agonistas o antagonistas del mismo puede ser determinada empíricamente. Por otra parte, una cantidad "terapéuticamente efectiva" es una concentración o cantidad de un polipéptido PRO y/o agonista/antagonista que es eficaz para lograr un efecto terapéutico indicado. Esta cantidad también puede ser determinada empíricamente.

El término "agente citotóxico" como se usa aquí se refiere a una sustancia que inhibe o impide el funcionamiento de las células y/o causa la destrucción de las células. El término propone incluir los isótopos radiactivos (por ejemplo,  $I^{131}$ ,  $I^{125}$ ,  $Y^{90}$  y  $Re^{186}$ ), agentes quimioterapéuticos, y toxinas tales como las toxinas enzimáticamente activas de las bacterias, hongos, plantas, o de origen animal, o fragmentos de las mismas.

Un "agente de quimioterapia" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Algunos ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen adriamicina, doxorubicina, epirubicina, 5-fluorouracilo, citarabina ("Ara-C"), ciclofosfamida, tiotepa, busulfano, citoxina, taxanos, por ejemplo, paclitaxel (Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncología, Princeton, NJ), y doxetaxel (Taxotere, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia), toxotere, metotrexato, cisplatino, melfalán, vinblastina, bleomicina, etopósido, ifosfamida, mitomicina C, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, carboplatino, tenipósido, daunomicina, carminomycin, aminopterina, dactinomicina mitomicinas, esperamicinas (véase la patente US 4.675.187), melfalán y otros relacionados con las mostazas nitrogenadas. También se incluyen en esta definición agentes hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal en tumores como el tamoxifeno y el onapristone.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, en especial de las células cancerosas que sobreexpresan cualquiera de los genes aquí identificados, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento es el que reduce significativamente el porcentaje de células que sobreexpresan genes de este tipo en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención G1 y la detención de fase M. Bloqueadores clásicos de fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol, e inhibidores topo II, como la doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN como el tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Más información puede encontrarse en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente p. 13.

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan en otra celda como mediadores intercelulares. Ejemplos de las citocinas son linfocinas, monocinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Incluidas entre las citoquinas hay hormonas de crecimiento como la hormona de crecimiento humano, hormona de crecimiento humana N-metionil y hormona de crecimiento bovino, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina; prorelaxina; hormonas glicoproteínas como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno de la placenta, factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$ -, sustancia inhibidora de Müller, péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento nervioso, tales como NGF- $\beta$ , factor de crecimiento plaquetario, factores de crecimiento transformante (TGF), como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , factor de crecimiento a modo de insulina -I y -II; eritropoyetina (EPO), factores de osteoinductivos; interferones como interferón- $\alpha$ ,  $\beta$ -, y  $\gamma$ -, factores estimulantes de colonias (CSFs), como los macrófagos-CSF (M-CSF); granulocitos-macrófagos-CSF (GM-CSF), y de granulocitos-CSF (G-CSF), interleuquinas (IL), tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, o IL-17, un factor de necrosis tumoral como TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ , y otros factores polipéptidos incluyendo LIF y equipo de ligando (KL). Como se usa aquí, el término citocinas incluye a las proteínas a partir de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

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)
 */
#define _M -8 /* value of a match w

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, -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, 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, 0, _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, 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, 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}
};

```

! Tabla 1(cont.)

```

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

#define MAXJMP      16      /* max jump
#define MAXGAP      24      /* don't con          this */
#define JMPS        1024    /* max jmps
#define MX           4      /* save if th          st jmp */

#define DMAT         3      /* value of r
#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        jmp;          /* 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();

```

Tabla 1(cont.)

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two pro
* The sequences can be in upper- or lower-cas
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' ar
* Max file length is 65535 (limited by unsigne
* A sequence with 1/3 or more of its elements
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to
* Original version developed under BSD 4.3 on
*/
#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, 0xFFFFFFFF, 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)
    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 */
}

```

**main**

Tabla 1(cont.)

```

/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefe
 * to a gap in seq y.
 */
nw0
{
    char      *px, *py;      /*
    int       *ndely, *dely; /*
    int       ndelx, delx;   /*
    int       *tmp;         /* for swapping rows, rows
    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;
        }
    }
}

```

T Tabla 1(cont.)

...nw

```

for (py = seqx[1], yy = 1; yy <
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbn
    else
        mis += _day

/* update penalty for de
* favor new del over o
* ignore MAXGAP if
*/
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
*/

```

Tabla 1(cont.)

...RW

```

id = xx - yy + len1
if (mis >= delx &&
    coll[yy] =
else if (delx >= del
    coll[yy] =
    ij = dx[id]
    if (dx[id].j
    && xx >
        d
    if
        JUMP
        .score+DINS0)). {
    }
    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 {
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (1dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
    dx[id].ijmp++;
    if (++ij >= MAXJMP) {
        writejms(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)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
if (endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = coll; coll = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)coll);
}

```

Tabla 1(cont.)

```

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

#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()
{
    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();
}

```

**print**

Tabla 1(cont.)

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
    int    lx, ly;
    int    firstgap, lastgap;
{
    int          nm, i0, i1, siz0,
    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 (xbrm[*p0-'A']&xbrm[*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

Tabla 1(cont.)

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence:
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d
        ngapx, (dna)? "b
        fprintf(fx, "%s", outx);

fprintf(fx, ", gaps in second sequenc
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d
        ngapy, (dna)? "b
        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()
{
    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];
    }
}

```

...getmat

pr\_align

Tabla 1(cont.)

```

for (nn = nm = 0, more = 1; mor
    for (i = more = 0; i < 2
        /*
         * do we have n
         */
        if (!*ps[i])
            contin

        more++;

        if (pp[i].spe) {
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spe--;
        }
        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()
{
    register i;

    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr\_align

dumpblock

Tabla 1(cont.)

...dumpblock

```

(void) putc('\n', fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] !
        if (i == 0)
            num
        if (i == 0 &&
            stars
        putline(i);
        if (i == 0 &&
            fprii
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}

```

```

/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */

```

static

nums(ix)

nums

```

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(ix)

putline

```

int    ix;    {

```

Tabla 1(cont.)

```

int          i;
register char *px;

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

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from
 * 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()
{
    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';
}
}

```

...putline

tars

Tabla 1(cont.)

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_ε
 */
static
stripname(pn)
char *pn; /* file name (may
{
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));
}

```

**stripname**

## Tabla 1(cont.)

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_malloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char *jname = "/tmp/homgXXXXXX";
FILE *fj;

int cleanup(); /* cleanup tmp file */
long lseek();

/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)
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)
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';
}

```

cleanup

getseq

Tabla 1(cont.)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line
        continue;
    for (px = line; *px != '\
        if (isupper(*px)
            *py +
        else if (islower(
            *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_alloc(msg, nx, sz)
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_alloc() 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()
{
    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--)
                ;
        }
    }
}

```

...getseq

g\_alloc

readjmps

## Tabla 1(cont.)

...readjumps

```

        if (j < 0 && d
            (void
             (void
              (void
               dx[dr
            }
        else
            break;
    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, '
        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 jumps
*/
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;
}
}
}

```

Tabla 1(cont.)

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the pr
 */
writejumps(ix)                                     writejumps
{
    int ix;
    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) <
            fprintf(stderr, "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

PRO	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Comparación de proteínas	XXXXXXYYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)
% identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de residuos de aminoácidos coincidentes idénticos entre las dos secuencias polipeptídicas determinadas por ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO) = 5 dividido por 15 = 33,3%		

5

Tabla 3

PRO	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Comparación de proteínas	XXXXXXYYYYYYYZZY	(Longitud = 15 aminoácidos)
% identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de residuos de aminoácidos coincidentes idénticos entre las dos secuencias polipeptídicas determinadas por ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido PRO) = 5 dividido por 10 = 50%		

10

Tabla 4

PRO-ADN	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
Comparación de ADN	NNNNNNLLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)
% identidad de secuencia de ácido nucleico = (el número de nucleótidos de concordancia idéntica entre las dos secuencias de ácido nucleico determinadas por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico PRO-ADN) = 6 dividido por 14 = 42,9 %		

Tabla 5

PRO-ADN	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
Comparación de ADN	NNNNLLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)
% identidad de secuencia de ácido nucleico = (el número de nucleótidos de concordancia idéntica entre las dos secuencias de ácido nucleico determinadas por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico PRO-ADN) = 4 dividido por 12 = 33,3 %		

15 II. Composiciones y procedimientos de la invención

#### A. Polipéptidos PRO de longitud completa

La presente memoria proporciona secuencias de nucleótidos aisladas que codifican polipéptidos mencionados en la presente solicitud como polipéptidos PRO. En particular, cADNs que codifican varios polipéptidos PRO han sido identificados y aislados, como se revela en mayor detalle en los siguientes ejemplos. Cabe señalar que las proteínas producidas en a las rondas de expresión independientes se les pueden designar diferentes números PRO, pero el número UNQ es único para cualquier ADN dado y la proteína codificada, y no será cambiado. Sin embargo, para simplificar, en la presente memoria la proteína codificada mediante las moléculas de ácido nucleico nativos de longitud completa aquí descritas, así como todos los homólogos nativos adicionales y variantes incluidas en la definición anterior de PRO, se referirán como "Pro/número", independientemente de su origen o modo de preparación.

Como se indica en los ejemplos siguientes, varios clones de ADNc se han depositado en la ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de esos clones pueden determinarse fácilmente por el artesano calificado por la secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos de rutina en la técnica. La secuencia de aminoácidos predicha puede determinarse a partir de la secuencia de nucleótidos utilizando la habilidad de rutina. Para los polipéptidos PRO y ácidos nucleicos de codificación aquí descritos, los solicitantes han identificado lo que se cree que es el marco de lectura más identificable con la información de la secuencia disponible en el momento.

#### B. Variantes del Polipéptido PRO

Además de los polipéptidos PRO de secuencia nativa de longitud completa descritos aquí, se contempla que pueden prepararse variantes PRO. Las variantes de PRO se pueden preparar mediante la introducción de cambios de nucleótidos adecuados en el ADN de PRO, y/o por la síntesis del polipéptido PRO deseado. Los expertos en la técnica podrán apreciar que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos posteriores de la traducción del PRO, como cambiar el número o posición de los sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje a la membrana.

Las variaciones en el PRO de secuencia de longitud completa nativa o en varios dominios del PRO aquí descrito, se puede hacer, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y las directrices para mutaciones conservadoras y no conservadoras establecidas, por ejemplo, en la Patente U. S. No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, supresión o inserción de uno o más codones que codifican el PRO que resulta en un cambio en la secuencia de aminoácidos del PRO, en comparación con la secuencia nativa PRO. Opcionalmente, la variación es por la sustitución de por lo menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en una o más de los dominios del PRO. Puede insertarse orientación para determinar los residuos de aminoácidos, sustituidos o eliminados sin afectar negativamente a la actividad deseada se puede encontrar mediante la comparación de la secuencia del PRO con la de las moléculas de proteína homóloga conocidas y reducir al mínimo el número de cambios en la secuencia de aminoácidos producidos en las regiones de alto grado de homología. Sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido con otro aminoácido con propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una serina, por ejemplo sustituciones conservadoras de aminoácidos. Inserciones o deleciones, opcionalmente, pueden estar en el rango de 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede ser determinada por la realización sistemática de inserciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y el análisis de las variantes resultantes de la actividad mostrada por la secuencia de longitud completa o nativa madura.

Se proporcionan fragmentos de polipéptido PRO en este documento. Estos fragmentos se pueden trincar en el N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se compara con una proteína nativa de longitud completa. Algunos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido PRO.

Los fragmentos PRO pueden ser preparados mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Fragmentos peptídicos deseados pueden ser sintetizados químicamente. Un enfoque alternativo consiste en la generación de fragmentos PRO por digestión enzimática, por ejemplo, por el tratamiento de la proteína con una enzima conocida por cortar las proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares, o por la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislar el fragmento deseado. Sin embargo, otra técnica adecuada consiste en aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Oligonucleótidos que definen los terminos deseados del fragmento de ADN se emplean los iniciadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, fragmentos polipéptido PRO comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el polipéptido nativo PRO aquí divulgado.

En realizaciones particulares, sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el epígrafe de sustituciones preferidas. Si esas sustituciones resultaran en un cambio en la actividad biológica, entonces los cambios más importantes, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 6, o como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos, se introducen y se controlan los productos.

#### Tabla 6

Residuos originales	Sustituciones Ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	val, leu, ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln, su; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
Su (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)	prt; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

5 Las modificaciones sustanciales en la función inmunológica o la identidad del polipéptido PRO se llevan a cabo mediante la selección de sustituciones que difieren considerablemente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el ámbito de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio de destino, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos que se producen naturalmente se dividen en grupos basados en la propiedades comunes de la cadena lateral:

- 10 (1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;  
 (2) hidrofílico neutral: cys, ser, thr;  
 (3) ácido: ASP, glu;  
 (4) de base: asn, gln, su, lys, arg;  
 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro, y  
 (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

15 Las sustituciones no conservadores implicarán el intercambio de un elemento de una de estas clases por otra clase. Estos residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadora o, más preferiblemente, en los restantes sitios (no conservados).

20 Las variaciones se pueden realizar utilizando los procedimientos conocidos en el arte como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (sitio-dirigida), escaneo de alanina, y mutagénesis de PCR. Mutagénesis dirigida [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénesis 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 pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN variante PRO.

25 El análisis de escaneo de aminoácidos también puede ser empleado para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de exploración preferidos están aminoácidos relativamente pequeños, neutrales. Estos aminoácidos son la alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de exploración preferido en este grupo, ya que elimina la cadena lateral más allá del beta-carbono y tiene menos posibilidades de alterar la conformación de la cadena principal de la variante (Cunningham y Wells, Science, 30 244: 1081-1085 [1989]). La alanina es también típicamente preferida porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas (Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman &

Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 [1976]). Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, puede ser utilizado un aminoácido isotérico.

### C. Modificaciones de PRO

5 También se encuentran en el alcance del presente documento las modificaciones covalentes de PRO. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción específica de residuos de aminoácidos de un polipéptido PRO con un agente de derivación orgánica que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos N- o C-terminales del PRO. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticulación PRO con una matriz de soporte insoluble en agua o superficie para su uso en el procedimiento de purificación de anticuerpos anti-PRO, y viceversa. Agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis (diazooacetyl)-2-feniletano, glutaraldehído, N-ésteres hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres del ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidil como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes como metil-3-[(p-azidofenil) ditio] propioimidato.

15 Otras modificaciones incluyen desamidación de glutaminil y residuos asparaginil a los correspondientes residuos glutamil y aspartil, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos o seril treonil, metilación de los grupos  $\alpha$ -amino de lisina, arginina, y cadenas laterales histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, WH Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], acetilación del amino N-terminal, y amidación de cualquier grupo carboxilo C- terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido PRO incluido en el alcance del presente documento comprende alterar el patrón de glicosilación nativo del polipéptido. "La alteración del patrón de glicosilación nativo" para los propósitos de este documento tiene el sentido de suprimir una o varias fracciones de carbohidrato que se encuentra en el PRO de secuencia nativa (ya sea eliminando el sitio de glicosilación subyacente o por supresión de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el PRO de secuencia nativa. Además, la frase incluye los cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implica un cambio en la naturaleza y proporciones de las diferentes fracciones de hidratos de carbono presentes.

25 La adición de sitios de glicosilación al polipéptido PRO puede lograrse mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos. La alteración puede ser, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por uno o más residuos de serina o treonina al PRO de secuencia nativa (para sitios de glicosilación O-ligados). La secuencia de aminoácido PRO, opcionalmente, puede ser modificada a través de cambios a nivel del ADN, en particular por la mutación del ADN que codifica el polipéptido PRO en las bases preseleccionadas de tal manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de fracciones de hidratos de carbono en el polipéptido PRO es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Estos procedimientos se describen en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada 11 de septiembre 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Biochem., Pp. 259-306 (1981).

La eliminación de restos de hidratos de carbono presentes en el polipéptido PRO puede lograrse química o enzimáticamente o mediante la sustitución por mutación de los codones que codifican para los residuos de aminoácidos que sirven como objetivos de glicosilación. Técnicas de deglicosilación química son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y por Edge et al., Anal. Biochem., 118:131 (1981). La digestión enzimática de las fracciones de hidratos de carbono en los polipéptidos se puede lograr mediante el uso de una variedad de endo-y exo-glicosidasas como se describe en Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otro tipo de modificación covalente de PRO incluye la vinculación del polipéptido PRO a uno de una variedad de polímeros proteicos, por ejemplo, polietilén glicol (PEG), polipropilén glicol, o polioxiálquilenos, en la forma prevista en las patentes US 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337.

El PRO descrito en el presente documento también puede ser modificado de manera que forme una molécula quimérica que comprende PRO fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogos.

En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del PRO con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede enlazarse un anticuerpo anti-etiqueta de forma selectiva. La etiqueta epítipo se coloca generalmente en el amino o carboxilo-terminal de la PRO. La presencia de este tipo de formas de epítipo etiquetado del PRO pueden ser detectadas utilizando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. Además, el suministro del epítipo etiqueta permite que el PRO sea fácilmente purificado por afinidad de purificación mediante un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo etiqueta. Varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Algunos ejemplos son etiquetas poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gli); polipéptido etiqueta de la gripe HA y su anticuerpo 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)], la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 de la misma [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)], y la etiqueta glicoproteína D del virus del herpes simple (GD) y su

anticuerpo [Paborsky et al., *Protein Engineering*, 3 (6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido bandera [Hopp et al., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)], el péptido epítotope KT3 [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)], un péptido epítotope  $\alpha$ -tubulina [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)], y la etiqueta péptido proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87:6393-6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del PRO con una inmunoglobulina o de una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también conocida como "immuno adhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones Ig preferentemente incluyen la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un polipéptido PRO en lugar de por lo menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, CH1, CH2 y regiones CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina ver también Patente EE.UU. No. 5428130 expedida 27 de junio 1995.

En una realización adicional, los polipéptidos PRO del presente documento también pueden ser modificados de manera que formen una molécula quimérica constituida por un polipéptido PRO fusionado a una cremallera de leucina. Se han descrito varios polipéptidos cremallera de leucina en la técnica. Ver, por ejemplo, Landschulz et al., *Science*, 240:1759 (1988); WO 94/10308; Hoppe et al., *FEBS Letters*, 344:1991 (1994); Maniatis et al., *Nature*, 341:24 (1989). Se cree que el uso de una cremallera de leucina fusionada a un polipéptido PRO puede ser conveniente para ayudar en la dimerización o trimerización de un polipéptido PRO soluble en solución. Los expertos en la técnica apreciarán que la cremallera de leucina puede ser fusionada en cualquier N-o C-terminal de la molécula de PRO.

#### D. Preparación de PRO

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de PRO mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico PRO. Se contempla, por supuesto, que los procedimientos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, puedan ser utilizados para preparar PRO. Por ejemplo, la secuencia PRO, o partes de la misma, puede ser producida por la síntesis directa de péptidos, utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, WH Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* podría llevarse a cabo utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Varias partes del PRO pueden ser sintetizadas químicamente por separado y combinadas utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el PRO de longitud completa.

##### 1. Aislamiento del ADN que codifica PRO

El ADN que codifica PRO puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee los ARNm PRO y lo expresar en un nivel detectable. En consecuencia, el ADN humano PRO puede ser convenientemente obtenido a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejidos humanos, como se describe en los ejemplos. El gen que codifica PRO también puede obtenerse de una biblioteca genómica o por procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Las bibliotecas pueden ser examinadas con sondas (como los anticuerpos del PRO u oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El examen de la biblioteca de ADN o genómica con la sonda seleccionada podrá llevarse a cabo utilizando los procedimientos estándar, 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 PRO es utilizar metodología de PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los ejemplos a continuación describen técnicas para examinar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótido seleccionadas como sondas deben ser de longitud suficiente y suficientemente inequívocas de forma que los falsos positivos se minimicen. El oligonucleótido preferentemente es etiquetado de tal manera que puede ser detectado en la hibridación de ADN en la biblioteca que están siendo revisada. Los procedimientos de etiquetado son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radioetiquetas como ATP etiquetado <sup>32</sup>P, biotilación o etiquetado por enzima. Las condiciones de hibridación, incluyendo estringencia moderada y alta severidad, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de la biblioteca se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas, como GenBank o bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (ya sea a nivel de aminoácidos o nucleótidos) en regiones definidas de la molécula o en toda la longitud de la secuencia completa se puede determinar utilizando los procedimientos conocidos en la técnica y como se describe aquí.

Los ácidos nucleicos que tienen secuencia que codifica proteínas se pueden obtener mediante el examen del cADN

seleccionado o librerías genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida aquí descrita por primera vez, y si es necesario, utilizando los procedimientos convencionales de extensión como se describe en primer Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar los precursores y las sustancias intermedias de procesamiento de ARNm que puede no haber sido inversamente transcrita en cADN.

5

## 2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped son transfectadas o transformadas con la expresión o la clonación vectores aquí descritos para producción de PRO y se cultivan en medios de cultivo convencionales modificados según sea apropiado para inducir a los promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el artesano, sin experimentación indebida. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook *et al.*, *supra*.

15

Los procedimientos de transfección de células eucariotas y la transformación de células procariotas son generalmente conocidos por el experto en la materia, por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CAPO}_4$ , mediada por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza mediante técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio empleando cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección por *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de las células de ciertas plantas, como se describe en Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada 29 de junio 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, puede ser empleado el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y Van der Eb, *Virology*, 52:456-457 (1978). Aspectos generales de las transfecciones de sistema de célula huésped de mamíferos se han descrito en Patente U. S. No. 4.399.216. Transformaciones en levaduras suelen llevarse a cabo según el procedimiento de Van Solingen, *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE.UU.)*, 76:3829 (1979). Sin embargo, otros procedimientos para la introducción de ADN en las células, tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policonaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina, también pueden ser utilizados. Por diversas técnicas para la transformación de células de mamíferos, ver Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185:527-537 (1990) y Mansour *et al.*, *Nature*, 336:348-352 (1988).

Las células huésped apropiadas para clonar o expresar el ADN en los vectores incluyen aquí procariotas, levaduras, o células eucariotas superiores. Procariotas adecuadas incluyen pero no están limitados a las eubacterias, tales como bacterias Gram-negativas o Gram-positivas, por ejemplo, enterobacterias, como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles al público, tales como *E. coli* Cepa K12 MM294 (ATCC 31446); *E. coli* X1776 (ATCC 31537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27325) y K5 772 (ATCC 53635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen enterobacterias como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como Bacilos como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgada en DD 266710 publicado 12 de abril 1989), *Pseudomonas* como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitantes. La cepa W3110 es un huésped preferido en particular o de los huéspedes parientes, ya que es una cepa huésped común para fermentaciones del producto de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped segrega cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede ser modificada para efectuar una mutación genética en los genes que codifican las proteínas endógenas para el huésped, con ejemplos de dichos huéspedes, incluida *E. coli* Cepa W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; *E. coli* Cepa W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* Cepa W3110 27C7 (ATCC 55244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP OMPT kan<sup>r</sup>*; *E. coli* Cepa W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP OMPT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>*; *E. coli* cepa W3110 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente a la kanamicina, y una cepa *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante divulgada en Patente U. S. No. 4.946.783 expedido 7 de agosto 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR y otras reacciones de la polimerasa de ácido nucleico.

Además de las células procariotas, microorganismos eucarióticos como los hongos filamentosos y levaduras son huéspedes adecuados de clonación o expresión para vectores de codificación de PRO. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo eucariótico inferior huésped usado comúnmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 (1981); EP 139.383 publicado 2 de mayo 1985]; huésped *Kluyveromyces* (Patente U. S. No. 4.943.529; Fleeer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 [1991]), tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, *J. Bacteriol.*, 154 (2) :737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12424), *K. bulgaricus* (ATCC 16045), *K. wickerhamii* (ATCC 24178), *K. waltii* (ATCC 56500), *K. drosophilorum* (ATCC 36906; 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 reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538 publicado 31 de octubre 1990) y hongos filamentosos, como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyopocladium* (WO 91/00357 publicada 10 de enero 1991), y huéspedes *Aspergillus* como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, *Gene*, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 81:1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, *EMBO J.*, 4:475-479

65

[1985]). Levaduras metilotróficas son adecuadas y se incluyen aquí, pero no se limitan a, la levadura capaz de crecer en metanol seleccionada entre los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras se pueden encontrar en C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de PRO glucosilado son derivadas de organismos multicelulares. Ejemplos de las células de invertebrados incluyen células de insecto como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9 o células de *Spodoptera* High 5, así como las células vegetales. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos útiles incluyen ovario de hámster chino (CHO) y células COS. Más ejemplos específicos incluyen la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651), la línea de riñón de embriones humanos (293 o 293 células subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77:4216 [1980]); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 [1980]); células del pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); las células del hígado humano (Hep G2, HB 8065), y del tumor mamario del ratón (MMT 060562, ATCC CCL51). La selección de la célula huésped apropiada se considera dentro de la habilidad en la técnica.

### 3. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (es decir, ADNc o ADN genómico) que codifica PRO puede ser insertado en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Diversos vectores están disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partículas virales o fagos. La secuencia de ácido nucleico adecuada puede ser insertada en el vector por una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio(s) de restricción apropiado endonucleasa utilizando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no están limitados a uno o más de una secuencia de señales, 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 contengan uno o más de estos componentes utiliza técnicas de ligadura estándar que son conocidas para los expertos en la materia.

El PRO se puede producir de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que tenga un punto de corte específico en el N-terminal de la proteína madura o polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte de ADN que codifica el PRO que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procarionta seleccionada, por ejemplo, desde el grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp, o líderes enterotoxina II estables al calor. Para la secreción de la levadura la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de la levadura, el líder de factor alfa (incluyendo líderes  $\alpha$ -factor *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, éste se describe en Patente U. S. No. 5.010.182), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder glucoamilasa *C. albicans* (EP 362.179 publicado 4 de abril 1990), o la señal descrita en WO 90/13646 publicada 15 de noviembre 1990. En la expresión de células de mamíferos, se pueden utilizar secuencias de señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tales como las secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma o de especies relacionadas, así como líderes de secreción viral.

Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite que el vector a replicar en una o más células huésped seleccionadas. Estas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación a partir del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen plásmido  $2\mu$  es adecuado para las levaduras y los diversos orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero.

Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un gen de selección, también llamado marcador seleccionable. Genes de selección típicas que codifican las proteínas (a) confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, o tetraciclina, (b) complementan deficiencias del auxotrófico, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en los medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de los mamíferos son los que permiten la identificación de las células competentes para tomar el ácido nucleico que codifica PRO, como DHFR o timidina kinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea el DHFR de tipo silvestre es la línea celular CHO, deficiente en actividad DHFR, preparado y difundido como se describe en Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su uso en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de 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* ofrece un marcador de selección de una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 [Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)].

Los vectores de expresión y de clonación por lo general contienen un promotor unido operativamente a la secuencia de ácidos nucleicos de codificación de PRO para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por una variedad de células huésped potenciales son bien conocidos. Promotores adecuados para su uso con huéspedes procariontas incluyen los sistemas promotores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa [Chang et al., *Nature*, 275:615 (1978); Goeddel et al.,

Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptófano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36.776], y los promotores híbridos como el promotor tac [Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 80:21-25 (1983)]. Promotores para uso en sistemas bacterianos también incluirán una secuencia Shine-Dalgarno (SD) operativamente unida a la del ADN que codifica PRO.

Ejemplos de secuencias de promoción adecuadas para su uso con huéspedes de la levadura son los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas glucolíticas [Hess et al., J. Adv. Enzima reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tales como la enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, decarboxilasa piruvato, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa, y glucoquinasa.

Otros promotores de la levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de la transcripción controladas por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras del alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y las enzimas responsables de la utilización de la maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen más detalladamente en EP 73.657.

La transcripción PRO desde vectores en las células huésped de mamíferos es controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus como el virus de la polio, el virus de la viruela aviar (UK 2.211.504 publicado 5 de julio 1989), adenovirus (como Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y el virus del simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de los promotores de golpes de calor, a condición que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de la célula huésped.

La transcripción de un ADN que codifica el PRO por eucariotas superiores puede aumentarse mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Potenciadores son elementos de ADN de acción cis, generalmente alrededor de 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Muchas secuencias potenciadoras son conocidas a partir de los genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de la célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en la parte tardía del origen de replicación (100-270 pb), el citomegalovirus estimulador temprano del promotor, el potenciador polio en la parte tardía del origen de replicación, y potenciadores adenovirus. La mejora puede ser empalmada en el vector en una posición 5' ó 3' a la secuencia de codificación de PRO, pero es preferiblemente situado en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, o células humanas nucleadas de otros organismos pluricelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y la estabilización del ARNm. Estas secuencias están comúnmente disponibles en el 5' y, ocasionalmente 3', las regiones no traducidas de ADNs eucariótico o viral o cADNs. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del mRNA que codifica PRO.

Sin embargo, otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis de PRO en el cultivo de células recombinantes de vertebrados se describen en el Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058.

#### 4. Detección de amplificación/expresión del gen

La amplificación y/o expresión génica pueden ser medidas directamente en una muestra, por ejemplo, por el Southern blotting convencional, Northern blotting para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77:5201-5205 [1980]), dot blotting (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda debidamente etiquetada, con base en las secuencias previstas aquí. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN, o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden ser etiquetados y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está ligado a una superficie, de modo que en la formación de duplex en la superficie, puede ser detectada la presencia de anticuerpo unido a la doble cara.

La expresión de genes, como alternativa, se puede medir por procedimientos inmunológicos, como la tinción inmunohistoquímica de las 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 ensayos de líquidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser preparados en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido PRO de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN aquí proporcionadas o contra de la secuencia exógena fusionada a PRO ADN y que codifica un epítope de anticuerpo específico.

#### 5. Purificación de polipéptido

Las formas de PRO pueden recuperarse de un medio de cultivo o de lisados de la célula huésped. Si está unido a la membrana, puede ser liberado de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o por digestión enzimática. Las células empleadas en la expresión de PRO pueden ser alteradas por diversos medios físicos o químicos, como los ciclos hielo-deshielo, sonicación, alteración mecánica, o de agentes de lisado de células.

Se puede desear purificar el PRO a partir de proteínas de células recombinantes o polipéptidos. Los siguientes procedimientos son ejemplares de los procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía de sílice o en una resina de intercambio catiónico, como DEAE; cromatofocalización, SDS-PAGE, precipitación de sulfato de amonio; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75, columnas Sepharose proteína A para eliminar los contaminantes, tales como IgG, y columnas de metal quelante para unir formas epítipo-etiquetadas de PRO. Varios procedimientos de purificación de proteínas pueden ser empleados y tales 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 fase(s) de purificación seleccionada dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción y el PRO producido particular.

#### E. Usos para PRO

Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) que codifican PRO tienen diversas aplicaciones en la técnica de la biología molecular, incluidos usos como sondas de hibridación, en la cartografía de cromosoma y de genes y en la generación de ADN y ARN anti sentido. El ácido nucleico PRO también será útil para la preparación de polipéptidos PRO por las técnicas recombinantes descritas aquí.

El gen PRO de la secuencia nativa de longitud completa, o partes del mismo, pueden ser utilizados como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el cADN PRO de longitud completa o para aislar aún cADNs de otro tipo (por ejemplo, los que codifican variantes de origen natural de PRO o PRO de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada a la secuencia PRO nativa aquí descrita. Opcionalmente, la longitud de las sondas será aproximadamente de 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación se pueden derivar por lo menos en parte de las regiones nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa donde esas regiones se pueden determinar sin experimentación indebida o de las secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos potenciadores y los intrones de PRO secuencia nativa. A modo de ejemplo, un procedimiento de selección constará de aislar la región codificadora del gen PRO con la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de alrededor de 40 bases. Las sondas de hibridación pueden ser etiquetadas por una variedad de etiquetas, incluyendo radionucleótidos como  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ , o etiquetas enzimáticas como fosfatasa alcalina, junto a la sonda a través sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Se pueden utilizar sondas marcadas con una secuencia complementaria a la del gen PRO del presente documento para cribar las bibliotecas de cADN humano, ADN genómico o ARNm para determinar con cuales elementos de esas bibliotecas se hibridiza la sonda. Técnicas de hibridación se describen en mayor detalle en los siguientes ejemplos.

Cualquier secuencias EST aquí divulgada en la presente solicitud pueden ser empleadas de forma similar como sondas, utilizando los procedimientos descritos aquí.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos PRO incluyen oligonucleótidos antisentido o sentido que comprende una secuencia de ácido nucleico de cadena simple (ya sea ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias PRO ARNm objetivo (sentido) o PRO ADN (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden un fragmento de la región codificante del ADN PRO. Este fragmento está constituido en general por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, de preferencia de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La habilidad de derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basado en una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (*Cancer Res.* 48:2659, [1988]) y van der Krol et al. (*BioTechniques*, 6:958, [1988]).

La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido a secuencias de ácido nucleico objetivo resulta en la formación de dúplex que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia objetivo por uno de varios medios, incluida la degradación mejorada de los dúplex, la terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. Los oligonucleótidos antisentido por consiguiente, pueden utilizarse para bloquear la expresión de las proteínas PRO. Oligonucleótidos antisentido o sentido cabe mencionar además que los oligonucleótidos que tienen estructuras azúcar fosfodiéster modificadas (u otras uniones azúcar, tales como las descritas en WO 91/06629) y en donde dichos vínculos azúcar son resistentes a las nucleasas endógenas. Estos oligonucleótidos con enlaces azúcar resistentes son estables *in vivo* (por ejemplo capaz de resistir a la degradación enzimática), pero que mantienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a las secuencias de nucleótidos objetivo.

Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen los oligonucleótidos que se unen covalentemente a fracciones orgánicas, tales como los descritos en el WO 90/10048, y otras fracciones que aumentan la afinidad de los oligonucleótidos para una secuencia de ácido nucleico objetivo, como la poli-(L-lisina). Más aún, los agentes de intercalado, como elipticina y agentes alquilantes o complejos metálicos pueden asociarse a los oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar especificidades de unión de los oligonucleótidos antisentido o sentido de la secuencia de

nucleótidos objetivo.

5 Los oligonucleótidos antisentido o sentido pueden ser introducidos en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos objetivo por cualquier procedimiento de transferencia de genes, incluyendo, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CAPO<sub>4</sub>, electroporación, o mediante el uso de vectores de transferencia génica, tales como virus de Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido sentido o antisentido se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos objetivo se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, pero no están limitados a, aquellos derivados de los retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de doble copia designado DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

15 Los oligonucleótidos sentido o antisentido también pueden ser introducidos en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos objetivo mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión del ligando, como se describe en la WO 91/04753. Moléculas de unión del ligando adecuadas incluyen, pero no se limitan a, los receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas, u otros ligandos que se unen a los receptores de superficie celular. Preferentemente, la conjugación de la molécula de unión del ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión del ligando para unirse a su molécula o receptor correspondiente, o bloquear la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

20 Alternativamente, un oligonucleótido sentido o antisentido puede ser introducido en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos objetivo mediante la formación de un complejo oligonucleótido lipídico, como se describe en el WO 90/10448. El complejo oligonucleótido-lipídico sentido o antisentido está preferentemente dissociado dentro de la célula por una lipasa endógena.

25 Las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido son por lo general, de por lo menos aproximadamente 5 bases de longitud, aproximadamente de 10 bases de longitud, aproximadamente de 15 bases de longitud, cerca de 20 bases de longitud, cerca de 25 bases de longitud, aproximadamente de 30 bases de longitud, aproximadamente de 35 bases de longitud, aproximadamente de 40 bases de longitud, aproximadamente de 45 bases de longitud, aproximadamente de 50 bases de longitud, aproximadamente de 55 bases de longitud, aproximadamente de 60 bases de longitud, aproximadamente de 65 bases de longitud, aproximadamente de 70 bases de longitud, aproximadamente de 75 bases de longitud, aproximadamente de 80 bases de longitud, aproximadamente de 85 bases de longitud, aproximadamente de 90 bases de longitud, aproximadamente de 95 bases de longitud, aproximadamente de 100 bases de longitud, o más.

35 Las sondas también pueden ser empleadas en las técnicas PCR para generar un conjunto de secuencias para la identificación de secuencias codificadoras PRO de estrecha relación.

40 Las secuencias de nucleótidos que codifican un PRO también puede ser utilizadas para construir sondas de hibridación para la identificación del gen que codifica el PRO y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos aquí descritas pueden ser asignadas a un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, el análisis de ligamiento en contra de marcadores cromosómicos conocidos, y la detección de la hibridación con bibliotecas.

45 Cuando las secuencias codificadoras de PRO codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, donde el PRO es un receptor), el PRO puede utilizarse en los ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción vinculante. Mediante tales procedimientos, pueden ser identificados los inhibidores de la interacción de unión del ligando/receptor. Las proteínas implicadas en tales interacciones de enlace pueden ser utilizadas para detectar péptido o inhibidores de moléculas pequeñas o agonistas de la interacción vinculante. Además, el receptor PRO puede utilizarse para aislar ligando(s) correlativo. Pueden ser diseñadas pruebas de detección para encontrar los compuestos de plomo que imitan la actividad biológica de un PRO nativo o un receptor de PRO. Estas pruebas de detección se incluirán ensayos susceptibles de selección de alto rendimiento de las bibliotecas químicas, haciéndolas particularmente adecuadas para la identificación de fármacos candidatos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas previstas incluyen compuestos orgánicos sintéticos o inorgánicos. Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, pruebas de detección bioquímica, inmunoensayos y los ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

60 Los ácidos nucleicos que codifican PRO o sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales transgénicos o bien animales "knock out" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y evaluación de reactivos terapéuticos. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgen, dicho transgen se introdujo en el animal o un antepasado de los animales en una etapa pre-natal, por ejemplo, embrionaria. Un transgen es un ADN que se integra en el genoma de una célula de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, de ADNc que codifica PRO puede utilizarse para clonar ADN genómico que codifica PRO de conformidad con las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen las células que expresan el ADN que codifica PRO. Procedimientos para la generación de animales transgénicos, en particular animales como ratones o ratas, se han convertido en tradicionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente U. S. Nos. 4.736.866 y 4.870.009. Normalmente, las células particulares se

habrán de orientar para la incorporación del transgen PRO con potenciadores del tejido específico. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgen que codifica PRO introducido en la línea germinal de los animales en las fases embrionarias pueden utilizarse para examinar el efecto de incremento en la expresión del ADN que codifica PRO. Estos animales pueden ser utilizados como animales probadores de los reactivos pensados para conferir protección para, por ejemplo, las condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. Según esta característica del presente documento, un animal es tratado con el reactivo y una incidencia menor de la patología, en comparación con animales no tratados que llevan el transgen, indicaría una intervención terapéutica potencial para la condición patológica.

Alternativamente, los homólogos no humanos de los PRO pueden ser utilizados para construir un animal PRO "Knock Out" que tiene un gen defectuoso o alterado de codificación PRO como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno de codificación PRO y de ADN genómico alterado de codificación PRO introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica PRO puede utilizarse para clonar la codificación del ADN genómico PRO de conformidad con las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico de codificación de PRO puede ser eliminada o sustituida por otro gen, como un gen que codifica para un marcador de selección que puede ser usado para monitorear la integración. Por lo general, varias kilobases de ADN flanqueado no alterado (tanto en los extremos 5' como 3') están incluidos en el vector [Véase por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de los vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y son seleccionadas células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno [ver, por ejemplo, Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. Las celdas seleccionadas se inyectan luego en un blastocito de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [ver, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson EJ, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Un embrión quimérico puede ser implantado entonces en un animal foster hembra pseudopreñada adecuado y el embrión llevado a término para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN recombinado homológamente en sus células germinales se puede identificar por las técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente. Los animales knock-out se pueden caracterizar por ejemplo, por su capacidad para defenderse de ciertas patologías, así como para su desarrollo de patologías debido a la ausencia del polipéptido PRO.

El ácido nucleico que codifica polipéptidos PRO también puede ser utilizado en la terapia génica. En las aplicaciones de la terapia génica, se introducen genes en las células a fin de lograr la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente efectivo, por ejemplo para la sustitución de un gen defectuoso. La "terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencional cuando se logra un efecto duradero por un único tratamiento, y la administración de agentes terapéuticos del gen, lo que implica la administración de una vez o repetida de ADN o ARNm terapéuticamente efectiva. ARNs y ADNn antisentido pueden utilizarse como agentes terapéuticos para el bloqueo de la expresión de ciertos genes *in vivo*. Ya se ha demostrado que oligonucleótidos antisentido cortos pueden ser importados en las células donde actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por la absorción limitada por la membrana celular. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden ser modificados para mejorar su absorción, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos fosfodiéster con carga negativa por parte de grupos sin carga.

Hay una variedad de técnicas disponibles para la introducción de ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a las células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped deseado. Técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE dextrano, el procedimiento de precipitación de fosfato de calcio, etc. La técnica de transferencia génica *in vivo* actualmente preferida incluye la transfección con vectores virales (por lo general retrovirales) y la transfección mediada proteína-liposomas de la cápside viral (Dzau et al., Trends in Biotechnology, 11: 205-210 [1993]). En algunas situaciones es conveniente proporcionar a la fuente de ácidos nucleicos un agente que se dirige a las células objetivo, como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie de la célula o la célula objetivo, un ligando para un receptor en la célula objetivo, etc.. Donde se emplean liposomas, proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie de la célula asociada con endocitosis puede ser utilizado para la orientación y/o para facilitar la captación, por ejemplo, proteínas de cápside o fragmentos las mismas para un tipo de célula en particular, los anticuerpos para las proteínas que se someten a la internalización en el ciclo, las proteínas que identifican localizaciones intracelulares y mejoran la vida media intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem., 262: 4429-4432 (1987), y Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 87: 3410-3414 (1990). Para el examen de gen marcado y protocolos de terapia génica ver Anderson et al., Science, 256: 808-813 (1992).

Los polipéptidos PRO aquí descritos también pueden ser empleados como marcadores de peso molecular para fines de electroforesis de proteínas y las secuencias de ácido nucleico aisladas pueden ser utilizadas para expresar esos marcadores de forma recombinante.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos PRO o fragmentos de los mismos aquí descritos son útiles para la identificación de los cromosomas. En este sentido, existe una continua necesidad de identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que relativamente pocos reactivos marcadores de cromosomas, están actualmente disponibles basados en datos de la secuencia real. Cada molécula de ácido nucleico de PRO del presente documento

se puede utilizar como un marcador del cromosoma.

Los polipéptidos PRO y las moléculas de ácido nucleico descritos en el presente documento también pueden ser usados para el diagnóstico de tipificación de tejidos, donde los polipéptidos PRO de la presente invención pueden ser expresados diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferentemente en un tejido enfermo en comparación con un tejido normal del mismo tipo de tejido. Moléculas de ácido nucleico de PRO se utilizarán para la generación de sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y el análisis Western.

Los polipéptidos PRO descritos aquí también pueden ser empleados como agentes terapéuticos. Los polipéptidos PRO del presente documento se pueden formular de acuerdo a los procedimientos ya conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, donde el mismo producto del PRO se combina en una mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Se preparan formulaciones terapéuticas para el almacenamiento, mezclando el principio activo que tiene el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores opcionales fisiológicamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como el ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como la albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona, aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos como glucosa, manosa, o dextrina; agentes quelantes, como EDTA, alcoholes de azúcar como el manitol o sorbitol, contraiones formadores de sales tales como sodio, y/o tensioactivos no iónicos como Tween<sup>™</sup>, PLURONICS<sup>™</sup> o PEG.

Las formulaciones que se utilizarán para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto es fácilmente logrado por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y la reconstitución.

Las composiciones terapéuticas aquí descritas en general, se colocan en un recipiente con un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial con un tapón perforable por una aguja hipodérmica.

La vía de administración está de acuerdo con los procedimientos conocidos, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, vía intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, administración tópica, o por sistemas de liberación sostenida.

Las dosis y las concentraciones del fármaco deseadas de composiciones farmacéuticas del presente documento pueden variar dependiendo del uso particular previsto. La determinación de la dosis apropiada o vía de administración está dentro de la habilidad de un médico ordinario. Experimentos en animales proporcionan orientación fiable para la determinación de las dosis eficaces para la terapia humana. El escalado entre especies de dosis eficaces se puede realizar siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics" In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi et al., Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp. 42-96.

Cuando se emplea administración *in vivo* de un polipéptido PRO o agonistas o antagonistas del mismo, las cantidades de dosis normal pueden variar desde aproximadamente 10 ng / kg hasta un máximo de 100 mg / kg de peso corporal del mamífero o más por día, preferiblemente aproximadamente de 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. Orientación en cuanto a las dosis y procedimientos particulares de la prestación se ofrece en la literatura, véase, por ejemplo, U. S. Pat. N<sup>o</sup> 4.657.760; 5.206.344O 5.225.212. Se prevé que las diferentes formulaciones serán efectivas para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, que la administración dirigida a un órgano o tejido, por ejemplo, puede requerir la entrega de una manera diferente de aquella de otro órgano o tejido.

Cuando se desea la administración de liberación sostenida de un polipéptido PRO en una formulación con características de liberación adecuadas para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que requiera la administración del polipéptido PRO, se contempla la microencapsulación del polipéptido PRO. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación sostenida se ha realizado con éxito con la hormona de crecimiento humano (rhGH), interferón-(rhIFN-), interleucina-2, y MN rgp120. Johnson et al., Nat. Med., 2:795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Allí., 27:1221-1223 (1993); Hora et al., Bio / Technology, 8:755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Poly(lactide Polyglycolide) Microsphere Systems in Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", Powell y Newman, eds, (Plenum Press: New York, 1995), pp. 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399 y la patente US 5.654.010.

Las formulaciones de liberación sostenida de estas proteínas se desarrollaron usando polímero de ácido poli-láctico-coglicólico (PLGA) debido a su biocompatibilidad y la amplia gama propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, se pueden eliminar rápidamente en el cuerpo humano. Por otra parte, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar desde meses a años, dependiendo de su peso molecular y la composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer," en: M. Chasin and R. Langer (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems (Marcel Dekker: Nueva York, 1990), pp. 1-41.

La presente memoria comprende procedimientos de detección para identificar los compuestos que imitan el polipéptido PRO (agonistas) o prevenir el efecto del polipéptido PRO (antagonistas). Pruebas de detección de candidatos a fármacos antagonistas están diseñadas para identificar los compuestos que se unen o acomplejan con los polipéptidos PRO codificados por los genes aquí identificados, o interferir con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Estas pruebas de detección incluirán ensayos susceptibles de selección de alto rendimiento de las bibliotecas químicas, que las hace particularmente adecuadas para la identificación de fármacos candidatos de molécula pequeña.

Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, pruebas de detección bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos para antagonistas son comunes en que se llaman para ponerse en contacto con el fármaco candidato con un polipéptido PRO codificado por un ácido nucleico aquí identificado en las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede ser aislado o detectado en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido PRO codificado por el gen aquí identificado o el fármaco candidato es inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no-covalente en general se logra mediante el revestimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido PRO y secado. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido PRO para ser inmovilizado puede ser utilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del componente no inmovilizado, que puede ser etiquetado por una etiqueta detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se completa, se retiran los componentes no reaccionados, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado lleva una etiqueta detectable, la detección de la etiqueta inmovilizada en la superficie indica que se produjeron complejos. Cuando el componente de origen no inmovilizado no lleva una etiqueta, los complejos pueden ser detectados, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo etiquetado que une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa pero no se une a un polipéptido PRO particular codificado por un gen aquí identificado, su interacción con el polipéptido se puede analizar por procedimientos bien conocidos para la detección de interacciones proteína-proteína. Estos ensayos incluyen procedimientos tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulado, co-inmunoprecipitación, y co-purificación a través de gradientes o columnas de cromatografía. Además, las interacciones proteína-proteína pueden ser controlados por medio de un sistema genético basado en levadura descrita por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London), 340:245-246 [1989]); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 88:9578-9582 [1991]) Según lo divulgado por Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:5789-5793 (1991). Muchos de los activadores de la transcripción, tales como levadura GAL4, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión al ADN, el otro funcionando como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura se describe en las publicaciones anteriores (por lo general referido como el "sistema dos híbridos") se aprovecha de esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, uno en que la proteína objetivo está fusionada con el dominio de unión a ADN de GAL4, y otro, en el que las proteínas de activación candidatas se funden con el dominio de activación. La expresión de un GAL1-*lacZ* gen reportero bajo control de un promotor GAL4 activado depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos de interacción se detectan con un sustrato cromogénico para  $\beta$ -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para la identificación de las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos está disponible en el mercado por Clontech. Este sistema también se puede extender para mapear dominios proteína implicados en las interacciones proteína específicas, así como para identificar los residuos observados de aminoácidos que son esenciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido PRO identificado aquí y otros componentes intra- o extracelulares pueden ser probados como sigue: por lo general se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular en las condiciones y durante un tiempo que permita la interacción y la unión de los dos productos. Para probar la capacidad de un compuesto candidato que inhibe la unión, la reacción se ejecuta en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, puede ser añadido un placebo a una tercera mezcla de reacción, para servir como control positivo. La unión (formación de complejos) entre la sustancia de ensayo y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla es controlada como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción(es) de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene la sustancia de ensayo indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su socio de reacción.

Para análisis de los antagonistas, el polipéptido PRO puede ser añadido a una célula junto con el compuesto a evaluar para una actividad determinada y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en la presencia del polipéptido PRO indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO. Alternativamente, los antagonistas pueden ser detectados mediante la combinación del polipéptido PRO y un antagonista potencial con receptores polipéptido PRO unido a la membrana o receptores recombinantes en condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido PRO puede ser etiquetado, como por radiactividad, de forma que el número de

moléculas de polipéptido PRO que se unen al receptor pueden ser utilizadas para determinar la eficacia de los antagonistas potenciales. El gen que codifica el receptor pueden ser identificadas por diversos procedimientos conocidos por quienes tienen habilidad en la técnica, por ejemplo, planificación de ligando y clasificación FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1 (2): Chapter 5 (1991). Preferiblemente, el clon de expresión se emplea donde el ARN poliadenilado se prepara a partir de una célula de respuesta al polipéptido PRO y una biblioteca de ADNc creado a partir de este ARN se divide en grupos y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no responden al polipéptido PRO. Las células transfectadas que se cultivan en láminas de vidrio están expuestas a la polipéptido PRO etiquetado. El polipéptido PRO puede ser etiquetado por una variedad de medios, incluida la yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína cinasa de sitio específico. Tras la fijación y la incubación, los portaobjetos son sometidos a análisis de autorradiografía. Son identificados grupos positivos y son preparados sub-grupos y son re-transfectados mediante una sub-agrupación y re-proceso de selección interactivo, obteniendo eventualmente un único clon que codifica el receptor putativo.

Como un procedimiento alternativo para la identificación del receptor, polipéptido PRO etiquetado puede ser unido por fotoafinidad con la membrana de la célula o preparaciones extracto que expresan la molécula del receptor. Material reticulado se resuelve por PAGE y se exponen a película de rayos X. El complejo etiquetado que contiene el receptor puede ser extirpado, resuelto en fragmentos peptídicos, y sometido a micro-secuenciado de proteína. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de micro-secuenciado se utiliza para diseñar una serie de sondas de oligonucleótidos degenerados para examinar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamífero o un preparado de membrana que expresa el receptor se incubaría con la etiqueta polipéptido PRO en presencia del compuesto candidato. La capacidad del compuesto para mejorar o bloquear esta interacción podría medirse entonces.

Más ejemplos específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con polipéptido PRO, y, en particular, los anticuerpos incluyendo, sin limitación, anticuerpos poli- y monoclonales y los fragmentos de anticuerpos, de anticuerpos de una sola cadena, los anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de estos anticuerpos o fragmentos, así como los anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido PRO que reconoce el receptor, pero que no imparte ningún efecto, lo que inhibe competitivamente la acción del polipéptido PRO.

Otro antagonista potencial del polipéptido PRO es un ARN antisentido o construcción de ADN preparado utilizando la tecnología antisentido, donde, por ejemplo, un ARN antisentido o molécula de ADN actúa bloqueando directamente la traducción del ARNm por hibridación al ARNm objetivo y evitando la traducción de la proteína. La tecnología antisentido se puede utilizar para controlar la expresión génica a través de la formación de triple hélice o de ADN o ARN antisentido, ambos procedimientos se basan en la unión de un polinucleótido al ADN o ARN. Por ejemplo, la porción de codificación 5' de la secuencia de polinucleótidos que aquí codifica los polipéptidos PRO maduros, se utiliza para diseñar un oligonucleótido antisentido de ARN de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN está diseñado para ser complementario a una región del gen implicada en la transcripción (triple hélice - ver Lee et al., *Nucl. Acids Res.*, 6:3073 (1979); Cooney et al., *Science*, 241:456 (1988); Dervan et al., *Science*, 251:1360 (1991)), lo que impide la transcripción y la producción del polipéptido PRO. Los oligonucleótidos de ARN antisentido se hibridizan con el ARNm *in vivo* y bloquean la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido PRO (antisentido - Okano, *Neurochem.*, 56:560 (1991); *Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression* (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden ser entregados a las células de modo que el ARN antisentido o de ADN puede ser expresado *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido PRO. Cuando se utiliza el ADN antisentido, son preferidos oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, aproximadamente entre aproximadamente -10 y + 10 posiciones de la secuencia de nucleótidos del gen objetivo.

Los antagonistas potenciales incluyen pequeñas moléculas que se unen al centro activo, el sitio de unión del receptor, o factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido PRO, bloqueando así la actividad biológica normal del polipéptido PRO. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no están limitados a, pequeños péptidos o moléculas a modo de péptidos, péptidos preferentemente solubles, y compuestos inorgánicos o orgánicos sintéticos no peptídil.

Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar la división específica de ARN. Las ribozimas actúan por hibridación específica de secuencia para el ARN complementario objetivo, seguido por la ruptura endonucleolítica. Sitios específicos de división de ribozima dentro de un potencial ARN objetivo se puede identificar por las técnicas conocidas. Para obtener más detalles ver, por ejemplo, Rossi, *Current Biology*, 4:469-471 (1994), y PCT publicación No. WO 97/33551 (publicado 18 de septiembre 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción debe ser de hebra simple y compuestas de deoxinucleótidos. La composición base de estos oligonucleótidos se ha diseñado de tal manera que promueve la formación de triple hélice a través de reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren extensiones considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para obtener

más detalles *ver*, por ejemplo, PCT No. WO 97/33551, *supra*.

Estas pequeñas moléculas pueden ser identificadas por una o más de las pruebas de detección antes discutidas aquí y/o por otras técnicas de cribado bien conocidas por los expertos en la materia.

Los usos diagnósticos y terapéuticos de las moléculas de aquí descritas también puede basarse en los aspectos del análisis funcional positivo que se divulgan y se describen a continuación.

F. Distribución en los tejidos

La ubicación de los tejidos que expresan el PRO pueden ser identificados mediante la determinación de la expresión de ARNm en diversos tejidos humanos. La ubicación de dichos genes proporciona información acerca de qué tejidos son más propensos a verse afectados por las actividades de estimulación e inhibición de los polipéptidos PRO. La localización de un gen en un tejido específico también proporciona la muestra de tejido para los ensayos de bloqueo de actividad que se analizan a continuación.

Como se señaló antes, la expresión génica en diferentes tejidos se puede medir por Southern blotting convencionales, Northern blotting para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77:5201-5205 [1980]), dot blotting (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda debidamente etiquetada, con base en las secuencias aquí provistas. Alternativamente, pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y el ADN, los dúplex híbridos de ARN-ADN o dúplex ADN-proteínas.

La expresión génica en diferentes tejidos, como alternativa, se puede medir por procedimientos inmunológicos, como la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido y el ensayo del cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o ensayos de muestras líquidas pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden ser preparados en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden estar preparados contra una secuencia nativa de un polipéptido PRO o en contra de un péptido sintético basado en las secuencias de ADN que codifica el polipéptido PRO o en contra de una secuencia exógena fusionada a un ADN que codifica un polipéptido PRO y codifica un epítipo de anticuerpo específico. Se proporcionan a continuación técnicas generales para la generación de anticuerpos, y protocolos especiales para Northern blotting e hibridación *in situ*.

G. Estudios de la unión del anticuerpo

La actividad de los polipéptidos PRO puede ser verificada mediante estudios de unión de anticuerpos, en los que se comprueba la capacidad de los anticuerpos anti-PRO para inhibir el efecto de los polipéptidos PRO, respectivamente, en las células de los tejidos. Anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales humanizados, biespecíficos, y heteroconjugados, la preparación de los cuales se describe a continuación.

Los estudios de unión de anticuerpos pueden realizarse en cualquier procedimiento de ensayo conocido, como los análisis de enlaces competitivos, los ensayos de sándwich directos e indirectos, y los ensayos de inmunoprecipitación. Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987).

Los análisis de enlaces competitivos se basan en la capacidad de un estándar etiquetado para competir con el analito en la muestra de prueba para unirse con una cantidad limitada de anticuerpos. La cantidad de proteína objetivo en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que se une a los anticuerpos. Para facilitar la determinación de la cantidad del estándar que se une, los anticuerpos son insolubilizados preferentemente antes o después de la competencia, de modo que el estándar y analito que están vinculados a los anticuerpos pueden ser convenientemente separados del estándar y el analito que se mantienen sin unir.

Los ensayos sándwich implican el uso de dos anticuerpos, cada uno capaz de unirse a una parte inmunogénica diferente, o epítipo de la proteína a detectar. En un ensayo sándwich, el analito muestra de prueba se une a un primer anticuerpo que se inmoviliza en un soporte sólido, y posteriormente un segundo anticuerpo se une al analito, formando así un complejo insoluble en tres partes. *Ver*, por ejemplo, EE.UU. Pat. No. 4.376.110. El segundo anticuerpo en sí puede ser etiquetado con una fracción detectable (ensayos sándwich directos) o puede ser medido usando un anticuerpo anti-inmunoglobulina que está etiquetado con una fracción detectable (prueba sándwich indirecta). Por ejemplo, un tipo de ensayo sándwich es un ensayo ELISA, en cuyo caso la fracción detectable es una enzima. Para inmunohistoquímica, la muestra de tejido puede ser fresca o congelada, o puede ser incluida en parafina y fijada con un conservante como formalina, por ejemplo.

H. Ensayos basados en la célula

Los ensayos celulares y modelos animales de enfermedades relacionadas con la inmunidad se pueden utilizar para comprender mejor la relación entre los genes y los polipéptidos aquí identificados y el desarrollo y patogénesis de enfermedades inmune relacionadas.

En un enfoque diferente, las células de un tipo celular que se sabe están involucradas en una enfermedad particular inmune relacionada son transfectadas con el ADNc aquí descrito y se analiza la capacidad de estos ADNc para estimular o inhibir la función inmune. Células adecuadas pueden ser transfectadas con el gen deseado, y supervisadas por la actividad de la función inmune. Estas líneas de células transfectadas se pueden utilizar entonces para probar la capacidad de anticuerpos poli- o monoclonales o composiciones de anticuerpos para inhibir o estimular la función inmunológica, por ejemplo, para modular la proliferación de células T o la infiltración de células inflamatorias. Las células transfectadas con las secuencias de codificación de los genes aquí identificados además se pueden utilizar para identificar fármacos candidatos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad.

Además, los cultivos primarios derivados de animales transgénicos (como se describe más adelante) se pueden utilizar aquí en ensayos basados en la célula, aunque se prefieren las líneas celulares estables. Técnicas para obtener líneas continuas de células de animales transgénicos son bien conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, Small et al., *Mol. Cell. Biol.*, 5: 642-648 [1985]).

Un ensayo basado en la célula adecuado es la reacción mixta de linfocitos (MLR). *Current Protocols in Immunology*, unit 3.12; editado por J E Coligan, A M Kruisbeek, D H Marglies, E M Shevach, W Strober, National Institutes of Health, Published by John Wiley & Sons, Inc. En este ensayo, se analiza la capacidad de una sustancia de ensayo para estimular o inhibir la proliferación de las células T activadas. Una suspensión de las células T de respuesta se cultiva con células estimulantes alogénicas y la proliferación de las células T se mide por la captación de timidina tritiada. Este ensayo es una medida general de la reactividad de células T. Dado que la mayoría de las células T responden y producen IL-2 tras la activación, las diferencias en la capacidad de respuesta en este ensayo, en parte, reflejan las diferencias en la producción de IL-2 mediante células respondedoras. Los resultados MLR pueden ser verificados por un ensayo de detección linfocina estándar (IL-2). *Current Protocols in Immunology*, *supra*, 3.15, 6.3.

Una respuesta proliferativa de células T en un ensayo MLR puede ser debido a las propiedades mitogénicas directa de una molécula ensayada o para la activación inducida por antígenos externos. Una verificación adicional de la actividad estimulante de la célula T de los polipéptidos PRO puede ser obtenida por un ensayo de coestimulación. Activación de los linfocitos T requiere una señal específica de antígeno mediada a través del receptor de células T (TCR) y una señal coestimuladora mediada por la interacción de unión de un segundo ligando, por ejemplo, la interacción de unión B7 (CD80, CD86) / CD28. El reticulado de CD28 aumenta la secreción de linfocina por células T activadas. La activación de células T tiene tanto controles negativos como positivos a través de la unión de los ligandos que tienen un efecto negativo o positivo. CD28 y CTLA-4 son glicoproteínas relacionadas en la superfamilia de Ig que se une a B7. CD28 que se une a B7 tiene un efecto positivo de coestimulación de la activación de células T; a la inversa, CTLA-4 que se une a B7 tiene un efecto negativo desactivador de células T. Salas, C. A. y Allison, J. P., *Curr. Opin. Immunol.*, (1997) 9:396. Schwartz, R. H., *Cellular* (1992) 71:1065; Linsey, S. y P. Ledbetter, J. A., *Annu. Rev. Immunol.* (1993) 11:191; June, C. H. et al. *Immunol. Today* (1994) 15:321; Jenkins, M. K., *Immunity* (1994) 1:405. En un ensayo de coestimulación, los polipéptidos PRO se analizan para la actividad coestimuladora o inhibidora de células T.

Los polipéptidos PRO, así como otros compuestos del presente documento, que son los estimuladores (coestimuladores) de la proliferación de células T y agonistas, por ejemplo, anticuerpos agonistas, además según lo determinado por MLR y ensayos de coestimulación, por ejemplo, son útiles en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inmunidad caracterizadas por la función inmune pobre, subóptima o inadecuada. Estas enfermedades se tratan mediante la estimulación de la proliferación y activación de células T (y la inmunidad mediada por células T) y mejorando la respuesta inmunitaria en un mamífero mediante la administración de un compuesto de estimulación, como los polipéptidos PRO estimulantes. El polipéptido estimulante puede ser, por ejemplo, un polipéptido PRO o un anticuerpo agonista del mismo.

El uso directo de un complejo estimulante como en el presente documento ha sido validado en experimentos con glicoproteína 4-1BB, un miembro de la familia del receptor del factor de necrosis tumoral, que se une a un ligando (4-1BBL) expresado en las células T primadas y señala la activación y el crecimiento de células T. Alderson, ME et al., *J. Immunol.*, 24:2219 (1994).

El uso de un compuesto estimulante agonista también ha sido validada experimentalmente. La activación de 4-1BB por tratamiento con un anticuerpo agonista anti-4-1BB aumenta la erradicación de los tumores. Hellstrom, I. y Hellstrom, K. E., *Crit. Rev. Immunol.*, 18:1 (1998). La terapia inmunoadyuvante para el tratamiento de los tumores, que se describe en detalle más adelante, es otro ejemplo del uso de los compuestos estimulantes del presente documento. Un efecto estimulante o potenciador del sistema inmunitario también puede ser alcanzado por antagonizar o bloquear la actividad de un PRO que se haya comprobado que inhibe en el ensayo de RLM. La negación de la actividad inhibitoria de la sustancia produce un efecto estimulante neto. Los compuestos antagonistas/de bloqueo adecuados son anticuerpos o fragmentos de ellos que reconocen y se unen a la proteína inhibidora, bloqueando así la efectiva interacción de la proteína con su receptor e inhibiendo la señalización a través del receptor. Este efecto ha sido validado en experimentos con anticuerpos anti-CTLA-4 que aumentan la proliferación de células T, posiblemente por la eliminación de la señal de inhibición causada por unión CTLA-4. Walunas, T. L. et al., *Immunity*, 1:405 (1994).

Alternativamente, un efecto inmune estimulante o potenciador también puede ser logrado mediante la administración de

un polipéptido PRO que tiene propiedades potenciadoras de la permeabilidad vascular. La permeabilidad vacuolar mejorada sería beneficiosa para los trastornos que pueden ser atenuados por la infiltración local de las células inmunes (por ejemplo, monocitos, eosinófilos, PMN) y la inflamación.

5 Por otra parte, los polipéptidos PRO, así como otros compuestos descritos en el presente documento, que son inhibidores directos de la proliferación/activación de células T, secreción de linfocinas y/o la permeabilidad vascular puede usarse directamente para suprimir la respuesta inmunitaria. Estos compuestos son útiles para reducir el grado de respuesta inmunitaria y tratar enfermedades relacionadas inmune caracterizadas por una respuesta hiperactiva, superóptima, o autoinmune. Este uso de los compuestos del presente documento ha sido validado por los experimentos descritos anteriormente en los que la unión CTLA-4 a los receptores B7 desactiva las células T. Los compuestos inhibidores directos descritos en el presente documento funcionan de una manera análoga. El uso de compuestos que suprimen la permeabilidad vascular se esperaría que redujeran la inflamación. Estos usos serían beneficiosos en el tratamiento de condiciones asociadas con inflamación excesiva.

10  
15 Alternativamente, los compuestos, por ejemplo, anticuerpos que se unen para estimular polipéptidos PRO y bloquear el efecto estimulante de estas moléculas producen un efecto inhibitor en red y pueden ser utilizados para suprimir la respuesta inmunitaria mediada por células T a través de la inhibición de la proliferación/activación de células T y/o la secreción de linfocinas. Bloqueando el efecto estimulante de los polipéptidos se suprime la respuesta inmunitaria del mamífero. Este uso ha sido validado en experimentos usando un anticuerpo anti-IL-2. En estos experimentos, el anticuerpo se une a la IL-2 y bloquea la unión de IL-2 a su receptor, consiguiéndose así un efecto inhibitor de células T.

#### I. Los modelos animales

25 Los resultados de Los ensayos *in vitro* de base celular pueden además verificarse utilizando modelos animales *in vivo* y ensayos para la función T-celular. Una variedad de modelos animales bien conocidos se pueden utilizar para comprender mejor la función de los genes identificados aquí en el desarrollo y patogénesis de enfermedades inmune relacionadas, y para probar la eficacia de los agentes terapéuticos candidatos, como anticuerpos, y otros antagonistas de los polipéptidos nativos, incluidos los antagonistas de moléculas pequeñas. El la naturaleza *in vivo* de estos modelos lo hace predictivos de respuesta en pacientes humanos. Los modelos animales de enfermedades inmune relacionadas incluyen tanto animales no recombinantes y recombinantes (transgénicos). Modelos animales no recombinantes, por ejemplo, roedores, por ejemplo, modelos murinas. Estos modelos pueden ser generados por la introducción de células en ratones singénicos utilizando técnicas estándar, por ejemplo, inyección subcutánea, inyección en la vena de la cola, implantación del bazo, implantación intraperitoneal, implantación bajo la cápsula renal, etc..

35 La enfermedad injerto-contra-huésped se produce cuando las células inmunocompetentes se trasplantan en pacientes inmunodeprimidos o tolerantes. Las células del donante reconocen y responden a los antígenos del huésped. La respuesta puede variar desde una inflamación grave que amenaza la vida a los casos leves de diarrea y pérdida de peso. Modelos de la enfermedad injerto-contra-huésped proporciona un medio de evaluar la reactividad de las células T contra los antígenos MHC y los antígenos de trasplante de menor importancia. Un procedimiento adecuado se describe en detalle en el Current Protocols in Immunology, *supra*, unidad 4.3.

40 Un modelo animal para el rechazo del injerto de piel es un medio de probar la capacidad de las células T para mediar la destrucción de tejidos *in vivo* y una medida de su papel en el rechazo del trasplante. Los modelos más comunes y aceptados usan injertos de piel de cola murina. Repetidos experimentos han demostrado que el rechazo del injerto de piel, está mediado por las células T, las células T auxiliares y las células T efectoras asesinas, y los no anticuerpos. Auchincloss, H. Jr. Y Sachs, DH, *Fundamental Immunology*, 2ª ed., WE Paul ed., Raven Press, NY, 889-992 (1989). Un procedimiento adecuado se describe en detalle en Current Protocols in Immunology, *anterior*, unidad 4.4. Otros modelos de rechazo de trasplante que pueden ser utilizados para probar los compuestos del presente documento son los modelos de trasplante alogénico de corazón descritos por Tanabe, M. et al., *Transplantation*, 58:23 (1994) Y Tinubu, SA et al., *J. Immunol.*, 4330-4338 (1994).

45 Los modelos animales de hipersensibilidad de tipo retardada proporciona también un ensayo de la función inmune mediada por células. Reacciones de hipersensibilidad de tipo retardada son la respuesta inmunitaria *in vivo* mediada por células T caracterizada por la inflamación que no alcanzan su pico hasta después que transcurra un período de tiempo después de la provocación con un antígeno. Estas reacciones también se producen en determinadas enfermedades autoinmunes el tejido como la esclerosis múltiple (EM) y la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE, modelo de MS). Un procedimiento adecuado se describe en detalle en el Current Protocols in Immunology, *anterior*, unidad 4.5.

50 El EAE es una enfermedad autoinmune mediada por células T caracterizada por la inflamación de células T y células mononucleares y desmielinización posterior de los axones en el sistema nervioso central. EAE es generalmente considerada como un modelo animal relevante para la EM en los seres humanos. Bolton, C., *Multiple Sclerosis*, 1:143 (1995). Se han desarrollado tanto modelos agudos como de recaída-remisión. Los compuestos descritos en este documento pueden ser probados para la actividad de estimulación o inhibición de células T contra la enfermedad desmielinizante mediada por el sistema inmunitario utilizando el protocolo descrito en el Current Protocols in Immunology, *supra*, unidades 15.1 y 15.2. Ver asimismo, los modelos de la enfermedad de la mielina en el que los oligodendrocitos o células de Schwann son injertadas en el sistema nervioso central, como se describe en Duncan, I. D.

et al., *Molec. Med. Today*, 554-561 (1997).

5 La hipersensibilidad de contacto es un ensayo simple de hipersensibilidad de tipo retardada *in vivo* de la función inmune mediada por células. En este procedimiento, la exposición cutánea a haptenos exógenos que da lugar a una reacción de hipersensibilidad de tipo retrasada que se mide y se cuantifica. La sensibilidad de contacto implica una fase de sensibilización inicial seguida por una fase de activación. La fase de activación se produce cuando los linfocitos T encuentran un antígeno con el que han tenido contacto previo. Se producen hinchazón e inflamación, haciendo de este un excelente modelo de dermatitis alérgica de contacto humana. Un procedimiento adecuado se describe en detalle en *Current Protocols in Immunology*, Eds. JE Cologan, AM Kruisbeek, DH Margulies, EM Shevach y W. Strober, John Wiley & Sons, Inc., unidad 4.2 (1994). También Grabbe, S. y Schwarz, T, *Immun. Today*, 19 (1): 37-44 (1998).

15 Un modelo animal de artritis es la artritis inducida por colágeno. Este modelo comparte características clínicas, histológicas e inmunológicas de la artritis reumatoide autoinmune humana y es un modelo aceptable para la artritis autoinmune humana. Modelos de ratón y rata se caracterizan por la sinovitis, erosión del cartílago y del hueso subcondral. Los compuestos del presente documento pueden ser probados para la actividad contra la artritis autoinmune utilizando los protocolos descritos en *Current Protocols in Immunology, anterior*, unidades 15.5. Ver también el modelo usando un anticuerpo monoclonal para CD18 e integrinas VLA-4 que se describe en Issekutz, A.C. et al., *Immunology*, 88:569 (1996).

20 Se ha descrito un modelo de asma en el que la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por el antígeno, eosinofilia pulmonar e inflamación son inducidas por la sensibilización de un animal con la ovoalbúmina y desafiando al animal con la misma proteína suministrada por aerosol. Varios modelos animales (cerdo de Guinea, rata, primates no humanos), muestran síntomas similares al asma atópica en los seres humanos a la amenaza con antígenos en aerosol. Los modelos murinas tienen muchas de las características del asma humano. Los procedimientos adecuados para poner a prueba los compuestos del presente documento para la actividad y la eficacia en el tratamiento del asma son descritos por Wolyniec, W. W. et al., *Am. J. Respir. Mol. Cell. Biol.*, 18:777 (1998) y las referencias citadas.

30 Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden ser probados en modelos animales de enfermedades como la psoriasis. La evidencia sugiere una patogénesis de células T para la psoriasis. Los compuestos descritos en el presente documento puede ser probados en el modelo scid/scid de ratón descrito por Schon, M. P., et al., *Nat. Med.*, 3:183 (1997), en el que los ratones muestran lesiones histopatológicas de la piel que se asemeja a la psoriasis. Otro modelo adecuado es la quimera de piel humana/ratones scid preparada como se describe por Nickoloff, B. J. et al., *Am. J. Path.*, 146:580 (1995).

35 Los modelos animales recombinantes (transgénicos) pueden ser diseñados mediante la introducción de la parte de codificación de los genes aquí identificados en el genoma de los animales de interés, utilizando técnicas estándar para la producción de animales transgénicos. Los animales que pueden servir como un objetivo para la manipulación transgénica incluyen, sin limitación, ratones, ratas, conejos, cobayas, ovejas, cabras, cerdos y primates no humanos, por ejemplo, babuinos, chimpancés y monos. Técnicas conocidas en la técnica para la introducción de un transgén en estos animales son microinyección pronucleica (Hoppe y Wanger, Patente U. S. No. 4,873,191); transferencia génica mediada por retrovirus en las células germinales (por ejemplo, Van der Putten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82, 6148-615 [1985]); marcado de genes en las células madre embrionarias (Thompson et al., *Cell*, 56, 313-321 [1989]); electroporación de embriones (Lo, *Mol. Cell. Biol.*, 3, 1803-1814 [1983]); transferencia de genes mediada por espermatozoides (Lavitrano et al., *Cell*, 57, 717-73 [1989]). Para su revisión, ver, por ejemplo, Patente U. S. No. 4.736.866.

50 Los animales transgénicos son aquellos que llevan el transgen sólo en parte de sus células ("animales mosaico"). El transgen puede integrarse, ya sea como un transgen único, o en concatámeros, por ejemplo, tándems cabeza-a-cabeza o cabeza-a-cola. La introducción selectiva de un transgen en un determinado tipo celular también es posible, siguiendo, por ejemplo, la técnica de Lasko et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 89, 6232-636 (1992).

55 La expresión del transgen en los animales transgénicos pueden ser controlada por las técnicas estándar. Por ejemplo, el análisis de Southern blot o la amplificación por PCR se puede utilizar para verificar la integración del transgen. El nivel de expresión de ARNm puede ser analizado utilizando técnicas tales como hibridación *in situ*, análisis de Northern blot, PCR, o inmunocitoquímica.

60 Los animales pueden ser examinados además para detectar signos de patología de la enfermedad inmune, por ejemplo, mediante un examen histológico para determinar la infiltración de células inmunes hacia tejidos específicos. También se pueden realizar experimentos de bloqueo en los que los animales transgénicos son tratados con los compuestos del presente documento para determinar el alcance de la estimulación o inhibición de la proliferación de las células T de los compuestos. En estos experimentos, los anticuerpos de bloqueo que se unen al polipéptido PRO, preparado como se describe anteriormente, se administran a los animales y se determina el efecto sobre la función inmune.

65 Alternativamente, pueden construirse animales "Knock Out", los cuales tienen un gen defectuoso o alterado codifica para un polipéptido aquí identificado, como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y ADN genómico alterado que codifica el mismo polipéptido introducido en una célula embrionaria del

animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica un polipéptido en particular puede ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido de conformidad con las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica un polipéptido particular puede ser eliminada o reemplazada con otro gen, como un gen que codifica un marcador seleccionable que puede ser usado para monitorear la integración. Por lo general, varias quilibases de ADN de flanco no alterado (tanto en el extremo 5' como 3') están incluidas en el vector [ver por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de los vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y son seleccionadas las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan luego en un blastocisto de un animal (por ejemplo, ratón o rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson EJ, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Un embrión quimérico puede ser implantado en un animal foster hembra pseudopreñando adecuado y el embrión llevado a término para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN recombinado homológamente en sus células germinales se puede identificar por las técnicas convencionales y usadas para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente. Animales knock-out se pueden caracterizar por ejemplo, por su capacidad para defenderse de ciertas condiciones patológicas, así como por su desarrollo de patologías debido a la ausencia del polipéptido.

#### 20 J. Terapia InmunoAdyuvante

En una realización, los compuestos inmunoestimulantes descritos en el presente documento pueden ser utilizados en la terapia inmunoadyuvante del presente documento para el tratamiento de los tumores (cáncer). Ahora está bien establecido que las células T reconocen los antígenos específicos de tumores humanos. Un grupo de antígenos tumorales, codificados por las familias de genes el MAGE, BAGE y GAGE, están en silencio en todos los tejidos adultos normales, pero se expresan en cantidades significativas en los tumores, como los melanomas, tumores de pulmón, tumores de cabeza y cuello, y carcinomas de vejiga. Desmet, C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 93:7149 (1996). Se ha demostrado que coestimulación de las células T induce la regresión del tumor y una respuesta antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*. Melero, I. et al., Nature Medicine, 3:682 (1997); Kwon, E. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 94: 8099 (1997); Lynch, D. H. et al., Nature Medicine, 3:625 (1997); Finn, DO y Lotze, MT, J. Immunol., 21:114 (1998). Los compuestos estimulantes del presente documento puede ser administrados como adyuvantes, en solitario o junto con un agente regulador de crecimiento, o el agente citotóxico o quimioterapéutico, para estimular la proliferación/activación de células T y una respuesta antitumoral frente a los antígenos tumorales. El agente regulador del crecimiento, citotóxico o quimioterapéutico puede ser administrado en cantidades convencionales que utilizan los regímenes conocidos de la administración. La actividad inmunoestimulante de los compuestos del presente documento permite reducir la cantidad de agente de regulación del crecimiento, citotóxico o quimioterapéutico, reduciendo así potencialmente la toxicidad para el paciente.

#### 35 K. Ensayos de Selección de candidatos de fármacos

40 Pruebas de detección para los fármacos candidatos están diseñadas para identificar los compuestos que se unen o se acomplejan con los polipéptidos codificados por los genes identificados, o un fragmento biológicamente activo del mismo, o que interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares. Estas pruebas de detección se incluirán ensayos susceptibles de selección de alto rendimiento de las bibliotecas químicas, que las hace particularmente adecuadas para la identificación de fármacos candidatos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas previstas incluyen compuestos orgánicos sintéticos o inorgánicos, como los péptidos, preferentemente péptidos solubles, fusiones (poli)-péptido-inmunoglobulina, y, en particular, los anticuerpos incluyendo, sin limitación, anticuerpos poli- y monoclonales y los fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como los anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, pruebas de detección bioquímica, inmunoensayos y los ensayos basados en células, que están bien caracterizados en general se logra mediante el revestimiento de la superficie sólida con una solución en contacto con el fármaco candidato con un polipéptido codificado por un ácido nucleico aquí identificado en las condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

55 En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede ser aislado o detectado en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido codificado por el gen aquí identificado o el fármaco candidato es inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, sobre una placa de microtitulación, a través de enlaces covalentes o no covalentes. La unión no covalente en general se logra mediante el revestimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido y el secado. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido a ser inmovilizado puede ser utilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza mediante la adición del la componente no inmovilizado, que puede ser etiquetado por una etiqueta detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se completa, se retiran los componentes no reaccionados, por ejemplo, por lavado, y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado lleva una etiqueta detectable, la detección de la etiqueta inmovilizada en la superficie indica que se produjo el complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva una etiqueta, los complejos pueden ser detectados, por ejemplo, utilizando un

anticuerpo marcado de unión específica al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa pero no se une a una proteína particular codificada por un gen aquí identificado, su interacción con esa proteína se puede analizar por procedimientos bien conocidos para la detección de interacciones proteína-proteína. Estos ensayos incluyen procedimientos tradicionales, tales como, reticulación, co-inmunoprecipitación, y co-purificación a través de gradientes o columnas de cromatografía. Además, las interacciones proteína-proteína pueden ser monitorizadas por medio de un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores [Fields y Song, Nature (London), 340, 245-246 (1989); Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 88, 9578-9582 (1991)] tal como se revela Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 89, 5789-5793 (1991). Muchos de los activadores de la transcripción, tales como levadura GAL4, constarán de dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúe como el dominio de unión al ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levadura se describe en las publicaciones anteriores (por lo general se refiere a los "sistema de dos híbridos") se aprovecha de esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, donde la proteína objetivo está fusionada con el dominio de unión al ADN de GAL4, y otra, en que proteínas de activación candidatas se funden con el dominio de activación. La expresión de un gen reportero GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado GAL4 depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos de interacción se detectan con un sustrato cromogénico para b-galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para la identificación de las interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos disponibles en el mercado por Clontech. Este sistema también se puede extender para mapear dominios proteínas implicados en las interacciones proteínas específicas, así como para identificar los residuos de aminoácidos que son esenciales para estas interacciones.

Con el fin de encontrar compuestos que interfieren con la interacción de un gen aquí identificado y otros componentes intra- o extracelulares pueden ser probados, una mezcla de reacción se suele preparar conteniendo el producto del gene y el componente intra- o extracelular en condiciones y por un tiempo que permita la interacción y la unión de los dos productos. Para poner a prueba la capacidad de una sustancia de ensayo para inhibir la unión, la reacción se ejecuta en ausencia y en presencia de la sustancia de ensayo. Además, puede ser añadido un placebo a una mezcla de reacción en tercer lugar, para servir como control positivo. La unión (la formación de complejos) entre la sustancia de ensayo y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla se controla como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción(es) de control, pero no en la mezcla de reacción que contiene la sustancia de ensayo indica que la sustancia de ensayo interfiere con la interacción de la sustancia de ensayo y su socio de reacción.

#### L. Composiciones y procedimientos para el tratamiento de enfermedades inmune relacionadas

Las composiciones de utilidad en el tratamiento de enfermedades inmune relacionadas incluyen, sin limitación, proteínas, anticuerpos, pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, fosfopéptidos, moléculas antisentido y ribozimas, moléculas de triple hélice, etc. que inhiben o estimulan la función inmune, por ejemplo, proliferación/activación de células T, liberación de linfocinas, o infiltración de células inmunes.

Por ejemplo, el ARN antisentido y moléculas de ARN actúan para bloquear directamente la traducción del ARNm por hibridación a ARNm objetivos y previniendo la traducción de proteínas. Cuando se utiliza el ADN antisentido, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 posiciones de la secuencia de nucleótidos del gen objetivo.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la división específica de ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia para el ARN objetivo complementario, seguido por la ruptura endonucleolítica. Sitios específicos de división de ribozimas dentro de un ARN objetivo potencial se pueden identificar por las técnicas conocidas. Para obtener más detalles véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4, 469-471 (1994), y publicación No PCT WO 97/33551 (publicado 18 de septiembre 1997).

Las moléculas de ácido nucleico en la formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deben ser de cadena simple y compuestas de desoxinucleótidos. La composición base de estos oligonucleótidos se ha diseñado de tal manera que promueve la formación de triple hélice a través de las normas de apareamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para obtener más detalles véase, por ejemplo, No. PCT WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas pueden ser identificadas por una o cualquier combinación de las pruebas de detección señaladas anteriormente y/o por cualquier otra técnica de detección bien conocidas por los expertos en la técnica.

#### M. Anticuerpos anti-PRO

La presente invención proporciona, además, los anticuerpos anti-PRO. Anticuerpos ejemplares incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales humanizados, Biespecíficos, y heteroconjugados.

##### 1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos anti-PRO pueden incluir anticuerpos policlonales. Los procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales son conocidos por el entendido en la técnica. Los anticuerpos policlonales se pueden cultivar en un mamífero, por ejemplo, por una o más inyecciones de un agente de inmunización y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, el agente de inmunización y/o adyuvante, se inyectará en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente de inmunización puede incluir el polipéptido PRO o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil para conjugar el agente de inmunización a una proteína conocida por ser inmunogénica en el mamífero a ser inmunizado. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen pero no están limitados a hemocianina de lapa, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que pueden ser utilizados incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintética). El protocolo de vacunación puede ser seleccionado por un experto en la materia, sin experimentación indebida.

## 2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos anti-PRO pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden ser preparados con procedimientos del hibridoma, tales como los descritos por Köhler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster o cualquier otro animal huésped adecuado, es típicamente inmunizado con un agente de inmunización para obtener linfocitos que producen o son capaces producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*.

El agente de inmunización típicamente incluirá el polipéptido PRO o una proteína de fusión de la misma. En general, tanto los linfocitos de sangre periférica ("PBLs") se utilizan si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de los ganglios linfáticos se utilizan si se desean fuentes de mamíferos no humanas. Los linfocitos se fusionan luego con una línea de células inmortalizadas con un agente de fusión adecuado, como el polietilén glicol, para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. Las líneas de células inmortalizadas suelen ser células de mamíferos transformadas, en particular, las células de mieloma de origen de roedores, de bovino y humano. Por lo general, se emplean líneas de células de mieloma de rata o ratón. Las células del hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado, preferiblemente que contenga una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas, no fusionadas. Por ejemplo, si las células de los padres carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), dichas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Las líneas de células inmortalizadas preferidas son las que se fusionan de manera eficiente, soportan alto nivel de expresión estable de anticuerpos por las células productoras de anticuerpo seleccionadas, y son sensibles a un medio como el medio HALT. Las líneas de células inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma de murina, que puede obtenerse, por ejemplo, desde el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia. Líneas de células de mieloma humano y del heteromieloma de ratón también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pp. 51-63].

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan se puede analizar entonces para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el PRO. Preferiblemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por ensayo de unión *in vitro*, como el radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). Estas técnicas y los ensayos son conocidos en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse por el análisis Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que las células de hibridoma deseadas son identificadas, los clones pueden ser subclonados mediante procedimientos de dilución limitados y cultivados por los procedimientos estándar [Goding, *supra*]. Medios de cultivo adecuados para este fin son, por ejemplo, Dulbecco's Modified Eagle's Medium y medio RPMI-1640. Alternativamente, las células se pueden cultivar en hibridomas *in vivo* como ascites en un mamífero.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden ser aislados o purificados del medio de cultivo o del líquido ascítico por procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas, como por ejemplo, la proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, la diálisis, o la cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser realizados por procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la patente US 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención puede ser fácilmente aislado y secuenciado utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, mediante el uso de sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de murina). Las células de hibridoma de la invención sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede poner en vectores de expresión, que luego son transfectados en las células huésped, como células COS de simios, ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen otra proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN

también puede ser modificado, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia que codifica para la cadena pesada y liviana de dominios constantes humanos en lugar de las secuencias homólogas de ratón [patente US No. 4.816.567; Morrison, *et al.*, *supra*], o mediante la unión covalente a la secuencia codificadora de inmunoglobulina de la totalidad o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no-inmunoglobulina. Dicho polipéptido no-inmunoglobulina puede ser sustituido por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o pueden ser sustituidos por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo quimérico bivalente.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monovalentes. Procedimientos de preparación de anticuerpos monovalentes son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento consiste en la expresión recombinante de la cadena liviana y de la cadena pesada modificada de la inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca en general, en cualquier punto en la región Fc para evitar entrecruzamiento de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes son sustituidos por otro residuo de aminoácido o se eliminan con el fin de evitar la reticulación.

También son adecuados los procedimientos *in vitro* para la preparación de anticuerpos monovalentes. La digestión de los anticuerpos para producir fragmentos de las mismas, en particular, los fragmentos Fab, se puede realizar utilizando técnicas de rutina conocida en la técnica.

### 3. Anticuerpos Humanos y Humanizados

Los anticuerpos anti-PRO de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Formas humanizadas de anticuerpos no-humanos (por ejemplo, murina) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab, F (ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión antígenos de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no-humana. Anticuerpos humanizados incluyen las inmunoglobulinas humanas (receptor anticuerpo) en el que los residuos de una región determinante complementaria (CDR) del receptor se sustituyen por los residuos de un CDR de una especie no humana (anticuerpos donantes), tales como ratón, rata o conejo teniendo la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de Fv marco de la inmunoglobulina humana son sustituidos por residuos no-humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden incluir también residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor, ni en el CDR o secuencias marco importados. En general, el anticuerpo humanizado incluirá la casi totalidad de por lo menos uno, y por lo general dos dominios variables, en los que todas o casi todas las regiones del CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no-humana y todas o casi todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado de manera óptima también contará con por lo menos una porción de una región constante de una inmunoglobulina (Fc), normalmente 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)].

Los procedimientos para la humanización de anticuerpos no-humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más aminoácidos introducidos en ella de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se refieren a menudo como residuos "importados", que suelen ser tomados de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse básicamente según el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], mediante la sustitución de CDRs de roedores o las secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente US No. 4.816.567), en donde sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados suelen anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y, posiblemente, algunos residuos de FR son sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de los roedores.

Los anticuerpos humanos también pueden ser producidos utilizando diferentes técnicas conocidas en la técnica, incluidas las bibliotecas de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole *et al.*, y Boerner *et al.*, también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Anticuerpos monoclonales y la terapia del cáncer*, Alan R. Liss, p. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)]. Del mismo modo, los anticuerpos humanos se pueden realizar mediante la introducción de los loci de las inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcial o totalmente inactivados. Bajo inoculación, la producción de anticuerpos humanos que se observa, se asemeja a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo el reordenamiento del gen, montaje, y repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. Nos. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las publicaciones científicas siguientes: Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783 (1992); Lönberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lönberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos pueden ser también madurados por afinidad utilizando los conocimientos de selección y/o procedimientos de mutagénesis como se describió anteriormente. Anticuerpos madurados por afinidad preferentes tienen una afinidad que es cinco veces, más preferentemente 10 veces, aún más preferentemente 20 o 30 veces mayor

que el anticuerpo de partida (por lo general murina, humanizada o humana) del que se prepara el anticuerpo madurado.

4. Anticuerpos biespecíficos

5 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para el PRO, el otro es para cualquier otro antígeno y, preferiblemente, para una proteína de superficie de la célula o receptor o subunidad del receptor.

10 Los procedimientos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de inmunoglobulina de cadena pesada/cadena liviana, donde las dos cadenas pesadas tienen especificidades diferentes [Milstein y Cuello, Nature, 305:537-539 (1983)]. Debido a la concentración arbitraria de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (quadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos distintos, de los cuales sólo uno tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta se suele realizar mediante pasos de cromatografía de afinidad. Procedimientos similares se exponen en WO 93/08829, publicado 13 de mayo 1993, y, en Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

20 Los dominios de anticuerpos variables con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) pueden fusionarse con las secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión de preferencia es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende por lo menos una parte de las regiones de bisagra, CH2, y CH3. Es preferible tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena liviana presente en por lo menos una de las fusiones. ADN's que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión independientes, y son co-transfectados en un organismo huésped adecuado. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

30 Según otro procedimiento descrito en WO 96/27011, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos pueden ser diseñada para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende por lo menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más pequeñas cadenas laterales de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen con las cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina y triptófano). "Cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena(s) lateral de gran tamaño se crean en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de grandes cadenas laterales de los aminoácidos con otras 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.

40 Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>). Se han descrito en la literatura técnicas para la generación de anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlaces químicos. Brennan et al., Science, 229:81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se separan proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia de arsenito sódico de agente complejante de ditiol para estabilizar ditiolos vecinos y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar de la otros derivados Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de las enzimas.

50 Los fragmentos Fab' se pueden recuperar directamente a partir de *E. coli* y unirse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., J. Exp. Med., 175:217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' secretó por separado *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a las células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como activar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumor de mama humana.

60 También se han descrito varias técnicas para la elaboración y el aislamiento de fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente a partir del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos han sido elaborados mediante cremalleras de leucina. Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de proteínas Fos y Jun estaban enlazados con las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes de fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación se vuelven a oxidar para formar heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para la realización de fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio de cadena pesada variable (VH) conectado a un dominio de cadena ligera variable (VL) mediante un enlace que es demasiado corto para permitir la vinculación entre los

dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios VH y VL de un fragmento se ven obligados a emparejarse con dominios VL y VH complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión con el antígeno. También se ha indicado otra estrategia para hacer fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso dímeros de una sola cadena Fv (SFV). Ver, Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., J. Immunol., 147:60 (1991).

Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo pueden unirse a dos epítopes diferentes en un polipéptido PRO aquí dado. Alternativamente, un brazo de polipéptido anti-PRO se puede combinar con un brazo que se une a una molécula de activación de leucocitos, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28 o B7), o receptores Fc de IgG (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) para centrarse en los mecanismos de defensa celular en la célula que expresa el polipéptido PRO particular. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos para las células que expresan un polipéptido PRO determinada. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión PRO y un brazo que se une a un agente citotóxico y un agente quelante de radionucleidos, tal como EOTUBE, DTPA, DOTA, o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une el polipéptido PRO y además se une el factor tisular (FT).

#### 5. Anticuerpos Heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están también en el ámbito de aplicación de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos de manera covalente. Estos anticuerpos, por ejemplo, se han propuesto para marcar las células del sistema inmunológico en células no deseadas [patente US 4.676.980], y para el tratamiento de infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos puedan ser preparados *in vitro* utilizando los procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, entre ellos los relacionados con agentes de reticulación. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas mediante una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los que se describen, por ejemplo, en la patente US 4.676.980.

#### 6. Ingeniería de función efectora

Puede ser conveniente modificar el anticuerpo de la invención respecto a la función efectora, para mejorar, por ejemplo, la eficacia de los anticuerpos en el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, el residuo(s) de cisteína puede ser introducido en la región Fc, lo que permite la formación de puentes disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede haber mejorado la capacidad de internalización y/o el aumento de la muerte celular mediada de complementos y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Ver Caron et al., J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales, tal como se describe en Wolff et al., Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, un anticuerpo puede ser manipulado para que tenga regiones Fc duales y, por lo tanto, tener una lisis de complemento y capacidades ADCC mejoradas. Ver Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989).

#### 7. Inmunconjugados

La invención también se refiere a inmunconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado en un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, de plantas o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (por ejemplo un radioconjugado).

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunconjugados. Las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden ser utilizadas incluyen difteria de cadena A, fragmentos activos no vinculantes de la toxina de la difteria, exotoxina de cadena A (a partir de *Pseudomonas aeruginosa*), ricina de cadena A, abrina de cadena A, modeccina de cadena A, alfa-sarcina, proteínas *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas *Americana Phytolaca* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de officinalis sapaonaria, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y tricotecenos. Una variedad de radionucleidos están disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y, y <sup>186</sup>Re.

Los conjugados de anticuerpo y del agente citotóxico se hacen usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tal como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados de imidoésteres bifuncionales (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tal como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexandiamina), derivados bis-diazonio (tal como bis-(p-diazoniumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tal como 2,6-diisocianato de tolieno), y compuestos de flúor bis-activos (tal como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricino tal como se describe en Vitetta et al., Science, 23:1098 (1987). El ácido triaminepentaacético 1-isotiocianatobencil-3- metildietileno (NIX-DTPA) marcado con carbono-14 como es un agente quelante ejemplar para la

conjugación de radionucleótidos en el anticuerpo. Ver WO 94/11026.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para su utilización en el premarcado de tumores, en el que el conjugado receptor de anticuerpos se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de eliminación y, a continuación la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

#### 8. Immunoliposomas

Los anticuerpos aquí descritos también pueden ser formulados como immunoliposomas. Los liposomas que contienen los anticuerpos se preparan mediante procedimientos ya conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77:4030 (1980), y las patentes US 4.485.045 y US 4.544.545. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la patente US 5.013.556.

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

#### 9. Utilizaciones para anticuerpos anti-PRO

Los anticuerpos anti-PRO de la invención tienen varias utilidades. Por ejemplo, los anticuerpos anti-PRO pueden ser utilizados en los ensayos de diagnóstico para PRO, por ejemplo, detectar su expresión (y en algunos casos, la expresión diferencial) en células específicas, tejidos y suero. Diversas técnicas de ensayo de diagnóstico conocidas en la técnica pueden utilizarse, tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich, directos o indirectos y ensayos de inmunoprecipitación realizados en cualquiera de las fases homogéneas o heterogéneas [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987) pp. 147-158]. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de diagnóstico se pueden marcar con una molécula detectable. La fracción detectable debe ser capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, la fracción detectable puede ser un radioisótopo, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , o  $^{125}\text{I}$ , un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante. Cualquier procedimiento conocido en la técnica de conjugación de anticuerpos en la fracción detectable puede ser empleado, incluidos los procedimientos descritos por Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochemistry, 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth., 40:219 (1981), y Nygren, J. Histochem y cytochem., 30:407 (1982).

Los anticuerpos anti-PRO también son útiles para la purificación de la afinidad PRO a partir del cultivo de células recombinantes o de fuentes naturales. En este proceso, los anticuerpos anti-PRO son inmovilizados en un soporte adecuado, tal como una resina Sephadex o filtro de papel, utilizando procedimientos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene el PRO a purificar, y, posteriormente, el soporte se lava con un disolvente adecuado que elimine sustancialmente todo el material de la muestra, a excepción del PRO, que está unido al anticuerpo inmovilizado. Por último, el soporte se lava con otro disolvente adecuado, que se libere el PRO del anticuerpo.

Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo a efectos ilustrativos, y no están pensados para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Todas las patentes y referencias bibliográficas citadas en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad.

#### N. Composiciones farmacéuticas

Las moléculas activas PRO descritas en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos PRO, anticuerpos anti-PRO, y/o variantes de cada uno), así como otras moléculas identificadas mediante ensayos de cribado descritos anteriormente, puede ser administradas para el tratamiento de enfermedades relacionadas inmunes, en forma de composiciones farmacéuticas. Se preparan formulaciones terapéuticas de la molécula activa PRO, preferentemente un polipéptido o anticuerpo de la invención, para su almacenamiento mediante la mezcla de la molécula activa con un grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. ed. [1980]), en forma de preparados liofilizados o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes, o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los recipientes en las dosis y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tal como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina, conservantes (como cloruro de amonio octadecildimetilbencilo,

cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol fenol, butilo o bencilo; parabenos alquilo como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol, y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor de 10 residuos); proteínas, como albúmina, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona, aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina o, monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos como glucosa, manosa, o dextrina; agentes quelantes, como EDTA, azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, contra-iones formadores de sales como sodio, complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteínas Zn), y/o surfactantes no iónicos como Tween<sup>™</sup>, PLURONICS<sup>™</sup> o polietilenglicol (PEG).

Los compuestos identificados mediante ensayos de cribado aquí descritos pueden formularse de una manera análoga, utilizando técnicas estándar bien conocidas en la técnica.

También pueden utilizarse lipofecciones o liposomas para suministrar la molécula PRO en las células. Si se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibitor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína objetivo. Por ejemplo, basado en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptidos que conservan la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Estos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (ver, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90:7889-7893 [1993]).

La formulación aquí descrita puede contener más de un compuesto activo que sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente con actividades complementarias que no afectan negativamente a las demás. Alternativamente, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocinas o un agente inhibitor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes en la combinación adecuada, en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Las moléculas activas PRO también pueden incluirse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas poli-(methylmethacrylate), respectivamente, en los sistemas de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Las formulaciones que se utilizarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estéril.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida o moléculas PRO. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros sólidos hidrofóbicos que contienen anticuerpos, que son las matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida son poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinylalcohol)), polilactidos (patente US 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido glicólico-ácido láctico degradables, como el LUPRON DEPOT<sup>™</sup> (microesferas inyectables de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y el acetato de leuproluro), y poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque polímeros como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico, ácido glicólico permiten la liberación de las moléculas durante más de 100 días, algunos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, resultando en una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización en función del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubrió que el mecanismo de agregación forma una unión S-S intermolecular a través de intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse mediante la modificación de los residuos de sulfhidrilo, liofilización de soluciones ácidas, el control del contenido de humedad, utilizando aditivos apropiados, y el desarrollo de composiciones específicas de matriz de polímero.

#### O. Procedimientos de tratamiento

Se contempla que los polipéptidos, los anticuerpos y otros componentes activos descritos en el presente documento puedan utilizarse para tratar diversas enfermedades y condiciones autoinmunes relacionadas, tales como las enfermedades mediadas por células T, incluyendo las que se caracterizan por la infiltración de células inflamatorias en un tejido, la estimulación de la proliferación de células T, la inhibición de la proliferación de células T, aumento o disminución de la permeabilidad vascular o la inhibición de la misma.

Las condiciones o trastornos de ejemplo a ser tratados con los polipéptidos, anticuerpos y otros compuestos del presente documento, incluyen, pero no se limitan a lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, osteoartritis, espondiloartropatías, esclerosis sistémica progresiva (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjögren, vasculitis, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inmune-mediada), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), diabetes mellitus, enfermedad renal mediada inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointerstitial), enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico, tal como esclerosis múltiple,

5 polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré, y polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus hepatotropos), hepatitis autoinmune crónica activa, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa y colangitis esclerosante, enfermedades inflamatorias intestinales (colitis ulcerosa: enfermedad de Crohn), enteropatía sensible al  
 10 gluten y enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o mediadas inmunes, incluidas enfermedades de la piel ampollosas, eritema multiforme y dermatitis de contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas de pulmón, tales como neumonías eosinofílica, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplantes, tales como el rechazo del injerto y enfermedad de injerto contra el huésped.

15 En el lupus eritematoso sistémico, el mediador central de la enfermedad es la producción de auto-anticuerpos reactivos a sus propias proteínas/tejidos y la posterior generación de la inflamación mediada inmune. Los anticuerpos, ya sea directamente o indirectamente, median en la lesión tisular. A pesar de que no se ha demostrado que los linfocitos T están directamente implicados en el daño tisular, los linfocitos T son necesarios para el desarrollo de los auto-anticuerpos reactivos. La génesis de la enfermedad depende, pues, de los linfocitos T. Múltiples órganos y sistemas están afectados clínicamente, tal como riñón, pulmón, sistema musculoesquelético, mucocutánea, ojos, sistema nervioso central, sistema cardiovascular, aparato digestivo, médula ósea y la sangre.

20 La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica sistémica autoinmune que afecta principalmente a la membrana sinovial de las articulaciones múltiples, con el perjuicio resultante para el cartílago articular. La patogenia depende de los linfocitos T y se asocia con la producción de factores reumatoides, auto-anticuerpos IgG dirigidos contra uno mismo, con la formación resultante de complejos inmunes que alcanzan niveles elevados en el fluido articular y la sangre. Estos complejos en la articulación pueden inducir a infiltrado marcado de linfocitos y monocitos en la membrana sinovial y los posteriores cambios sinoviales marcados; la unión espacio/fluido si se infiltra mediante células similares  
 25 con la adición de numerosos neutrófilos. Los tejidos afectados son principalmente las articulaciones, a menudo en patrón simétrico. Sin embargo, también se presentan enfermedades extra-articulares en dos formas principales. Una forma es el desarrollo de lesiones extra-articulares con trastorno progresivo de las articulaciones y las lesiones típicas de la fibrosis pulmonar, vasculitis, y úlceras cutáneas. La segunda forma de enfermedad extra-articular es el llamado síndrome de Felty, que se produce al final del transcurso de la enfermedad AR, a veces después de la enfermedad conjunta se ha convertido en quiescente, y consiste en la presencia de neutropenia, trombocitopenia y esplenomegalia. Esto puede ir acompañado de vasculitis en múltiples órganos con formaciones de infartos, úlceras de la piel y gangrena. Los pacientes a menudo también desarrollan nódulos reumatoides en el tejido subcutáneo que cubren las articulaciones afectadas; los nódulos de etapa tardía tienen centros necróticos rodeados por un infiltrado mixto de células inflamatorias. Otras manifestaciones que pueden aparecer en la AR son: pericarditis, pleuritis, arteritis coronaria,  
 30 neumonitis intersticial con fibrosis pulmonar, queratoconjuntivitis seca, y nódulos reumatoides.

35 La artritis crónica juvenil es una enfermedad inflamatoria crónica idiopática que comienza a menudo antes de los 16 años de edad. Su fenotipo tiene algunas similitudes con la AR; algunos pacientes que tienen factores reumatoides positivos se clasifican como artritis reumatoide juvenil. La enfermedad está subclasificada en tres categorías principales: pauciarticular, poliarticular y sistémica. La artritis puede ser grave y es típicamente destructiva y conduce a la anquilosis y el retardo del crecimiento. Otras manifestaciones pueden incluir uveítis anterior crónica y la amiloidosis sistémica.

40 Las espondiloartropatías son un grupo de trastornos con algunas características clínicas comunes y la asociación común con la expresión del producto del gen HLA-B27. Los trastornos incluyen: espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter (artritis reactiva), artritis asociada a enfermedad inflamatoria del intestino, espondilitis asociada con la psoriasis, espondiloartropatía juvenil y espondiloartropatía indiferenciada. Las características distintivas incluyen sacroileitis con o sin espondilitis, artritis inflamatoria asimétrica; asociación con HLA-B27 (un alelo definido serológicamente del locus HLA-B de clase I MHC), inflamación ocular, y ausencia de autoanticuerpos asociados con otra enfermedad reumatoide. La célula más implicada como clave para la inducción de la enfermedad es el linfocito CD8<sup>+</sup> T, una célula que ataca al antígeno presentado mediante moléculas MHC de clase I. Las células CD8<sup>+</sup> T pueden reaccionar en contra del alelo MHC de clase I HLA-B27, como si se tratara de un péptido extraño expresado por moléculas MHC de clase I. Se ha formulado la hipótesis de que un epítipo de HLA-B27 puede simular un epítipo antigénico bacteriano u otro microbiano y, por lo tanto inducir la respuesta de las células CD8<sup>+</sup> T.

45 La esclerosis sistémica (esclerodermia) tiene una etiología desconocida. Una característica distintiva de la enfermedad es la induración de la piel; probablemente esta es inducida por un proceso inflamatorio activo. La esclerodermia puede ser localizada o sistémica; las lesiones vasculares son comunes y la lesión de las células endoteliales de la microvasculatura es un evento temprano e importante en el desarrollo de la esclerosis sistémica; la lesión vascular puede ser mediada inmune. Una base inmunológica está implicada por la presencia de infiltrados de células mononucleares en las lesiones cutáneas y la presencia de anticuerpos anti-nucleares en muchos pacientes. La ICAM-1 suele estar regulada al alza en la superficie celular de los fibroblastos en lesiones de la piel, lo que sugiere que la interacción de las células T con estas células puede tener un papel en la patogénesis de la enfermedad. Otros órganos involucrados son: tracto gastrointestinal: atrofia del músculo liso y fibrosis resultante del peristaltismo anormal/motilidad; renal: proliferación íntima subendotelial concéntrica que afecta a las arterias interlobulares pequeñas y arqueadas; con la consiguiente reducción del flujo sanguíneo renal cortical, resulta en proteinuria, uremia e hipertensión arterial;  
 50 esquelético muscular: atrofia, fibrosis intersticial, inflamación; pulmón: neumonitis intersticial y fibrosis intersticial, y

corazón: necrosis de banda de contracción, cicatrices/fibrosis.

5 Las miopatías inflamatorias idiopáticas incluyen dermatomiositis, polimiositis y otros trastornos de inflamación muscular crónicos de etiología desconocida que resultan en debilidad muscular. Las lesiones o inflamaciones musculares suelen ser simétricas y progresivas. Los autoanticuerpos están asociados con la mayoría de las formas. Estos autoanticuerpos específicos de miositis se dirigen contra e inhiben la función de los componentes, las proteínas y ARN implicados en la síntesis de proteínas.

10 El síndrome de Sjögren es debido a la inflamación mediada inmune y la destrucción funcional posterior de las glándulas lacrimales y de las glándulas salivales. La enfermedad puede estar asociada con o acompañada de enfermedades inflamatorias del tejido conectivo. La enfermedad está asociada con la producción de autoanticuerpos contra antígenos Ro y La, los cuales son pequeños complejos ARN-proteína. Las lesiones resultan en queratoconjuntivitis seca, xerostomía, con otras manifestaciones o asociaciones como la cirrosis biliar, neuropatía periférica o sensorial, y púrpura palpable.

15 Las vasculitis sistémicas son enfermedades en las que la lesión primaria es la inflamación y el daño posterior en los vasos sanguíneos que se traduce en isquemia/necrosis/degeneración de los tejidos suministrados por los vasos afectados y la eventual disfunción final de los órganos en algunos casos. La vasculitis también puede producirse como una lesión secundaria o secuelas de otras enfermedades inflamatorias mediadas inmunes, como la artritis reumatoide, la esclerosis sistémica, etc., en particular en las enfermedades que también se asocian con la formación de complejos inmunes. Las enfermedades en el grupo de de las vasculitis sistémicas primarias son: vasculitis necrotizante sistémica: poliarteritis nodosa, vasculitis alérgica y granulomatosis, poliangeítis, granulomatosis de Wegener, granulomatosis linfomatoide, y arteritis de células gigantes. Varias vasculitis incluyen: síndrome de los ganglios linfáticos mucocutáneos (MLNS o enfermedad de Kawasaki), vasculitis CNS aislada, enfermedad de Behet, tromboangeítis obliterante (enfermedad de Buerger) y venulitis cutáneas necrotizantes. El mecanismo patogénico de la mayoría de los tipos de vasculitis indicados se cree que es debido principalmente a la deposición de inmunoglobulinas en la pared de los vasos y la posterior inserción de una respuesta inflamatoria, o bien a través de ADCC, activación de complemento, o ambos.

30 La sarcoidosis es una enfermedad de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de granulomas epitelioides en casi cualquier tejido en el cuerpo, siendo la participación del pulmón más común. La patogénesis implica la persistencia de macrófagos activados y de células linfoides en los sitios de la enfermedad con secuelas crónicas posteriores resultantes de la liberación de productos activos a nivel local y sistémico liberados por estos tipos de células.

35 La anemia hemolítica autoinmune, que incluye anemia hemolítica autoinmune, pancitopenia inmunológica, y hemoglobinuria paroxística nocturna es el resultado de la producción de anticuerpos que reaccionan con los antígenos expresados en la superficie de los glóbulos rojos (y en algunos casos las demás células sanguíneas, incluyendo también plaquetas) y es un reflejo de la eliminación de las células recubiertas de anticuerpos a través de la lisis mediada por complemento y/o mecanismos mediados con ADCC/receptor FC.

40 En la trombocitopenia autoinmune como la púrpura trombocitopénica, y la inmunidad mediada por trombocitopenia en otros entornos clínicos, la destrucción/eliminación de plaquetas se produce como resultado de la fijación de anticuerpos o complementos correspondientes a las plaquetas y la posterior eliminación de lisis de complemento, mecanismos de mediación ADCC o receptor FC.

45 La tiroiditis que incluye la enfermedad de Graves, la tiroiditis de Hashimoto, la tiroiditis linfocítica juvenil y la tiroiditis atrófica son el resultado de una respuesta autoinmunitaria contra antígenos de tiroides con producción de anticuerpos que reaccionan con las proteínas presentes en, y con frecuencia específica para, la glándula tiroides. Existen modelos experimentales, que incluyen modelos espontáneos: ratas (ratas BUF y BB) y pollos (cepa de pollos obesos); modelos inducibles: la inmunización de los animales con cualquiera de tiroglobulina, antígeno microsomal de tiroides (peroxidasa tiroidea).

50 La diabetes mellitus tipo I o diabetes insulino-dependiente es la destrucción autoinmune de las células de los islotes pancreáticos; esta destrucción está mediada por auto-anticuerpos y células T auto-reactivas. Los anticuerpos a la insulina o el receptor de la insulina también pueden producir el fenotipo de no respuesta a la insulina.

55 Las enfermedades inmunes mediadas renales, incluyendo glomerulonefritis y nefritis tubulointersticial, son el resultado de anticuerpos o la lesión mediada por linfocitos T en el tejido renal, ya sea directamente como resultado de la producción de anticuerpos o células T autorreactivas contra antígenos renales o indirectamente como resultado de la deposición de anticuerpos y/o complejos inmunes en el riñón que son reactivas frente a otros antígenos no renales. Por lo tanto, otras enfermedades inmunes mediadas que resultan en la formación de complejos inmunes también puede inducir a una enfermedad renal mediada inmune como secuela indirecta. Tanto los mecanismos inmunes directos como los indirectos resultan en la respuesta inflamatoria que produce/induce el desarrollo de lesiones en los tejidos renales con la consiguiente insuficiencia de la función del órgano y, en algunos casos, la progresión a insuficiencia renal. Tanto los mecanismos de inmunidad humoral como celular pueden estar implicados en la patogénesis de las lesiones.

65 Las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico, incluyendo esclerosis múltiple,

5 polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barré y polineuropatía crónica inflamatoria desmielinizante, se cree que tienen una base autoinmune y dan lugar a la desmielinización nerviosa como consecuencia de los daños causados a los oligodendrocitos o directamente a la mielina. En MS, hay evidencias que sugieren que la inducción y progresión de la enfermedad depende de los linfocitos T. La esclerosis múltiple es una enfermedad desmielinizante dependiente de los linfocitos T y tiene un transcurso de recaída-remisión o un transcurso crónico progresivo. La etiología es desconocida; sin embargo, las infecciones virales, la predisposición genética, el medio ambiente, y la autoinmunidad, todos contribuyen. Las lesiones contienen infiltrados de células microgliales mediadas de linfocitos T predominantemente y la infiltración de macrófagos; los linfocitos CD4<sup>+</sup>T son el tipo celular predominante en las lesiones. El mecanismo de la muerte celular de oligodendrocitos y la desmielinización posterior no se conocen, pero es probable que se accione con linfocitos T.

15 Las enfermedades inflamatorias y fibróticas pulmonares, incluyendo neumonía eosinófilica, fibrosis pulmonar idiopática, y neumonitis por hipersensibilidad, pueden implicar una respuesta inmunitaria inflamatoria desregulada. La inhibición de esa respuesta sería de beneficio terapéutico.

La enfermedad de la piel mediada autoinmune o inmune, incluyendo enfermedades bulloso de la piel, eritema multiforme, y dermatitis de contacto, están mediadas por auto-anticuerpos, la génesis de los cuales es dependiente de los linfocitos T.

20 La psoriasis es una enfermedad inflamatoria mediada con linfocitos T. Las lesiones contienen infiltrados de linfocitos T, macrófagos y células de procesamiento de antígenos, y algunos neutrófilos.

25 Las enfermedades alérgicas, incluyendo asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a los alimentos, y urticaria son dependientes los linfocitos T. Estas enfermedades son principalmente mediadas por inflamación inducida por linfocitos T, inflamación mediada por IgE, o una combinación de ambas.

Las enfermedades asociadas a trasplantes, incluido el rechazo del injerto y la enfermedad injerto contra huésped (GVHD) son dependientes de los linfocitos T; la inhibición de la función de los linfocitos T es paliativa.

30 Otras enfermedades en las que la intervención de la respuesta inmunitaria y/o inflamatoria tiene beneficios son las enfermedades infecciosas, incluyendo pero no limitado a las infecciones virales (incluyendo pero no limitado a SIDA, la hepatitis A, B, C, D, E y el herpes), infecciones bacterianas, infecciones fúngicas e infecciones de protozoos y parasitarias (moléculas (o derivados/agonistas) que estimulan la MLR se pueden utilizar terapéuticamente para mejorar la respuesta inmunitaria a agentes infecciosos), enfermedades de inmunodeficiencia (moléculas/derivados/agonistas) que estimulan la MLR pueden ser utilizados terapéuticamente para mejorar la respuesta inmunitaria a las condiciones de inmunodeficiencia heredada, adquirida, infecciosa inducida (como en la infección por VIH), o iatrogénica (por ejemplo, a partir de la quimioterapia), y neoplasia.

40 Se ha demostrado que algunos pacientes con cáncer desarrollan un anticuerpo y/o respuesta de linfocitos T a los antígenos en células neoplásicas. También se ha demostrado en modelos animales de neoplasia de que el fortalecimiento de la respuesta inmunitaria puede resultar en el rechazo o la regresión de esta neoplasia en particular. Las moléculas que aumentan la respuesta de los linfocitos T en el MLR tienen utilidad *in vivo* en la mejora de la respuesta inmunitaria contra la neoplasia. Las moléculas que aumentan la respuesta proliferativa de linfocitos T en el MLR (o los agonistas de pequeñas moléculas o anticuerpos que afectaban a los mismos receptores de manera agonística) pueden ser utilizadas terapéuticamente para tratar el cáncer. Las moléculas que inhiben la respuesta de los linfocitos en la MLR también funcionan *in vivo* durante las neoplasias para suprimir la respuesta inmunitaria a una neoplasia; tales moléculas pueden ser expresadas mediante células neoplásicas por sí mismas o su expresión puede ser inducida por el neoplasma en otras células. El antagonismo de estas moléculas inhibitoras (ya sea con anticuerpos, antagonistas de moléculas pequeñas u otros medios) aumenta el rechazo del tumor mediado inmune.

50 Además, la inhibición de moléculas con propiedades proinflamatorias puede tener efectos terapéuticos en la lesión de reperusión; accidentes cerebrovasculares, infarto de miocardio, aterosclerosis, la lesión pulmonar aguda, shock hemorrágico; sepsis/shock séptico, necrosis tubular aguda, endometriosis, enfermedad degenerativa de las articulaciones y pancreatitis. Los compuestos del presente documento, por ejemplo, polipéptidos o anticuerpos, son administrados a un mamífero, preferiblemente un ser humano, de acuerdo con procedimientos ya conocidos, como la administración intravenosa en bolo o en infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, articular, intrasnovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación (intranasal, intrapulmonar). Se prefiere la administración intravenosa o por inhalación de polipéptidos y anticuerpos. En la terapia inmunoadyuvante, otros regímenes terapéuticos, la administración de dichos un agente anti-cáncer, puede combinarse con la administración de las proteínas, los anticuerpos o los compuestos del presente documento. Por ejemplo, el paciente a ser tratado con un inmunoadyuvante del presente documento también puede recibir un agente anti-cáncer (agente de quimioterapia) o radioterapia. La preparación y los esquemas de dosificación de estos fármacos quimioterapéuticos pueden utilizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante o determinarse empíricamente por el médico experto. La preparación y los esquemas de dosificación para la quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service, Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente de quimioterapia puede preceder o seguir la administración del inmunoadyuvante o se puede administrar simultáneamente con el mismo.

Además, un compuesto anti-estrógeno como el tamoxifeno o una anti-progesterona, como onapristona (ver, EP 616.812) se puede administrar en dosis conocidas para tales moléculas. Puede ser conveniente también administrar anticuerpos contra la enfermedad inmunológica asociada o antígenos tumorales asociados, tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, o factor del endotelio vascular (VEGF). Alternativamente, o además, dos o más anticuerpos que se unen al mismo o dos o más antígenos diferentes aquí descritos pueden administrarse al paciente. A veces, puede ser beneficioso también administrar una o más citocinas al paciente. En una realización, los polipéptidos PRO se administran junto con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento se puede administrar en primer lugar, seguido por un polipéptido PRO. Sin embargo, también se contempla la administración simultánea o una primera administración. Las dosis adecuadas para el agente inhibidor del crecimiento son las que se utilizan actualmente y pueden ser bajas debido a la acción combinada (sinergia) del agente inhibidor del crecimiento y del polipéptido PRO. Para el tratamiento o la reducción en la gravedad de las enfermedades inmunes relacionadas, la dosis apropiada de un compuesto del presente documento dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente es administrados con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al complejo, y la discreción del médico que atiende. El compuesto se administra adecuadamente al paciente de una vez o en una serie de tratamientos.

Por ejemplo, en función del tipo y de la severidad de la enfermedad, aproximadamente de 1 mg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de polipéptido o anticuerpo es una dosis inicial candidata para la administración al paciente, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante perfusión continua. Una dosis diaria típica puede variar desde aproximadamente 1 mg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para la administración repetida durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, otros regímenes de dosificación pueden ser útiles. El progreso de esta terapia se controla fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

#### P. Artículos de fabricación

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contienen materiales (por ejemplo, que comprende una molécula PRO) útiles para el diagnóstico o el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y unas instrucciones. Contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos, jeringas y tubos de ensayo. Los contenedores pueden formarse de una variedad de materiales, tal como vidrio o plástico. El contenedor tiene una composición que es eficaz para el diagnóstico o el tratamiento de la enfermedad y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el contenedor puede ser una bolsa de solución intravenosa o un frasco con un tapón perforable mediante una aguja hipodérmica). El agente activo en la composición suele ser un polipéptido o un anticuerpo de la invención. Unas instrucciones o una etiqueta están asociadas con el envase, indicando que la composición se utiliza para diagnosticar o tratar la condición de elección. El artículo de fabricación de dichos productos podrá incluir un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, como solución tamponada de fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Asimismo, podrá incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y el prospecto con las instrucciones de uso.

#### Q. Diagnóstico y pronóstico de la enfermedad inmune relacionada

Las proteínas de la superficie de la célula, tales como las proteínas que se sobreexpresan en ciertas enfermedades autoinmunes relacionadas, son excelentes objetivos para los candidatos de fármacos o tratamiento de la enfermedad. Las mismas proteínas, junto con las proteínas secretadas codificadas por los genes amplificados en los estados de enfermedad inmune relacionada encuentran un uso adicional en el diagnóstico y el pronóstico de estas enfermedades. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos contra los productos de proteína de los genes amplificados en la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, enfermedad intestinal inflamatoria u otra enfermedad relacionada inmunitaria, pueden ser utilizados como diagnóstico o pronóstico.

Por ejemplo, se puede utilizar anticuerpos, incluidos los fragmentos de anticuerpos, para detectar cualitativa o cuantitativamente la expresión de las proteínas codificadas por los genes amplificados o sobreexpresados ("productos de gen marcador"). El anticuerpo preferiblemente está equipado con un detectable, por ejemplo, una etiqueta fluorescente y la unión se puede controlar mediante microscopía de luz, citometría de flujo, fluorimetría, u otras técnicas conocidas en la técnica. Estas técnicas son especialmente adecuadas si el gen sobreexpresado codifica una proteína de superficie celular. Estos ensayos de unión se realizan esencialmente tal como se describe anteriormente.

La detección *in situ* de la unión del anticuerpo a los productos del gen marcador se puede realizar, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o microscopía inmunoelectrónica. Con este fin, una muestra histológica se retira del paciente, y se aplica un anticuerpo marcado, preferentemente mediante la superposición de anticuerpos en una muestra biológica. Este procedimiento también permite determinar la distribución del producto del gen marcador en el tejido examinado. Será evidente para los expertos en la materia que una amplia variedad de procedimientos histológicos están fácilmente disponibles para la detección *in situ*.

Los siguientes ejemplos se ofrecen sólo a efectos ilustrativos, y no están destinados a limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

## EJEMPLOS

Los reactivos disponibles comercialmente a los que se hace referencia en los ejemplos fueron utilizados según las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de las células que se identifican en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria, mediante números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

### EJEMPLO 1

#### Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO1031 humano

Las secuencias de dominio extracelular (ECD) (que incluyen la señal de secreción, si la hubiera) de alrededor de 950 proteínas secretadas conocidas a partir de la base de datos pública de proteínas Suiza-Prot se utilizaron para buscar en bases de datos de etiquetas de secuencias expresadas (EST). Las bases de datos incluyen bases de datos públicas EST (por ejemplo, GenBank, Merck/Wash U.) y una base de datos de propiedad de ADN CEST (LIFESEQ. Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST2 (Altshul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)) como comparación de las secuencias de proteínas ECD en una traslación de 6 marcos de la secuencia EST. Estas comparaciones resultan en una puntuación BLAST de 70 (o en algunos casos, 90) o más, que no codifican proteínas conocidas, que se agruparon y unieron en secuencias de ADN de consenso con el programa "Phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Un fragmento de la secuencia virtual inicial (conjunto de consenso) se reunió respecto a otras secuencias EST utilizando Phrap. La primera secuencia de ADN de consenso se extendió mediante ciclos repetidos de BLAST y Phrap ampliar la secuencia de consenso lo máximo posible, utilizando las fuentes de secuencias EST descritas anteriormente. Los resultados de este conjunto el consenso se conoce como DNA47332.

Se examinó también una secuencia que comprende el conjunto de consenso, W74558 (clon 344.649). La secuencia se obtuvo del consorcio IMAGE y se analizó. Lennon et al., *Genomics*, 33: 151 (1996). La secuenciación de ADN dio la secuencia de ADN de longitud completa para PRO1031 [aquí designada como DNA59294-1381] (SEQ ID NO: 1) y la secuencia de proteína PRO 1031 derivada (UNQ516) (SEQ ID NO: 2).

La secuencia de nucleótidos completa de DNA59294-1381 se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1). El clon DNA59294-1381 contiene un único marco abierto de lectura con el sitio de inicio de traslación aparente de nucleótidos en las posiciones 42-44 y termina en el codón de detención en las posiciones 582-584 de los nucleótidos (Figura 1, SEQ ID NO: 1). El precursor de polipéptido previsto tiene 180 aminoácidos (Figura 2, SEQ ID NO: 2). La proteína de longitud completa PRO1031 (UNQ516), que se muestra en la Figura 2 (SEQ ID NO: 2), tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 20.437 daltons y un IP de alrededor de 9,58. El clon DNA59294-1381 ha sido depositado en la ATCC, y se le ha asignado el número de depósito 209866. En el caso de irregularidades o errores de secuenciación con las secuencias aquí previstas, se entiende que el clon depositado contiene la secuencia correcta para DNA59624-1381 (SEQ ID NO: 1). Además, las secuencias aquí previstas son el resultado de técnicas de secuenciación conocidas.

El análisis de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de longitud total PRO1031 (UNQ516) (SEQ ID NO: 2) sugiere que se trata de un nuevo homólogo de interleucina-17, en lo sucesivo designada como IL-17B.

Un análisis adicional de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 revela que el péptido señal putativo es de aproximadamente 1-20 de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Un sitio de N-glicosilación está en aproximadamente los aminoácidos 75-78 de SEQ ID NO: 2. Una región con identidad de secuencia con la IL-17 está en aproximadamente los aminoácidos 96-180. Los nucleótidos correspondiente se puede determinar de forma rutinaria debido a la secuencia prevista en el mismo.

### EJEMPLO 2

#### Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO1122 humano

Una base de datos de ADN (LIFESEQ<sup>+</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) de etiquetas de secuencias expresadas (EST) fue buscada y se identificó un EST. El CEST era Incyte 1347523, también llamado DNA49665. Sobre la base de DNA49665, se sintetizaron oligonucleótidos: 1) para identificar mediante PCR una librería de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de la longitud completa de la secuencia de codificación PRO112 [por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Los cebadores PCR de avance y retroceso generalmente oscilan entre 20 y 30 nucleótidos y se han diseñado para

ofrecer un producto PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de las sondas tienen típicamente 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia de consenso es mayor de aproximadamente 1-1,5 kpb. Con el fin de cribar de varias librerías para un clon de longitud completa, el ADN de las librerías se cribó mediante amplificación PCR, como en Ausuble et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, con el par de cebadores PCR. Una librería positiva se utilizó para aislar los clones que codifican el gen de interés utilizando los oligonucleótidos y la sonda de uno de los pares de cebadores.

Los cebadores PCR (de avance, inversos e hibridación) fueron sintetizados:

10 cebador PCR de avance: 5'-ATCCACAGAAGCTGGCCTTCGCCG-3' (SEQ ID NO: 19)  
 cebador PCR inverso: 5'-GGGACGTGGATGAACTCGGTGTGG-3' (SEQ ID NO: 20)

sonda de hibridación:

15 5'-TATCCACAGAAGCTGGCCTTCGCCGAGTGCCTGTGCAGAG-3' (SEQ ID NO: 21).

Con el fin de cribar varias librerías para una fuente de un clon de longitud completa, el ADN de las librerías se cribó mediante amplificación por PCR con el par de cebadores PCR identificados anteriormente. Una librería positiva se utilizó a continuación para aislar los clones que codifican el gen PRO1122 utilizando los oligonucleótidos y la sonda de uno de los cebadores PCR.

25 El ARN para la construcción de las librerías de ADNc fue aislado a partir de tejido renal de feto humano. Las librerías de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc fueron construidas utilizando procedimientos estándar que utilizan reactivos disponibles comercialmente, como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc fue preparado con oligo dT que contiene un sitio NotI, vinculado con estabilizador para adaptadores Sall hemiquinados, separados con NotI, dimensionados apropiadamente mediante electroforesis en gel, y clonados en una orientación definida en un vector de clonación apropiado (como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SFII; *ver*, Holmes et al., *Science*, 235: 1278-1280 (1991)) en sitios XhoI y NotI únicos.

30 La secuenciación del ADN de los clones aislados tal como se describió anteriormente dio la secuencia de ADN de longitud completa para PRO1122 [aquí designada como DNA62377-1381-1] (SEQ ID NO: 3) y la secuencia de proteínas PRO1122 (UNQ561) (SEQ ID NO: 4) derivada.

35 La secuencia de nucleótidos completa DNA62377-1381-1 (SEQ ID NO: 3) se muestra en la Figura 3 (SEQ ID NO: 3). El clon DNA62377-1381-1 (SEQ ID NO: 3) contiene un único marco abierto de lectura con el sitio de inicio de traslación aparente de los nucleótidos en las posiciones 50-52 y termina en el codón de detención en las posiciones de los nucleótidos 641-643 SEQ ID NO: 3 (Figura 3). El precursor de polipéptido previsto tiene 197 aminoácidos (Figura 4, SEQ ID NO: 4). La proteína PRO1122 de longitud completa se muestra en la Figura 4 (UNQ561) (SEQ ID NO: 4), tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 21.765 daltons y un IP de alrededor de 8,53. El clon DNA62377-1381-1 ha sido depositado en la ATCC el 22 de diciembre de 1998 y se le ha asignado el número de depósito 203.552. Se entiende que en el caso de irregularidad o error de secuenciado en las secuencias aquí previstas, la secuencia correcta es la secuencia depositada. Además, todas las secuencias aquí previstas son el resultado de técnicas de secuenciación conocidas.

45 El análisis de la secuencia de aminoácidos PRO1122 aislada de longitud completa (UNQ561) sugiere que tiene similitud con IL-17, lo que indica que PRO1122 (UNQ561) puede ser una citocina nueva y se designa aquí IL-17C. La Figura 4 (SEQ ID NO: 4) también muestra la ubicación aproximada del péptido señal, el patrón de cremallera de leucina, y una región que tiene identidad de secuencia con IL-17.

### 50 EJEMPLO 3

#### Aislamiento de clones de ADNc que codifican PRO10272 humano

55 Las secuencias de dominio extracelular (ECD) (incluyendo la secuencia de señales de secreción, en su caso) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos pública Swiss-Prot se utilizan para buscar secuencias de ADN genómico de GenBank. La búsqueda se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST2 [Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)] como comparación de las secuencias de proteínas ECD en una traslación de 6 marcos de las secuencias EST. Esas comparaciones resultan en una puntuación BLAST de 70 (o en algunos casos, 90) o más que no codifican proteínas conocidas, que se agruparon y unieron en secuencias de ADN de consenso con el programa "Phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington ).

65 Una secuencia de ADN de consenso se formó en relación con otras secuencias EST utilizando Phrap tal como se describe anteriormente. Esta secuencia de consenso se designa aquí DNA146646. En algunos casos, la secuencia de consenso se deriva de una secuencia de consenso de ADN intermedia que se extendió usando ciclos repetidos de BLAST y Phrap para extender esa secuencia de consenso intermedia lo máximo posible, utilizando las fuentes de secuencias EST descritas anteriormente.

Basado en la secuencia de consenso DNA146646, oligonucleótidos fueron sintetizados: 1) para identificar mediante PCR una librería de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de secuencia de codificación completa para PRO10272. Los cebadores PCR de avance e inversos generalmente oscilan entre 20 y 30 nucleótidos y se han diseñado para ofrecer un producto PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de la sonda tienen típicamente 40-55 pb de longitud. En algunos casos, los oligonucleótidos complementarios se sintetizan cuando la secuencia de consenso es mayor de 1-1,5 kbp. Con el fin de cribar varias librerías para un clon de longitud completa, el ADN de las librerías se cribó mediante amplificación por PCR, como en Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, con el par de cebadores PCR. Una librería positiva se utilizó para aislar los clones que codifica el gen de interés utilizando los oligonucleótidos de sonda de uno de los pares de cebadores.

Cebadores PCR (de avance e inversos) fueron sintetizados:

15 cebador PCR de avance:  
5'-GTTGCATTCITGGCAATGGTCATGGGA -3' (SEQ ID NO: 22)

cebador PCR inverso:

20 5'-GGTCCATGTGGGAGCCTGTCTGTA-3' (SEQ ID NO: 23)

Además, una sonda de hibridación de oligonucleótidos sintética se construyó a partir de la secuencia de DNA146646 de consenso que tenía la secuencia de nucleótidos siguiente:

25 sonda de hibridación  
5'-CAGCAGCTCCTCAGAGGTGTCCTGCCCTTTGCTGGGGCAGCAGCT-3' (SEQ ID NO: 24)

El ARN para la construcción de las librerías de ADNc fue aislado de los tejidos humanos de testículo. Las librerías de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc fueron construidas mediante procedimientos estándar que utilizan reactivos disponibles comercialmente, como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc fue preparado con oligo dT que contiene un sitio NotI, vinculado con estabilizador para adaptadores Sall hemiquinados, separados con NotI, dimensionados apropiadamente mediante electroforesis en gel, y clonados en una orientación definida en un vector de clonación apropiado (como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SFI; ver, Holmes et al., *Science*, 253:1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y NotI.

35 La secuenciación del ADN de los clones aislados tal como se describió anteriormente dio la secuencia de ADN de longitud completa para un polipéptido de longitud completa PRO10272 (designada aquí como DNA147531-2821 [Figura 5, SEQ ID NO: 5]) y la secuencia de proteínas derivadas de ese polipéptido PRO10272.

40 El clon de longitud completa identificado anteriormente contenía un único marco abierto de lectura con el sitio de inicio de traslación aparente en las posiciones de los nucleótidos 259-261 y una señal de detención en las posiciones de los nucleótidos 790-792 (Figura 5, SEQ ID NO: 5). El precursor de polipéptido previsto tiene 177 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 20.330 daltons y un pI estimado de aproximadamente 8,78. El análisis de la secuencia de longitud completa PRO10272 mostrada en la Figura 6 (SEQ ID NO: 6) evidencia la presencia de una variedad de dominios de polipéptido importantes tal como se muestra en la figura 6, donde los sitios dados a esos dominios de polipéptido importantes son aproximados, ya descritos anteriormente. El clon DNA147531-2821 ha sido depositado en ATCC el 11 de enero de 2000 y se le asigna el depósito ATCC no. PTA-1185.

50 El análisis de la secuencia de aminoácidos de PRO10272 aislado de longitud completa sugiere que posee similitud con la IL-17 y varios homólogos de la misma, lo que indica que PRO10272 puede ser una citocina nueva y se designa aquí IL-17E. Específicamente, un análisis de la base de datos Dayhoff (versión 35.45 SwissProt 35), utilizando el análisis de alineación de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa que se muestra en la figura 6 (SEQ ID NO: 6), puso en evidencia la identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos PRO10272 y las siguientes secuencias Dayhoff: P\_Y22197, P\_W85620, AF18469\_1, P\_Y41762, P\_Y28235, P\_W97350, P\_Y22198, P\_Y28236, P\_W28514, P\_W13651.

#### EJEMPLO 4

##### Aislamiento de clones de ADNc que codifican un PRO21175 humano

60 Se buscó en una base de datos de ADN de Merck / Universidad de Washington una etiqueta de secuencias expresadas (EST) y se identificó un EST que mostró homología con la interleucina-17.

65 Un grupo de 50 diferentes librerías de ADNc humano de diversos tejidos se utilizó en la clonación. Las librerías de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc que codifican PRO21175 humano fueron construidas mediante procedimientos estándar que utilizan reactivos disponibles comercialmente, como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc fue

preparado con oligo dT que contiene un sitio NotI, vinculado con estabilizador para adaptadores Sall hemiquinasados, separados con NotI, dimensionados apropiadamente mediante electroforesis en gel, y clonados en una orientación definida en un vector de clonación apropiado (como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SFI; ver, Holmes et al., Science, 253:1278-1280 (1991)) en la única XhoI y NotI.

Las sondas de oligonucleótidos basadas en la secuencia EST antes descritas se sintetizan a continuación: 1) para identificar mediante PCR una librería de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de secuencia completa de codificación para PRO21175. Los cebadores PCR de avance e inversos generalmente oscilan entre 20 y 30 nucleótidos y se han diseñado para ofrecer un producto PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de la sonda tienen típicamente 40-55 pb de longitud. Con el fin de cribar varias librerías para un clon de longitud completa, el ADN de las librerías se cribó mediante amplificación por PCR, como en Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, *supra*, con el par de cebadores PCR. Una librería positiva se utilizó a continuación para aislar los clones que codifican el gen de interés utilizando los oligonucleótidos de sonda y uno de los pares de cebadores.

Las sondas de oligonucleótidos utilizadas fueron las siguientes:  
 cebador PCR de avance 5'-PCR GCTCAGTGCCTTCCACCACACGC-3' (SEQ ID NO: 25)  
 cebador PCR inverso 5'-CTGCGTCTTCTCCGGCTCGG-3' (SEQ ID NO: 26)

sonda de hibridación

5' CGTTCCGTCTACACCGAGGCCTACGTCACCATCCCCGTGGGCTGC-3' (SEQ ID NO: 27)

Un clon de longitud completa fue identificado, que contenía un único marco abierto de lectura con un sitio de inicio de traslación aparente de los nucleótidos en las posiciones 1-3 y una señal de detención en las posiciones de los nucleótidos 607-609 (Figura 7, SEQ ID NO: 7). El precursor polipéptido previsto tiene 202 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 21.879 daltons y un pI estimado de aproximadamente 9,3. El análisis de la secuencia de longitud completa PRO21175 mostrada en la Figura 8 (SEQ ID NO: 8) evidencia la presencia de una variedad de dominios de polipéptido importantes, tal como se muestra en la Figura 8, en donde los sitios dados a esos dominios de polipéptido importantes son aproximados, ya descritos anteriormente. El mapeado del cromosoma evidencia que el ácido nucleico que codifica PRO21175 mapea para 13q11 en humanos. El clon DNA173894-2947 ha sido depositado en ATCC el 20 de junio de 2000 y se le asigna depósito ATCC no. PTA-2108.

El análisis de la secuencia de aminoácidos de PRO21175 aislado de longitud completa sugiere que posee similitud con IL-17, lo que indica que PRO21175 puede ser una citocina nueva y se designa aquí IL-17D. Específicamente, un análisis de la base de datos de proteínas (versión 35.45 SwissProt 35), utilizando el análisis de alineación de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa de la figura 8 (SEQ ID NO: 8), puso en evidencia la identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos PRO21175 y la siguiente secuencia: AF152099\_1.

## EJEMPLO 5

### Aislamiento de clones de ADNc que codifican un PRO5801 humano

Las secuencias de dominio extracelular (ECD) (incluyendo la secuencia de señales de secreción, en su caso) de aproximadamente 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos pública Swiss-Prot se utilizan para buscar bases de datos EST. Las bases de datos EST incluyen (1) bases de datos EST públicas (por ejemplo, GenBank) y (2) una base de datos de propiedad LIFESEQ EST, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST2 [Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)] como comparación de las secuencias de proteínas EDC en una traducción de 6 marcos de las secuencias EST. Esas comparaciones resultan en una puntuación BLAST de 70 (o en algunos casos, 90) o más que no codifican proteínas conocidas, que se agruparon y juntaron en secuencias de ADN de consenso con el programa "Phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington).

Una secuencia de ADN de consenso se juntó en relación con otras secuencias EST utilizando Phrap, tal como se ha descrito anteriormente. Esta secuencia de consenso se designa aquí DNA105850. En algunos casos, la secuencia de consenso se deriva de una secuencia de ADN de consenso intermedia, que se extiende usando ciclos repetidos de BLAST y Phrap para extender esa secuencia de consenso intermedia lo máximo posible, utilizando las fuentes de secuencias EST descritas anteriormente.

Sobre la base de la secuencia de consenso DNA105850, fueron sintetizados oligonucleótidos: 1) para identificar mediante PCR una librería de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de secuencia de codificación completa para PRO5801. Los cebadores PCR de avance e inversos en general oscilan entre 20 y 30 nucleótidos, y se han diseñado para ofrecer un producto PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de la sonda tienen típicamente 40-55 pb de longitud. En algunos casos, se sintetizan oligonucleótidos adicionales cuando la secuencia de consenso es mayor de 1-1,5 kbp. Con el fin de cribar varias librerías para un clon de longitud completa, el ADN de las librerías se proyectó mediante amplificación PCR, según

Ausubel *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, con el cebador par PCR. Una librería positiva se utilizó para aislar los clones que codifican el gen de interés utilizando los oligonucleótidos y la sonda de uno de los pares de cebadores.

- 5 Los cebadores PCR (de avance e inversos) fueron sintetizados:  
 cebador PCR de avance 1 5'-ACTCCATATTTTCTACTTGTGGCA-3' (SEQ ID NO: 28)  
 cebador PCR de avance 2 5'-CCCAAAGTGACCTAAGAAC-3' (SEQ ID NO: 29)  
 cebador PCR inverso PCR 5'-TCACTGAATTTCTCAAACCATTGCA-3' (SEQ ID NO: 30)

- 10 Además, se construyó una sonda de hibridación de oligonucleótidos sintéticos a partir de las secuencias de ADN 105850 de consenso que tenían la siguiente secuencia de nucleótidos  
 sonda de hibridación  
 5'-TGTGGCAGCGACTGCATCCGACATAAAGGAACAGTTGTGCTCTGCCACA-3' (SEQ ID NO: 31)

- 15 El ARN para la construcción de las librerías de ADNc fue aislado a partir de tejidos humanos de hígado fetal. Las librerías de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc fueron construidas mediante procedimientos estándar que utilizan reactivos disponibles comercialmente, tal como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc fue preparado con oligo dT que contiene un sitio NotI, vinculado con estabilizador para adaptadores Sall hemiquinasados, separado con NotI, dimensionado apropiadamente mediante electroforesis en gel, y clonado en una orientación definida en un vector de clonación apropiado (como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SFII; *ver*, Holmes et al., *Science*, 253:1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y NotI.

- 20 La secuenciación del ADN de los clones aislados tal como se describió anteriormente dio la secuencia de ADN de longitud completa para un polipéptido de longitud completa PRO5801 (designado aquí como DNA115291-2681 [Figura 11, SEQ ID NO: 11]) y la secuencia de proteínas derivadas de ese polipéptido PRO5801.

- 25 El clon de longitud completa identificado anteriormente contenía un único marco abierto de lectura con el sitio de inicio de traslación aparente de nucleótidos en las posiciones 7-9 y una señal de detención en las posiciones de los nucleótidos 1513-1515 (Figura 12, SEQ ID NO: 12). El precursor del polipéptido previsto es de 502 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 55.884 daltons y un pI estimado de aproximadamente 8,52. El análisis de la secuencia de longitud completa PRO5801 mostrado en la Figura 12 (SEQ ID NO: 12) evidencia la presencia de una variedad dominios de polipéptido importantes, tal como se muestra en la Figura 12, donde los sitios dados a esos dominios polipéptido importantes son aproximados, tal como se ha descrito anteriormente. El clon DNA115291-2681 ha sido depositado en ATCC el 8 de junio de 1999 y se le asigna el número de depósito ATCC PTA-202.

- 30 Un análisis de la base de datos Dayhoff muestra que el PRO5801 tiene similitud de secuencia con una proteína receptora IL-17 y PRO5801 está también designado aquí como IL-17RH1, tal como se describe en el Ejemplo 22 de la presente solicitud. Específicamente, un análisis de la base de datos Dayhoff (versión 35.45 SwissProt 35), utilizando el análisis de alineación de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa que se muestra en la Figura 12 (SEQ ID NO: 12), puso en evidencia la identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos PRO5801 y las siguientes secuencias Dayhoff: HSU58917\_1, P\_W92409, P\_W61272, P\_W04185, P\_W61271, P\_W04184, P\_W92408, GEN13979, MMU31993\_1 y YSO2\_CAEEL.

45 EJEMPLO 6

Aislamiento de clones de ADNc que codifican un PRO20040 humano

- 50 Una etiqueta de secuencia expresada (EST) de la base de datos de ADN (Merck/Universidad de Washington) fue buscada y se identificó un EST que mostró homología con el receptor de interleuquina 17.

- 55 El ARN para la construcción de librerías de ADNc fue aislado de un grupo de 50 diferentes librerías de ADNc humano. Las librerías de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc que codifican PRO20040 humanos fueron construidos mediante procedimientos estándar que utilizan reactivos disponibles comercialmente, tal como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc fue preparado con oligo dT que contiene un sitio NotI, vinculado con estabilizador para adaptadores Sall hemiquinasados, separado con NotI, dimensionado apropiadamente mediante electroforesis en gel, y clonado en una orientación definida en un vector de clonación apropiado (tal como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SFII; *ver*, Holmes et al., *Science*, 253:1278-1280 (1991)) en la única XhoI y NotI.

- 60 Las sondas de oligonucleótidos basadas en la secuencia EST descrita anteriormente se sintetizan a continuación: 1) para identificar mediante PCR una librería de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de completa secuencia de codificación para PRO20040. Los cebadores de avance y retroceso PCR generalmente oscilan entre 20 y 30 nucleótidos y se han diseñado para ofrecer un producto PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de la sonda tienen típicamente 40-55 pb de longitud. Con el fin de cribar varias librerías para un clon de longitud completa, el ADN de las librerías se proyectó mediante amplificación PCR, como en

Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, *supra*, con el primer par PCR. Una librería positiva se utilizó para aislar los clones que codifica el gen de interés utilizando oligonucleótidos y la sonda de uno de los pares de cebadores.

Las sondas de oligonucleótidos utilizadas fueron las siguientes:

- 5 cebador PCR de avance 5'-CCGACTTCTTGCAGGGCCGG-3' (SEQ ID NO: 32)  
 cebador PCR inversor 5'-GCAGCACGCAGCTGAGCGAG-3' (SEQ ID NO: 33)  
 sonda de hibridación 5'-AGCGAGTGGCTACAGGATGGGGTGTCCGGGCC-3' (SEQ ID NO: 34)

10 Un clon de longitud completa fue identificado, que contenía un único marco abierto de lectura con el sitio de inicio de traslación aparente en las posiciones de los nucleótidos 233-235 y una señal de detención en las posiciones de nucleótidos 2348-2350 (Figura 13, SEQ ID NO: 13). El precursor del polipéptido previsto tiene 705 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 76.898 daltons y un pI estimado de aproximadamente 6,08. El análisis de la secuencia de longitud completa PRO20040 mostrada en la Figura 14 (SEQ ID NO: 14) pone en evidencia la presencia de una variedad de dominios de polipéptido importantes, tal como se muestra en la Figura 14, en donde los sitios dados a los dominios de polipéptido importantes son aproximados, ya descritos anteriormente. El clon DNA164625-2890 ha sido depositado en ATCC el 21 de marzo de 2000 y se le asigna el depósito ATCC no. PTA-1535.

20 Un análisis de la base de datos Dayhoff muestra que el PRO20040 tiene similitud de secuencia con un IL-17 y la proteína del receptor PRO20040 ha sido designada también aquí como IL-17RH2, tal como se describe en el Ejemplo 20 de la presente solicitud. Específicamente, un análisis de la base de datos Dayhoff (versión 35,45 SwissProt 35), utilizando el análisis de alineación de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa mostrada en la Figura 14 (SEQ ID NO: 14), evidencia la identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos PRO20040 y las siguientes secuencias Dayhoff: HSU58917\_1.

## 25 EJEMPLO 7

### Aislamiento de clones de ADNc que codifican un PRO9877 humano

30 El DNA119502-2789 fue identificado mediante la aplicación de un algoritmo de búsqueda de secuencia de señales de propiedad desarrollado por Genentech, Inc. (South San Francisco, CA) bajo ESTs, así como fragmentos agrupados y unidos EST de bases de datos públicas (por ejemplo, GenBank) y/o privado (LIFESEQ<sup>®</sup>, Incyte Pharmaceuticals, Inc., Palo Alto, CA). El algoritmo de secuencia de señales computa una señal de secreción de puntuación basado en el carácter de los nucleótidos del ADN que rodea el cebador y, opcionalmente, el segundo codón(es) de metionina (ATG) en el extremo 5' de la secuencia o fragmento de la secuencia en cuestión. Los nucleótidos después del primer ATG deben codificar por lo menos 35 aminoácidos sin ambigüedades, sin codones de detención. Si el primer ATG tiene los aminoácidos requeridos, el segundo no se examina. Si no cumple con el requisito, la secuencia de candidatos no se puntúa. A fin de determinar si la secuencia EST contiene una secuencia de señales auténticas, el ADN y las secuencias de aminoácidos correspondientes alrededor del codón ATG se puntúan utilizando un conjunto de siete sensores (los parámetros de evaluación), que se sabe que están asociados con las señales de secreción.

45 El uso del algoritmo de secuencia antes descrito permitió la identificación de una secuencia de agrupación EST de la base de datos LIFESEQ<sup>®</sup>, designada aquí como CLU42993. Esta secuencia de agrupación CEST fue comparada con una variedad de etiquetas de bases de datos de secuencias expresadas (EST), incluyendo bases de datos públicas EST (por ejemplo, GenBank) y bases de datos de ADN de propiedad CEST (LIFESEQ<sup>®</sup> Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) para identificar las homologías existentes. La búsqueda de homologías se realizó mediante el programa informático BLAST o BLAST2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)). Estas comparaciones resultan en una puntuación BLAST de 70 (o en algunos casos, 90) o más que no codifican proteínas conocidas, que se agruparon y unieron en una secuencia de ADN de consenso con el programa "Phrap" (Phil Green, University of Washington, Seattle, Washington). La secuencia de consenso que se obtiene a partir de la misma se designa aquí DNAFROM.

50 A la luz de una homología de secuencia observada entre la secuencia DNAFROM y una secuencia que abarca el clon EST no. 700536 de la base de datos LIFESEQ<sup>®</sup>, el clon no. 700536 fue comprado y la inserción de ADNc fue obtenida y secuenciada. Se encontró aquí que la inserción de ADNc codifica una proteína de longitud completa. La secuencia de este inserto de ADN se muestra en la Figura 15 y se designa aquí como DNA119502-2789.

60 El clon DNA119502-2789 contiene un único marco abierto de lectura en el sitio de inicio de traslación aparente en las posiciones de los nucleótidos 106-108 y termina en el codón de detención en las posiciones de los nucleótidos 2107-2109 (Figura 15, SEQ ID NO: 15). El precursor del polipéptido previsto tiene 667 aminoácidos (Figura 16). La proteína de longitud completa PRO9877 que se muestra en la Figura 16 tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 74.810 daltons y un pI de alrededor de 9,55. El análisis de la secuencia de longitud completa PRO9877 mostrada en la Figura 16 (SEQ ID NO: 16) evidencia la presencia de una variedad de dominios de polipéptido importantes, tal como se muestra en la Figura 16, donde los sitios dados a esos dominios de polipéptido importantes son aproximados, ya descritos anteriormente. El clon DNA119502-2789 ha sido depositado en ATCC el 22 de diciembre de 1999 y se le asigna el depósito ATCC no. PTA-1082.

Un análisis de la base de datos Dayhoff muestra que PRO9877 tiene similitud de secuencia con un IL-17 y la proteína del receptor PRO9877 es también designada aquí como IL-17RH3. Específicamente, un análisis de la base de datos Dayhoff (versión 35.45 SwissProt 35), utilizando el análisis de alineación de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa que se muestra en la Figura 16 (SEQ ID NO: 16), puso en evidencia la identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos PR09877 y las siguientes secuencias Dayhoff: W61272 P, HSU58917\_1, P\_W04185, P\_W92409, GEN13979, P\_W04184, P\_W92408, MMU31993\_1, P\_W61271, y AF090114\_1.

EJEMPLO 8

Aislamiento de clones de ADNc que codifican un PRO2006 humano

Las secuencias de dominio extracelular (ECD), (que incluyen la secuencia de señales de secreción, en su caso) de alrededor de 950 proteínas secretadas conocidas de la base de datos Swiss-Prot pública se utilizan para buscar bases de datos EST. Las bases de datos EST incluyen una base de datos EST de propiedad (LIFESEQ, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA). La búsqueda se realizó utilizando el programa informático BLAST o BLAST2 [Altschul et al., Methods in Enzymology, 266:460-480 (1996)] como comparación de las secuencias de proteínas ECD en una traslación de 6 marcos de las secuencias EST. Estas comparaciones resultan en una puntuación BLAST de 70 (o en algunos casos, 90) o más que no codifican proteínas conocidas, que se agruparon y unieron en secuencias de ADN de consenso con el programa "Phrap" (Phil Green, Universidad de Washington, Seattle, Washington).

Una secuencia de ADN de consenso se formó en relación con otras secuencias EST utilizando Phrap tal como se describe anteriormente. Esta secuencia de consenso se designa aquí DNA149870. En algunos casos, la secuencia de consenso DNA149870 deriva de una secuencia consenso de ADN intermedia que se extendió mediante ciclos repetidos de BLAST y Phrap para extender esa secuencia de consenso intermedia lo máximo posible, utilizando las fuentes de secuencias EST descritas anteriormente.

Basada en la secuencia de consenso DNA149870, se llevó a cabo la clonación FLIP. Los oligonucleótidos fueron sintetizados: 1) para identificar mediante PCR una librería de ADNc que contenía la secuencia de interés, y 2) para su uso como sondas para aislar un clon de completa secuencia de codificación para PRO20026. Los cebadores PCR de avance e inversos generalmente oscilan entre 20 y 30 nucleótidos y se han diseñado para ofrecer un producto PCR de aproximadamente 100-1000 pb de longitud. Las secuencias de la sonda tienen típicamente 40-55 pb de longitud. En algunos casos, oligonucleótidos adicionales se sintetizan cuando la secuencia de consenso es mayor de 1-1,5 kbp. Con el fin de cribar varias librerías para un clon de longitud completa, el ADN de las librerías se proyectó mediante amplificación Flip por PCR, como en Schänke et al. BioTechniques, 16:414-416 (1994), con el cebador PCR par. Una librería positiva se utilizó para aislar los clones que codifican el gen de interés utilizando los oligonucleótidos de sonda y uno de los pares de cebadores.

Cebadores PCR (de avance e inversos) fueron sintetizados:

cebador PCR de avance:  
5'-CGTTGTTTGTGTCAGTGGAGAGCAGGG-3' (SEQ ID NO: 35)

cebador PCR inverso  
5'-CAGGAACACCTGAGGCAGAAGCG-3' (SEQ ID NO: 36)

Además, una sonda de hibridación de oligonucleótidos sintéticos se construyó a partir de la secuencia de consenso DNA149870 que tenía la siguiente secuencia de nucleótidos  
sonda de hibridación  
5'-CTATCTCCCTGCCAGGAGGCCGGAGTGGGGGAGGTCAGAC-3' (SEQ ID NO: 37)

El ARN para la construcción de las librerías de ADNc fue aislado de los tejidos humanos. Las librerías de ADNc utilizadas para aislar los clones de ADNc fueron construidas mediante procedimientos estándar que utilizan reactivos disponibles comercialmente, como los de Invitrogen, San Diego, CA. El ADNc fue preparado con oligo dT que contiene un sitio NotI, vinculado con estabilizador para adaptadores Sall hemiquinasados, separado con NotI, dimensionado apropiadamente mediante electroforesis en gel, y clonado en una orientación definida en un vector de clonación apropiado (como pRKB o pRKD; pRK5B es un precursor de pRK5D que no contiene el sitio SFII; ver, Holmes et al., Science, 253:1278-1280 (1991)) en los sitios únicos XhoI y NotI.

La secuenciación del ADN de los clones aislados tal como se describió anteriormente dio la secuencia de ADN de longitud completa para un polipéptido de longitud completa PRO20026 (designado aquí como DNA154095-2998 [Figura 17, SEQ ID NO: 17]) y la secuencia de proteínas derivadas de ese polipéptido PRO20026.

El clon de longitud completa identificado anteriormente contenía un único marco abierto de lectura con el sitio de inicio de traslación aparente de los nucleótidos en las posiciones 70-72 y una señal de detección en las posiciones de los nucleótidos 2254-2256 (Figura 17, SEQ ID NO: 17). El precursor polipéptido previsto tiene 728 aminoácidos, tiene un peso molecular calculado de aproximadamente 81.310 daltons y un pI estimado de aproximadamente 6,84. El análisis

de la secuencia de longitud completa PRO20026 mostrada en la Figura 18 (SEQ ID NO: 18) evidencia la presencia de una variedad de dominios de polipéptido importantes tal como se muestra en la Figura 18, donde los sitios dados a esos dominios de polipéptido importantes son aproximados, ya descritos anteriormente. El clone DNA154095-2998 ha sido depositado en ATCC el 10 de octubre de 2000 y se le asigna el depósito ATCC N° PTA-2591.

5

Un análisis de la base de datos Dayhoff muestra que PRO20026 hay similitud de secuencia con un IL-17 y la proteína del receptor PRO2006 también se designa aquí como IL-17RH4. Específicamente, un análisis de la base de datos Dayhoff (versión 35.45 SwissProt 35), utilizando el análisis de alineación de secuencias ALIGN-2 de la secuencia de longitud completa tal se muestra en la Figura 18 (SEQ ID NO: 18), puso en evidencia la identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos PRO20026 y las siguientes secuencias Dayhoff: T42695, P\_W04185, P\_W92409, P\_W61272, NM\_014339\_1, HSU58917\_1, MMU31993\_1, GEN13979, P\_W04184, P\_W61271.

10

#### EJEMPLO 9

15

#### Utilización de PRO como sonda de hibridación

El procedimiento siguiente describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica PRO como sonda de hibridación.

20

El ADN que comprende la secuencia de codificación de longitud completa o PRO maduro tal como se describe aquí se emplea como sonda para cribar ADNs homólogos (como los que codifican de variantes PRO de origen natural) en las librerías de ADNc de tejido humano o librerías genómicas de tejido humano.

25

La hibridación y el lavado de filtros que contienen ADNs de librería se realiza bajo las siguientes condiciones de alta estringencia. La hibridación de sonda derivada PRO radiomarcada en los filtros se realiza en una solución de 50% formamida, 5x SSC, SDS 0,1%, 0,1% de pirofosfato de sodio, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8, 2x solución Denhardt, y 10% sulfato de dextrano en 42°C durante 20 horas. El lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1 x SSC y SDS 0,1% a 42°C.

30

Los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN que codifica la secuencia PRO nativa de longitud completa pueden ser identificados utilizando técnicas estándar conocidas en la técnica.

#### EJEMPLO 10:

35

#### Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para la detección y localización de secuencias de ácido nucleico en células o preparados de tejidos. Puede ser útil, por ejemplo, para identificar los sitios de expresión génica, analizar la distribución en tejidos de transcripción, identificar y localizar infección viral, seguir los cambios en la síntesis de ARNm específicos y la ayuda en el mapeado de cromosomas.

40

La hibridación *in situ* se realizó según una versión optimizada del protocolo de Lu y Gillett, Cell Vision, 1:169-176 (1994), utilizando ribosondas marcadas <sup>33</sup>P generadas con PCR. En pocas palabras, se seccionaron tejidos humanos fijos formahn, integrados en parafina, se desparafinaron, se desproteinizaron en proteinasa K (20 g/ml) durante 15 minutos a 37°C, y también se procesaron para la hibridación *in situ* descrita por Lu y Gillett, *supra*. Se generó una ribosonda antisentido marcada [<sup>33</sup>-P] UTP a partir de un producto PCR y se hibridizó a 55°C durante la noche. Los portaobjetos se sumergieron en una emulsión Kodak NTB2 de pista nuclear y se expusieron durante 4 semanas.

45

50

#### Síntesis de <sup>33</sup>P-ribosonda

6,0 µl (125 mCi) de <sup>33</sup>P-UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mmol) se secaron con velocidad en vacío. Para cada tubo que contenía <sup>33</sup>P-UTP seco, se añadieron los siguientes ingredientes:

2,0 µl 5x tampón de transcripción de búfer

55

1,0 µl de TDT (100 mM)

2,0 µl de mezcla NTP (2,5 mM: 10 µl, 10 mM de cada uno de GTP, CTP y ATP + 10 µl H<sub>2</sub>O)

1,0 µl de UTP (50 µM)

1,0 µl de Rnasin

1,0 µl de patrón de ADN (1 µg)

60

1,0 µl de H<sub>2</sub>O

1,0 µl de polimerasa ARN (para productos PCR T3 = AS, T7 = S, usualmente)

Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora. 1,0 µl de RQ1 DNasa se añadieron, seguido por la incubación a 37°C durante 15 minutos. 90 µl TE (10 mM Tris pH 7,6/1mM EDTA pH 8,0) se añadieron, y la mezcla fue pipeteada sobre papel DE81. La solución restante se cargó en una unidad de ultrafiltración Microcon-50, y se agitó usando el programa de 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió en un segundo tubo y se agitó usando el programa 2 (3 minutos).

65

## ES 2 506 665 T3

Después de la agitación final de recuperación, se añadieron 100 µl de TE. 1 µl del producto final fue pipeteado sobre papel DE81 y se contó en 6 ml de Biofluor II.

5 La sonda se ejecuta en un gel de TBE/urea. 1-3 µl sonda o 5 µl de ARN Mrk III se agregaron a 3 µl de tampón de carga. Después de calentar en un bloque de calor a 95°C durante tres minutos, el gel se colocó inmediatamente en hielo. Los pozos de gel se enjugaron, la muestra se cargó, y activó a 180-250 voltios durante 45 minutos. El gel fue envuelto en envoltura de saran y se expuso a película XAR con una pantalla de intensificación en un congelador a -70°C una hora durante la noche.

### 10 Hibridación <sup>33</sup>P

#### A. Tratamiento previo de las secciones congeladas

15 Los portaobjetos fueron retirados del congelador, se colocaron en bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocaron en la incubadora a 55°C durante cinco minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% sobre el hielo en la campana extractora, y se lavaron en 0,5 x SSC durante 5 minutos, a temperatura ambiente (25 x 20 ml + 975 ml SSC SQ H<sub>2</sub>O). Después de la desproteinación en 0,5 mg/ml proteinasa K durante 10 minutos a 37°C (12,5 µl de 10 mg/ml de stock RNasa previamente calentado en 250 ml de tampón RNasa libre), las secciones fueron lavadas en 0,5 x SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron deshidratadas en 70%, 95%, 100% de etanol, durante 2 minutos cada una.

#### B. Tratamiento previo de las secciones con parafina

25 Los portaobjetos fueron desparafinados, situados en SC H<sub>2</sub>O, y aclarados dos veces en 2 x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez. Las secciones fueron desproteinizadas en 20 mg/ml proteinasa K (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón RNasa RNasa libre; 37°C, 15 minutos) - embrión humano, o 8 x proteinasa K (100 µl en 250 ml tampón RNasa, 37°C, 30 minutos) - tejidos en formalina. Tras el enjuague en 0,5 x SSC y se realizó la deshidratación tal como se describe anteriormente.

30

#### C. Prehibridación

35 Los portaobjetos fueron colocados en una caja de plástico llena de tampón de caja (4 x SSC, formamida 50%) - papel de filtro saturado. El tejido se cubrió con 50 µl de tampón de hibridación (3,75 g de dextrano sulfato + 6 ml SQ H<sub>2</sub>O), se centrifugaron y se calentaron en microondas durante 2 minutos con la tapa suelta. Después de enfriarse en hielo, se añadió formamida 18,75 ml, 3,75 ml 20 x SSC y 9 ml SQ H<sub>2</sub>O, el tejido se centrifugó bien, y se incubó a 42°C durante 1-4 horas.

#### 40 D. Hibridación

Sondas de 1,0 x 10<sup>6</sup> cpm y 1,0 µl tRNA (stock 50 mg/ml) por cada portaobjetos se calentaron a 95°C durante 3 minutos. Los portaobjetos se enfriaron en hielo y se añadieron 48 µl de tampón de hibridación por portaobjetos. Después de la agitación, se añaden 50 µl de mezcla <sup>33</sup>P a 50 µl de prehibridación en el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron toda la noche a 55°C.

45

#### E. Lavados

50 Se realizaron lavados 2 x 10 minutos con 2xSSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml 20 x SSC + 16 ml de 0.25M EDTA, V<sub>f</sub>= 4L), seguidos de un tratamiento con RNaseA a 37°C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón RNasa = 20 mg/ml). Los portaobjetos fueron lavados 2 x 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de estringencia de lavado son las siguientes: 2 horas a 55°C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V<sub>f</sub>= 4L).

#### 55 F. Oligonucleótidos

Se realizó un análisis *in situ* en el DNA59294-1381 aquí descrito. Los oligonucleótidos empleados para este análisis se derivan de las secuencias de nucleótidos aquí descritas y por lo general oscilan entre 40 a 55 nucleótidos de longitud aproximadamente.

#### 60 G. Resultados

Se realizó un análisis *in situ* en el DNA59294-1381 aquí descrito. Los resultados de este análisis son los siguientes.

#### DNA59294-1381 (PRO1031)

65

La expresión de este homólogo IL17 se evaluó en un grupo formado por tejidos adultos normales y tejidos fetales y los

tejidos con inflamación, inflamación linfocítica crónica predominantemente. Este panel está diseñado específicamente para evaluar el patrón de expresión en la enfermedad inflamatoria mediada inmune de las nuevas proteínas que modulan la función de linfocitos T (inhibición o estimulación). Esta proteína cuando se expresa como una proteína de fusión Ig fue inmunoestimulante en una forma dependiente de la dosis en la reacción de los linfocitos humanos mixtos (MLR), que causó un aumento del 285% y 147% por encima del índice de estimulación de referencia cuando se utilizan dos concentraciones diferentes (1,0% y el 0,1% del stock 560 nm) [ver EJEMPLO 25 infra]. Resumen: la expresión se limita a los músculos, a ciertos tipos de músculo liso en el adulto y en el músculo esquelético y liso en el feto humano. La expresión en humanos adultos fue en el músculo liso de los órganos tubulares evaluados, incluyendo colon y vesícula biliar. No había ninguna expresión en el músculo liso de los vasos o bronquios. Ningún músculo esquelético humano adulto se evaluó. En los tejidos fetales fue moderada a alta la expresión difusa en el músculo esquelético, en el esqueleto axial y las extremidades. Hubo una expresión débil en el músculo liso de la pared intestinal, pero no hubo expresión en el músculo cardíaco. Los tejidos humanos adultos con expresión incluyen: Colón: no había expresión difusa de bajo nivel en el músculo liso (tunica muscularis) en 5 especímenes con enfermedad inflamatoria intestinal crónica, vesícula biliar: no era débil a la expresión de bajo nivel en el músculo liso de la vesícula biliar; tejidos humanos fetales con expresión: había una expresión difusa moderada en el músculo esquelético y una expresión baja a débil en el músculo liso, no había ninguna expresión en el corazón del feto o de cualquier otro órgano del feto tal como hígado, bazo, sistema nervioso central, riñones, intestino, pulmones; tejidos humanos sin expresión: pulmón con inflamación granulomatosa crónica y bronquitis crónica (5 pacientes), nervios periféricos, próstata, corazón, placenta, hígado (enfermedad multibloque), cerebro (cerebro y cerebelo), amígdalas (hiperplasia reactiva), ganglios linfáticos periféricos, timo.

#### EJEMPLO 11

##### Expresión de PRO en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de polipéptidos PRO mediante expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica un polipéptido PRO es inicialmente amplificada utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzima de restricción que corresponden a los sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado. Una gran variedad de vectores de expresión pueden utilizarse. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; ver Bolívar et al., Gene, 2:95 (1977)), que contiene genes de resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector es digerido con la enzima de restricción y desfosforilado. Las secuencias PCR amplificadas se ligan a continuación en el vector. El vector preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen de resistencia a los antibióticos, un promotor PRT, un líder poliHis (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poliHis, y sitio de separación de enteroquinasa), la región de codificación del polipéptido PRO, terminador de transcripción lambda, y un gen argU.

La mezcla de ligado se usa para transformar una cepa *E. coli* seleccionada utilizando los procedimientos descritos en Sambrook et al., supra. Los transformantes se identifican por su capacidad de crecer en placas LB y se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN de plásmido se puede aislar y confirmar mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Los clones seleccionados pueden crecer durante la noche en un medio de cultivo líquido tal como el caldo de LB suplementado con antibióticos. El cultivo durante la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. Las células crecen a continuación con una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de expresión se activa.

Después del cultivo de las células durante varias horas, las células pueden recogerse mediante centrifugación. La cuenta de células obtenidas mediante centrifugado se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína PRO solubilizada puede ser purificada con ayuda de una columna quelante de metal bajo condiciones que permiten una fuerte unión de la proteína.

Los polipéptidos PRO pueden expresarse en *E. coli* en una forma poli-His marcada, utilizando el procedimiento siguiente. El ADN que codifica un polipéptido PRO es inicialmente amplificado utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzima de restricción que corresponden a sitios de enzima de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de la traducción eficiente y fiable, una rápida depuración en una columna de quelación de metal, y la eliminación proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias PCR amplificadas, marcadas poli-His a continuación son ligadas en un vector de expresión, que se utiliza para transformar una *E. coli* huésped sobre la base de la cepa 52 (W3110 fuhA (tonA) Lon galE rpoHts (htpRts) CLPP (lacIq)). Los transformantes crecen primero en LB con 50 mg/ml de carbenicilina a 30°C con agitación hasta que se alcance un O.D.600 de 3-5. Los cultivos se diluyen 50-100 veces en el medio CRAP (preparado mediante la mezcla de 3,57 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,71 g de citrato de sodio • 2H<sub>2</sub>O, 1,07 g KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como 110 MPOs mM, pH 7,3, 0,55% (w/v) de glucosa y 7 mM MgSO<sub>4</sub>) y crecen durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Las muestras se retiran para comprobar la expresión de análisis mediante SDS-PAGE, y el cultivo a granel se centrifuga formar cuentas con las células. Las

cuentas de células se congelan hasta la purificación y el replegado.

5 Pasta de *E. coli* de 0,5 a 1 L de fermentaciones (6-10 g de cuentas) se resuspende en 10 volúmenes (w/v) en tampón 7 M guanidina, 20 mM Tris, pH 8. Sulfito de sodio sólido y tetrionato de sodio se añaden para hacer una concentración final de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante una noche a 4°C. Esta etapa produce una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por la sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en un Ultracentrifuge Beckman durante 30 minutos. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelato de metal (6 M guanidina, 20 mM Tris, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrones para aclarar. El extracto clarificado se carga en una columna de 5 ml Qiagen de quelato de metal Ni-NTA equilibrada en el tampón de columna de quelato de metal. La columna se lava con tampón adicional que contiene 50 mM de imidazol (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 se almacenan a 4°C. La concentración de proteína se estima por su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado sobre la base de su secuencia de aminoácidos.

15 Las proteínas se repliegan mediante la disolución de la muestra lentamente en tampón de replegado recién preparado que consiste en: 20 mM Tris, pH 8,6, 0,3 M NaCl, 2,5 M urea, 5 mM cisteína, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegado se eligen de manera que la concentración de proteínas final es de entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de replegado se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de replegado se apaga por la adición de TFA a 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 micrones y se añade acetonitrilo en 2-10% de concentración final. La proteína plegada se cromatografía sobre una columna de fase inversa Poros R1/H con un tampón móvil de 0,1% TFA con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Alícuotas de las fracciones con absorbancia A280 se analizan en geles de poli(acrilamida) SDS y se agrupan las fracciones que contienen proteína replegada homogénea. En general, las especies replegadas adecuadamente de la mayoría de las proteínas se eluyen en concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que estas especies son las más compactas, con su interior hidrofóbico blindado de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se eluyen generalmente en concentraciones superiores de acetonitrilo. Además de resolver las formas mal plegadas de las proteínas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina en las muestras.

30 Las fracciones que contienen el polipéptido PRO plegado se reúnen y el acetonitrilo se elimina usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con 0,14 M de cloruro de sodio y 4% de manitol mediante diálisis o filtración en gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación estéril y se filtran estériles.

35 Muchos de los polipéptidos PRO aquí descritos se expresan correctamente, tal como se describe anteriormente.

## EJEMPLO 12

### Expresión de PRO en células de mamífero

40 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de polipéptidos PRO mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

45 El vector, pRK5 (ver EP 307 247, publicada el 15 de marzo de 1989) se emplea como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN PRO se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN utilizando procedimientos de ligado PRO tal como se describen en Sambrook *et al.*, *supra*. El vector resultante se llama pRK5-PRO.

50 En una realización, las células huésped seleccionadas podrán ser 293 células. 293 células humanas (ATCC CCL 1573) crecen para confluir en placas de cultivo de tejidos en medio tal como DMEM suplementado con suero fetal bovino y, opcionalmente, componentes nutritivos y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg de ADN pRK5-PRO se mezclan con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen del ARN VA [Thimmappaya *et al.*, Cell, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de 1 mM Tris-HCl, EDTA 0,1 mM, 0,227 M CaCl<sub>2</sub>. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM (pH 7,35), 280 mM NaCl, 1,5 mM NaPO<sub>4</sub>, y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las 293 células y se deja reposar durante unas cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. Las 293 células se lavan con el medio libre de suero, se añade el nuevo medio y las células se incuban durante 5 días.

60 Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo es eliminado y reemplazado con el medio de cultivo (sólo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml <sup>35</sup>S-cisteína y 200 µCi/ml <sup>35</sup>S-metionina. Después de una incubación de 12 horas, el medio acondicionado se recoge, se concentra en un filtro giratorio, y se carga en un 15% gel SDS. El gel procesado se puede secar y exponer a la película durante un período de tiempo seleccionado para revelar la presencia del polipéptido PRO. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden sufrir una incubación adicional (en un medio libre de suero) y el medio se prueba en los bioensayos seleccionados.

65 En una técnica alternativa, el PRO se puede introducir en 293 células de forma transitoria mediante el procedimiento de

sulfato de dextrano descrito por Sompanyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981). 293 células se cultivan con la densidad máxima en una un frasco rotativo y se añaden 700 mg de ADN pRK5-PRO. Las células se concentran primero en el frasco rotativo mediante centrifugación y se lavan con PBS. El ADN de precipitado de dextrano se incuba en el sedimento celular durante cuatro horas. Las células son tratadas con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejidos, y vuelven a introducirse en el frasco rotativo que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 mg/ml de insulina bovina y 0,1 µ/ml de transferrina bovina. Después de cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y los restos. La muestra que contiene el polipéptido PRO expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía de columna.

En otra realización, los polipéptidos PRO pueden ser expresados en células CHO. El pRK5-PRO puede ser transfectado en células CHO utilizando reactivos conocidos tales como CAPO<sub>4</sub> o DEAE dextrano. Como se describe anteriormente, los cultivos de células pueden ser incubados, y el medio reemplazarse con medio de cultivo (sólo) o medio que contenga un radiofármaco, tal como <sup>35</sup>S-metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido PRO, el medio de cultivo puede ser reemplazado por un medio libre de suero. Preferentemente, los cultivos se incubaron durante 6 días, y luego se recoge el medio acondicionado. El medio que contiene el polipéptido PRO expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

El PRO marcado con epítipo también puede expresarse en células CHO huésped. El PRO puede subclonarse fuera del vector pRK5. La inserción del subclón puede sufrir PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta de epítipo seleccionada como una etiqueta poli-His en un vector de expresión de baculovirus. La inserción PRO marcada poli-His se puede subclonar en un vector activado SV40 que contiene un marcador de selección tal como DHFR para la selección de clones estables. Por último, las células CHO puede ser transfectadas (tal como se describió anteriormente) con el vector activado SV40. El etiquetado se puede realizar, tal como se describe anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el PRO marcado poli-His puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como cromatografía de afinidad de quelado Ni<sup>2+</sup>.

Los polipéptidos PRO también pueden expresarse en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el procedimiento siguiente. Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmuno adhesina), en la que las secuencias codificantes para las formas solubles (por ejemplo, Dominios extracelulares) de las proteínas correspondientes se fusionan en una secuencia de región constante IgG1 que contiene la articulación, CH2 y dominios CH2, y/o como una forma de etiquetado poli-His.

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

Doce microgramos de ADN del plásmido deseado se introducen en unos 10 millones de células CHO utilizando reactivos disponibles en el mercado de transfección Superfect<sup>®</sup> (Qiagen), Dospert<sup>®</sup> o Fugene<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim). Las células crecen como se describe en Lucas *et al.*, *supra*. Aproximadamente 3 x 10<sup>7</sup> células se congelan en una ampolla para su crecimiento y producción adicional, tal como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el ADN del plásmido se descongelan mediante su colocación en un baño de agua y mezclado por agitación. Los contenidos se colocan en una pipeta en un tubo centrífugo con 10 ml de medio y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (0,2 µm PS20 filtrado con 5% de 0,2 µm de suero bovino fetal diafiltrado). Las células se separan a continuación en alícuotas en un centrifugador de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células son transferidas a un centrifugador de 250 ml lleno con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C. Después de otros 2-3 días, centrifugadores de 250 ml, 500 ml y 2000 ml se siembran con 3 x 10<sup>5</sup> células/ml. El medio celular se intercambia con medio fresco por centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque cualquier medio CHO adecuado se puede emplear, un medio de producción contemplado en la Patente US No. 5122469, publicada el 16 de junio de 1992 en realidad puede ser utilizado. Un centrifugador de producción de 3L se siembra con 1,2 x 10<sup>6</sup> células/ml. En el día 0 se determina el pH de las células. El día 1, se toman muestras del centrifugador y se inicia la aspersión con aire filtrado. En el día 2 se toman muestras del centrifugador, la temperatura pasa a 33°C, y se toman 30 ml de 500 g/L de glucosa y 0,6 ml de antiespumante 10% (por ejemplo, 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Coming 365 Medical Grade Emulsion). A lo largo de la producción, se ajusta el pH como sea necesario para mantenerlo en torno a 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cayó por debajo del 70%, los cultivos celulares se recogen mediante centrifugación y filtrado a través de un filtro de 0,22 µm. El filtrado se almacena a 4°C o se carga inmediatamente en las columnas para su purificación.

Para las construcciones marcadas poli-His, las proteínas son purificadas utilizando una columna de Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio acondicionado en una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea a una columna Ni-NTA 6 ml equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contiene 0,3 M NaCl y 5 mM imidazol con un índice de flujo de 4-5 ml/min. a 4°C. Después de cargarse, la columna se lava con tampón de equilibrado adicional y la proteína es eluida con tampón de equilibrado con 0,25 M imidazol. La proteína altamente purificada posteriormente se desala en un tampón de almacenamiento con 10 mM Hepes, 0,14 M NaCl y manitol 4%, pH 6,8, con una columna G25 de 25 ml Superfine (Pharmacia) y se almacena a -80°C.

Las construcciones de inmuno adhesina (que contiene Fc) se purifican a partir del medio acondicionado de la siguiente manera. El medio acondicionado se bombea en una columna de 5 ml de proteína A (Pharmacia) que había sido equilibrada en tampón de fosfato 20 mM Na, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava exhaustivamente con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida es inmediatamente neutralizada mediante la recogida de las fracciones 1 ml en tubos con 275 µL de tampón 1 M Tris, pH 9. La proteína altamente purificada posteriormente se desala en búfer de almacenamiento, tal como se describe anteriormente para las proteínas marcadas poli-His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poli acrilamida SDS y mediante secuenciado de aminoácidos N-terminal mediante degradación Edman.

Muchos de los polipéptidos PRO aquí descritos se expresan correctamente, tal como se describe anteriormente.

## EJEMPLO 13

### Expresión de PRO en levadura

El procedimiento siguiente describe la expresión recombinante de polipéptidos PRO en levadura.

En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción intracelular o la secreción de PRO a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica el polipéptido PRO y el promotor se inserta en sitios de enzima de restricción adecuada en el plásmido elegido para dirigir la expresión intracelular del polipéptido PRO. Para la secreción, se puede ser clonado ADN que codifica PRO en el plásmido seleccionado, junto con ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido nativo PRO de señal u otro péptido de señal de mamíferos, o, por ejemplo, un factor alfa de la levadura o la señal de secreción de invertasa/secuencia líder, y las secuencias de enlace (si es necesario) para la expresión de PRO.

Las células de levadura, tal como la cepa de levadura AB110, se pueden transformar a continuación con la expresión de los plásmidos descritos anteriormente y se cultivan en medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de la levadura transformada pueden ser analizados mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguida por la tinción de los geles con tinte azul de Coomassie.

Los polipéptidos PRO recombinantes se pueden aislar y purificar posteriormente mediante la eliminación de las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y a continuación concentrar el medio usando filtros de cartucho seleccionado. El concentrado que contiene el polipéptido PRO también puede ser purificado mediante resinas de cromatografía de columna seleccionadas.

Muchos de los polipéptidos PRO aquí descritos se expresaron correctamente, tal como se describe anteriormente.

## EJEMPLO 14

### Expresión de PRO en células de insectos infectadas con baculovirus

El procedimiento siguiente describe la expresión recombinante de polipéptidos PRO en células infectadas de insectos con baculovirus.

La secuencia de codificación para PRO se funde antes de una etiqueta de epítipo contenida en un vector de expresión de baculovirus. Las etiquetas de epítipo incluyen etiquetas poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Una variedad de plásmidos pueden ser utilizados, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos disponibles comercialmente, como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia de codificación de PRO o la porción deseada de la secuencia de codificación de PRO como secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular es amplificada mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de la enzima de restricción de flanqueo (seleccionados). El producto se digiere a continuación con las enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante que se genera mediante cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (PharMingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente por parte de Gibco-BRL). Después de 4 a 5 días de incubación a 28°C, el virus liberado es recogido y utilizado para otras ampliaciones. La infección viral y la expresión proteica se llevan a cabo según lo descrito

por O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

5 PRO marcado poli-His expresado puede ser purificado a continuación, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad  
 Ni<sup>2+</sup>-quelato tal como sigue. Los extractos se preparan a partir de células infectadas con virus recombinante Sf9 tal  
 como se describe en Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, resuspenden en  
 tampón de sonicación (25 ml Hepes, pH 7,9, 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM EDTA, 10% glicerol; 0,1% NP-40; 0,4 M KCl), y  
 10 sonicaron dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se eliminan por centrifugación y el sobrenadante se  
 diluye 50 veces en tampón de carga (50 mM fosfato, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 7,8) y se filtran a través de un filtro  
 de 0,45 micras. Una columna de agarosa Ni<sup>2+</sup>-NTA (disponible en el mercado por part de Qiagen) se prepara con un  
 volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. El extracto celular  
 filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava con una línea de base A<sub>280</sub> con tampón de  
 carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, se lava la columna con un tampón de lavado  
 15 secundario (50 mM fosfato, 300 mM NaCl, 10% glicerol, pH 6,0), que eluye la proteína no específicamente unida.  
 Después de alcanzar la línea de base A<sub>280</sub> de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de Imidazol de 0 a 500  
 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de  
 plata o Western blot con Ni<sup>2+</sup>-NTA conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el PRO  
 marcado His<sub>10</sub> eluido se recogen y dializan contra el tampón de carga.

20 Alternativamente, la purificación de la IgG marcada (o Fc marcada) PRO se puede realizar utilizando técnicas de  
 cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía de columna de proteína A o proteína G.

Muchos de los polipéptidos PRO aquí descritos se expresaron correctamente, tal como se describe anteriormente.

#### 25 EJEMPLO 15

##### Preparación de anticuerpos que se unen a PRO

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente PRO.

30 Técnicas para la producción de los anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo,  
 en Goding, *supra*. Los inmunógenos que pueden ser utilizados incluyen polipéptidos PRO purificados, proteínas de  
 fusión que contienen polipéptidos PRO, y células que expresan polipéptidos PRO recombinantes en la superficie celular.  
 La selección del inmunógeno puede realizarse por parte del experto, sin experimentación indebida.

35 Los ratones, tales como ratones Balb/c, son inmunizados con el inmunógeno PRO emulsionado en adyuvante completo  
 de Freund y se inyectan por vía subcutánea o por vía intraperitoneal en una cantidad de 1-100 microgramos.  
 Alternativamente, el inmunógeno es emulsionado en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Investigation,  
 Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras del animal. Los ratones inmunizados se activan a  
 40 continuación de 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado.  
 Posteriormente, durante varias semanas, los ratones también pueden ser activados con inyecciones de inmunización  
 adicionales. Las muestras de suero pueden ser obtenidas de forma periódica de los ratones por sangrado retro-orbital  
 para realizar pruebas en ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti-PRO.

45 Después de que se haya detectado un título de anticuerpos adecuados, los animales "positivos" para anticuerpos  
 pueden ser inyectados con una inyección intravenosa final de PRO. Tres a cuatro días más tarde, los ratones son  
 sacrificados y las células del bazo se cosechan. Las células del bazo luego se funden (con 35% de polietileno glicol) en  
 una línea celular seleccionada de mieloma murino como P3X63AgU.1, disponible en ATCC, CRL No. 1597. Las fusiones  
 50 generan células de hibridoma que pueden colocarse en placas de 96 pozos de cultivo de tejidos que contienen medio  
 HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células fusionadas, híbridos de mieloma e  
 híbridos de células del bazo.

Las células del hibridoma se tamizarán en un ELISA para la reactividad contra PRO. La determinación de células de  
 hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales anti-PRO deseados están dentro de la habilidad en la  
 técnica.

55 Las células de hibridoma positivo se pueden inyectar por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singénicos para producir  
 ascitas que contienen los anticuerpos monoclonales anti-PRO. Alternativamente, las células de hibridoma pueden crecer  
 en frascos de cultivo de tejidos o botellas de rodillo. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en las  
 ascitas puede realizarse utilizando precipitación de sulfato de amonio, seguida por cromatografía de exclusión en gel.  
 60 Alternativamente, la cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpos a una proteína o proteína G puede  
 utilizarse.

#### EJEMPLO 16

##### Purificación de polipéptidos PRO utilizando anticuerpos específicos

5 Los polipéptidos PRO nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en la técnica de purificación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido pro-PRO, el polipéptido PRO maduro, o el polipéptido pre-PRO se purifican mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos específicos para el polipéptido PRO de interés. En general, una columna de inmunoafinidad se construye de manera covalente acoplado el anticuerpo del polipéptido anti-PRO en una resina de cromatografía activada.

10 Inmunoglobulinas policlonales son preparadas a partir de sueros inmunes, ya sea por precipitación con sulfato de amonio o purificación de proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Del mismo modo, los anticuerpos monoclonales son preparados a partir de líquido ascítico de ratón por precipitación de sulfato de amonio o cromatografía sobre proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se fija de manera covalente a una resina de cromatografía como Sepharose™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea, y el derivado de la resina se lava con arreglo a las instrucciones del fabricante.

15 Esa columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido PRO mediante la preparación de una fracción de células que contienen polipéptido PRO en una forma soluble. Esta preparación se deriva de la solubilización de la célula entera o de una fracción subcelular obtenida a través de la centrifugación diferencial mediante la adición de un detergente o mediante otros procedimientos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido PRO soluble que contiene una secuencia de señal puede ser secretado en una cantidad útil en el medio en que crecen las células.

20 Una preparación que contiene el polipéptido PRO soluble se pasa sobre la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en las condiciones que permiten la absorción preferencial del polipéptido PRO (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que perturban la unión anticuerpo/polipéptido PRO (por ejemplo, un tampón de pH bajo, tal como un pH de aproximadamente 2,3, o una alta concentración de un caótropro tal como urea o ión de tiocianato), y se recoge el polipéptido PRO.

25 EJEMPLO 17

#### Cribado de fármacos

30 Los polipéptidos PRO o fragmentos de unión de los mismos se pueden utilizar en cualquiera de una variedad de técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido PRO o fragmento empleados en dicha prueba pueden ser libres en la solución, fijados sobre un soporte sólido, presente en una superficie celular, o situados intracelularmente. Un procedimiento de cribado de fármacos utiliza células huésped procariotas y eucariotas que se transforman de forma estable con los ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido PRO o fragmento. Los fármacos se criban frente a dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Estas células, ya sea en forma viable o fija, se pueden utilizar para ensayos de unión estándar. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido PRO o un fragmento y el agente que se está probando. Alternativamente, se puede examinar la disminución en la formación de complejos entre el polipéptido PRO y su célula diana o receptores diana causada por el agente que se está probando.

40 Así, la presente memoria proporciona procedimientos de detección de fármacos o cualquier otro agente que puede afectar a un polipéptido PRO asociada con una enfermedad o trastorno. Estos procedimientos comprenden poner en contacto ese agente con un polipéptido PRO o fragmento del mismo y probar (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido PRO o fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido PRO o fragmento y la célula, mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. En estos ensayos de unión competitivos, el polipéptido PRO o fragmento es generalmente etiquetado. Después de la incubación adecuada, el Polipéptido PRO libre o fragmento se separa de la presente en forma unida, y la cantidad de células libres o etiqueta no compleja es una medida de la capacidad del agente, en particular para unirse al polipéptido PRO o para interferir con el polipéptido PRO/complejo celular.

50 Otra técnica para el cribado de fármacos ofrece un cribado de alto rendimiento para los compuestos que tienen afinidad de unión adecuada para un polipéptido y se describe en detalle en el documento WO 84/03564, publicado el 13 de septiembre de 1984. En pocas palabras, un gran número de diferentes compuestos de ensayo de péptidos pequeños se sintetizan en un sustrato sólido, tal como clavijas de plástico o alguna otra superficie. Como se aplica a un polipéptido PRO, se hacen reaccionar los compuestos de prueba de péptido con polipéptido PRO y se lavan. Se detecta el polipéptido PRO mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. El polipéptido PRO purificado también puede ser recubierto con una película directamente sobre las placas para su uso en las técnicas de cribado de fármacos antes mencionadas. Además, los anticuerpos neutralizantes se pueden utilizar para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

60 La presente memoria también contempla el uso de pruebas de cribado de fármacos competitivos en los que los anticuerpos neutralizantes capaces de unirse específicamente al polipéptido PRO se completan con un compuesto de prueba para su unión al polipéptido PRO o fragmentos de los mismos. De esta manera, los anticuerpos pueden ser utilizados para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta una o más antígenos determinantes con polipéptido PRO.

EJEMPLO 18

Diseño Racional de fármacos

5 El objetivo del diseño racional de fármacos es producir análogos estructurales de polipéptido biológicamente activo de interés (por ejemplo, un polipéptido PRO) o pequeñas moléculas con las que interactúan, por ejemplo, agonistas, antagonistas o inhibidores. Cualquiera de estos ejemplos se puede utilizar para formar fármacos que son formas más activas o estables del polipéptido PRO o que refuercen o interfieran con la función del polipéptido PRO *in vivo* (c.f., Hodgson, Bio/Technology, 9: 19-21 (1991)).

10 En una aproximación, la estructura tridimensional del polipéptido PRO, o de un complejo inhibidor de polipéptido PRO, está determinada por cristalografía de rayos X, mediante modelado informatizado o, más generalmente, mediante una combinación de ambas aproximaciones. Tanto la forma como las cargas del polipéptido PRO deben determinarse para elucidar la estructura y para determinar los sitio(s) activo(s) de la molécula. Con menos frecuencia, la información útil sobre la estructura del polipéptido PRO puede ser adquirida por el modelado basado en la estructura de las proteínas homólogas. En ambos casos, la información estructural de referencia se utiliza para el diseño análogo de moléculas del polipéptido PRO o para identificar inhibidores de la eficiencia. Ejemplos útiles de diseño racional de fármacos pueden incluir moléculas que han mejorado la actividad o la estabilidad, tal como se muestra en Braxton y Wells, Biochemistry, 31:7796-7801 (1992) O que actúan como inhibidores, agonistas o antagonistas de los péptidos nativos tal como se muestra en Athauda et al., J. Biochem., 113:742-746 (1993).

25 También es posible aislar un anticuerpo específico objetivo, seleccionado por análisis funcional, como se describe anteriormente, y luego resolver su estructura cristalina. Este enfoque, en principio, da un farmacóforo en el que el diseño de fármacos posteriores se puede basar. Es posible pasar por alto la cristalografía de proteínas por completo mediante la generación de anticuerpos anti-idiotípicos (anti-IDS) en un anticuerpo funcional, farmacológicamente activo. Como una imagen reflejada de una imagen de espejo, el sitio de unión del anti-IDS se espera que sea un análogo del receptor original. La anti-identificación puede utilizarse para identificar y aislar los péptidos de los bancos de los péptidos producidos química y biológicamente. Los péptidos aislados actuarían entonces como farmacóforos.

30 Gracias al procedimiento descrito en el presente documento, puede ponerse a disposición una cantidad suficiente de polipéptido PRO para llevar a cabo estudios analíticos como cristalografía de rayos X. Además, el conocimiento de la secuencia de aminoácidos polipéptido PRO aquí proporcionado servirá de guía a los que utilizan técnicas de modelado con ordenador en lugar de o además de la cristalografía de rayos X.

35 EJEMPLO 19

Expresión diferencial de distribución de tejidos

40 Se construyeron sondas de oligonucleótidos a partir de secuencias de nucleótidos de codificación de polipéptido PRO1031, PRO1122, PRO21175, PRO10272, PRO20110, PRO5801, PRO20040, PRO9877, y PRO20026 mostradas en las figuras adjuntas para su uso en reacciones de amplificación por PCR cuantitativa. Las sondas de oligonucleótidos fueron seleccionadas para dar fragmentos amplificados pares de 200-600 bases aproximadamente desde el extremo 3' de su patrón asociado en una reacción PCR estándar. Las sondas de oligonucleótidos fueron empleadas en reacciones de amplificación PCR cuantitativa con las librerías de ADNc aisladas de humanos adultos diferentes y/o fuentes de tejido fetal y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para obtener una determinación cuantitativa del nivel de expresión del polipéptido de codificación de los ácidos nucleicos en los diversos tejidos probados. El conocimiento de los patrones de expresión o la expresión diferencial del polipéptido de codificación de ácido nucleico en varios diferentes tipos de tejidos humanos establece un marcador de diagnóstico útil para la tipificación de tejidos, con o sin otros tejidos, marcadores específicos, para determinar el origen primario de tejidos de un tumor metastásico, y similares. Estos ensayos proporcionan los siguientes resultados:

Molécula de ADN	Tejidos con expresión significativa	Tejidos sin expresión significativa
DNA59294-1381	altamente expresada en la glándula mamaria, la tráquea, los testículos y la columna vertebral	débilmente expresado en el intestino, médula ósea, pulmón, riñón y timo, sin expresión en el páncreas, el hígado, el cerebro o el bazo
Molécula de ADN	Tejidos con expresión significativa	Tejidos sin expresión significativa
DNA62377-1381-1	Se expresa con fuerza en los testículos, el bazo, el timo, y en la tráquea	débilmente expresado en el intestino, el cerebro del feto, mama, útero, colon, pulmón, la placenta y el estómago, sin expresión en el músculo, páncreas, hígado, columna vertebral, el cerebro y el hígado del feto
Molécula de ADN	Tejidos con expresión significativa	Tejidos sin expresión significativa

Molécula de ADN	Tejidos con expresión significativa	Tejidos sin expresión significativa
DNA173894-2974	altamente expresada en el músculo, la columna vertebral y el cerebro	no se expresa en la glándula del intestino, mama, la médula, el útero, la tráquea, de colon, las glándulas salivales, pulmón, páncreas, hígado, próstata, las glándulas suprarrenales, los riñones, el timo, la placenta, el corazón, el estómago y el bazo
DNA147531-2821	expresada en bajos niveles en el cerebro, riñón, pulmón, próstata, testículos, la médula espinal, la glándula suprarrenal y en la tráquea	sin expresión en el corazón, hígado, colon, la médula, el músculo del intestino, bazo, estómago, útero, la placenta, timo, el músculo, el útero, la placenta, el páncreas, las glándulas salivales y la glándula mamaria
Molécula de ADN	Tejidos con expresión significativa	Tejidos sin expresión significativa
DNA166819	altamente expresada en los testículos, el timo del riñón y estómago	no se expresa en la glándula del intestino, mama, la médula, el útero, la tráquea, de colon, las glándulas salivales, pulmón, músculo, páncreas, hígado, próstata, glándulas suprarrenales, la placenta del corazón, la columna vertebral, el cerebro y el bazo
Molécula de ADN	Tejidos con expresión significativa	Tejidos sin expresión significativa
DNA115291-2681	altamente expresada en el riñón; expresión significativa en el hígado y los órganos periféricos como el colon, el intestino delgado, próstata, testículos, páncreas y útero	no se expresa en el corazón, la médula ósea, el bazo y la placenta
Molécula de ADN	Tejidos con expresión significativa	Tejidos sin expresión significativa
DNA164625-2890	altamente expresado en la próstata; expresado en los riñones, la espina dorsal, la placenta, hígado, pulmón, colon, bazo, útero, dendrocite y el hipocampo, el intestino, glándula mamaria, la médula ósea, testículos, músculos, el estómago y el timo	débilmente expresado en el corazón, el cartílago, tumores de colon, la sustancia negra y los macrófagos, no se expresa en linfoblastos
Molécula de ADN	Tejidos con expresión significativa	Tejidos sin expresión significativa
DNA119502-2789	fuertemente expresado en la glándula mamaria, la placenta y de próstata; expresado en el intestino, colon, pulmón, riñón, timo, el estómago, el bazo y la columna vertebral	no se expresa en el músculo, hígado y corazón; débilmente expresado en la médula, el útero, testículos y el cerebro
DNA154095-2998	expresa con fuerza en el cerebro fetal; expresión significativa en el útero y los testículos, expresado en la próstata, esófago y los tumores esofágiales, estómago normal y el tumor de estómago, riñón, pero se expresó más alto en el tumor de riñón, el tumor de pulmón y tumor rectal	la expresión insignificante en la glándula mamaria, no de la médula ósea, la tráquea, colon, pulmón, músculo, páncreas, hígado, glándula suprarrenal, timo, la placenta, el corazón, el cerebro y el bazo, recto, expresado en el tumor de hígado

5

Ejemplo 20

Identificación de las interacciones receptor/ligando – Descripción del ensayo de cribado de polipéptidos PRO para la identificación de las interacciones receptor/ligando

10

En este ensayo, se prueban varios polipéptidos PRO para su capacidad para unirse a un grupo de receptores potenciales o moléculas de ligando con el fin de identificar las interacciones receptor/ligando. La identificación de un ligando para un receptor conocido, un receptor para un ligando conocido o un nuevo par receptor/ligando es útil para una variedad de indicaciones que incluyen, por ejemplo, las moléculas bioactivas diana (vinculadas al ligando o al receptor) a una célula conocida que expresa el receptor o ligando, el uso del receptor o ligando como reactivo para detectar la presencia del ligando o receptor en una composición sospechosa de contener las mismas, en la que la composición puede incluir células sospechosas que expresan el ligando o receptor, la modulación del crecimiento de otra actividad biológica o inmunológica de una célula conocida que expresar el receptor o ligando, la modulación de la respuesta inmunitaria de las células o hacia las células que expresan el receptor o ligando, permitiendo la preparación de los agonistas, antagonistas y/o anticuerpos dirigidos contra el receptor o ligando que modulan el crecimiento de una actividad biológica o inmunológica de una célula que exprese el receptor o ligando, y varias otras indicaciones que serán evidente para el experto en la materia.

15

20

En general, el ensayo se realiza como sigue. Un polipéptido PRO del presente documento que se sospecha que es un ligando para un receptor se expresa como una proteína de fusión que contiene el dominio Fc de IgG humana (una inmunoadhesina). La unión receptor-ligando se detecta permitiendo la interacción del polipéptido de inmunoadhesina con células (por ejemplo células Cos) que expresan receptores de polipéptido PRO candidato y la visualización de inmunoadhesina unida con reactivos fluorescentes dirigidos hacia el dominio de fusión Fc y el examen con microscopio. Las células que expresan receptores candidatos se producen mediante transfección transiente, en paralelo, de los subconjuntos definidos de una librería de vectores de expresión de ADNc que codifican polipéptidos PRO que pueden funcionar como moléculas receptoras. Las células se incubaron durante 1 hora en presencia de inmunoadhesina de polipéptido PRO que se prueban para su posible unión al receptor. Las células se lavan y se fijan con paraformaldehído. Las células se incubaron con anticuerpos conjugados fluorescentes dirigidos contra la porción Fc de la inmunoadhesina del polipéptido PRO (por ejemplo anticuerpo anti-humano-Fc de cabra conjugado FITC). Las células se lavan de nuevo y se examinan al microscopio. Una interacción positiva se juzga por la presencia de etiquetas fluorescentes de células transfectadas con ADNc que codifica un receptor polipéptido PRO particular o grupo de receptores y la ausencia de etiquetas fluorescentes similares de células preparadas de manera similar que han sido transfectadas con otros ADNc o grupos de ADNc. Si se considera que un grupo definido de vectores de expresión de ADNc que es positivo para la interacción con una inmunoadhesina de polipéptido PRO, las especies individuales de ADNc que comprenden el grupo son probadas por separado (el grupo está "descompuesto") para determinar el ADNc específico que codifica un receptor capaz de interactuar con inmunoadhesina del polipéptido PRO.

En otra realización de este ensayo, un polipéptido PRO de ligando potencial marcado con epítipo (por ejemplo etiqueta "His" histidina 8) se dejó interactuar con un panel de moléculas de polipéptido PRO receptoras potenciales que se han expresado como fusiones con el dominio Fc de IgG humana (inmunoadhesinas). Después de una 1 hora de coincubación con el polipéptido PRO marcado con epítipo, los receptores candidatos se inmunoprecipitan cada uno con cuentas de proteína A y las cuentas se lavan. La interacción del ligando potencial se determina mediante análisis Western blot de los complejos inmunoprecipitados con anticuerpos dirigidos a la etiqueta de epítipo. Se considera que se produce una interacción si una banda del peso molecular anticipado de la proteína marcada con epítipo se observa en el análisis Western blot con un receptor candidato, pero no se observa que se produzca con los otros miembros del grupo de receptores potenciales.

Usando los ensayos descritos anteriormente, se han identificado aquí las siguientes interacciones receptor/ligando:

- (1) PRO1031 (designada aquí como ligando IL-17B humano) se une a PRO5801 (designado aquí como receptor IL-17RH1 humano).
- (2) PRO10272 (designado aquí como ligando IL-17E humano) se une a PRO5801 (designado aquí como receptor IL-17RH1 humano).
- (3) PRO20110 (designado aquí como ligando IL-17F humano) se une al receptor IL-17 humano (IL-17R) [(Yao et al., Cytokine, 9 (11): 794-800 (1997); también designado aquí como PRO1) y PRO20040 (designado aquí como receptor IL-17RH2 humano).
- (4) PRO1031 (ligando IL-17B) y PRO1122 (ligando IL-17C) no se unen al receptor IL-17 humano (Li et al. Proc.Natl. Acad. Sci. (EE.UU.), 97 (2): 773-778 (2000)).

#### Ejemplo 21

Receptor IL-17 humano (IL-17R; designado PRO1) que se une con nuevos ligandos IL-17B (designado PRO1031) e IL-17C (designado PRO1122)

IL A. Clonación del ECD de Receptor IL-17 humano (designado IL-17R; designado aquí como PRO1):

El ECD de receptor IL-17 humano (IL-17R) [Yao et al., Cytokine 9 (11): 794-800 (1997)] fue clonado para estudiar las interacciones ligando/receptor de los nuevos polipéptidos homólogos de IL-17 IL-17B e IL-17C. Dos oligonucleótidos fueron diseñados en los extremos 5' y 3' de la IL-17R ECD humana basados en la secuencia publicada. [Yao et al., Cytokine, 9:794 (1997)]. Las dos sondas tenían las siguientes secuencias:

Cebador 1: 5'-CTG TAC CTC GAG GGT GCA GAG-3 '(SEQ ID NO: 38)  
 Cebador 2: 5'-CCC AAG CTT GGG TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG ATG CCA CAG GGG CAT GTC GTA C-3 '(SEQ ID NO: 39)

Los cebadores anteriores se utilizaron en reacciones PCR para amplificar el ADNc de longitud completa de un testículo humano con la librería de polimerasa de ADN Pfu Turbo (Promega). Una etiqueta His C-terminal fue introducida mediante PCR a través de la adición de nucleótidos que codifican ocho histidinas en el cebador de extremo 3'. El producto PCR fue subclonado en un pRK5B de vector plásmido de expresión. El análisis de la secuencia confirma que la inserción contiene un fragmento de ADN que codifica el dominio extracelular (1-320 aminoácidos) del receptor hIL-17 publicado.

B. Inmunoprecipitación de la IL-17R ECD:

La actividad diferencial de IL-17 en comparación con la IL-17B (PRO1031, SEQ ID NO: 2) e IL-17C (PRO1122, SEQ ID NO: 4) (ver Ejemplos 28 a 30 de la presente solicitud) sugiere que podrían unirse y activar receptores de superficie celular diferentes. Con el fin de probar si la IL-17B (PRO1031) o IL-17C (PRO1122) se unen directamente al receptor, un plásmido de expresión que contiene la IL-17R (PRO1) (C-terminal marcado His) fue transfectado en 293 células usando reactivo de transfección SuperFect (Qiagen). El etiquetado metabólico de 293 células se realizó 16 horas después de la transfección usando 50 mCi/ml de mezcla [<sup>35</sup>S]-Cys/Met durante 6 horas. El medio acondicionado se recogió y fue concentrado (Centricon-10, Amicon). Para examinar la expresión de la IL-17R ECD, se utilizaron cuentas de Ni-NTA (Qiagen) para el precipitado de afinidad de ECD IL-17R marcado His del medio acondicionado.

El medio condicionado se diluyó en tampón RIPA (1% NP40, 0,5% desoxicolato sódico, SDS 0,1% en PBS) y se incubó con IL-17 y las proteínas de fusión Fc durante la noche a 4°C. Se añadieron centas de proteína A-agarosa (Pierce) para precipitar las proteínas de fusión Fc. Los precipitados se lavaron tres veces para precipitar las proteínas de fusión Fc. Los precipitados se lavaron tres veces en tampón RIPA, se desnaturalizaron en tampón de muestra SDS, y se electroforizaron en geles NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Novex). Para inmunoprecipitación IL-17, se añadió anticuerpo anti-IL-17 (R&D Systems). En un experimento de unión competitiva, la inmunoprecipitación de IL-17R ECD mediante IL-17 se realizó en presencia de un exceso molar de 5 veces de IL-17B.His, IL-17C.His y el control de su proteína etiquetada.

La IL-17R ECD migró como una banda 60kDa cuando se purifica a través de su etiqueta de histidina (Figura 29A), línea 1). Por otra parte, la IL-17R ECD también se precipitó en combinación con IL-17 (línea 3). Sin embargo, tanto la IL-17B y la IL-17C no completaron la unión de la IL-17 para el ECD receptor etiquetado IL-17 (Figura 29B), línea 15 y 16).

#### Ejemplo 22

Nuevo receptor humano IL-17 (IL-17RH1) (designado PRO5801) que se une con IL-17 humano y nuevos ligandos IL-17B (designado PRO1031), IL-17C (designado PRO1122), e IL-17E (designado PRO10272); Inducción de actividad NF-κB y producción de IL-8 mediante IL-17E

#### A. Aislamiento de IL-17E (PRO10272) y Construcción de vectores de expresión:

Fueron aislados clones de ADNc IL-17E (DNA147531-2821, SEQ ID NO: 5) e IL-17RH1 (DNA115291-2681, SEQ ID NO: 11) de una librería de ADNc humano y secuenciados en su totalidad tal como se describe en el Ejemplo 3 y en el ejemplo 5, respectivamente. Fueron preparadas proteínas de fusión Fc (immuno adhesiones) mediante fusión de la totalidad de los marcos de lectura abierta de IL-17, IL-17B (PRO1031), IL-17C (PRO1122) e IL-17E (PRO10272) en el marco con la región Fc de IgG1 humano en el vector de expresión eucariótico pRK5tkNEO y el vector baculovirus pHIF, un derivado de pVL1393 comprado a Pharmingen. Las proteínas de fusión se expresaron transitoriamente en las células 293 humanas o en las células Sf9 de insecto y se purifican en una columna de proteína A. El dominio extracelular del receptor IL-17RH1 (PRO5801) también se expresó como un C-terminal de la fusión de etiqueta 8xHis en baculovirus y purificada mediante columna de afinidad de níquel. IL-17E (PRO10272) también se expresó como una fusión de etiqueta 8xHis en *E. coli* y se purificó y se replegó. Las identidades de las proteínas purificadas fueron verificadas mediante análisis de secuencia N-terminal.

#### B. Análisis Western Blot, Northern Blot y Taqman:

Se realizó el análisis Western blot de la unión de IL-17E (PRO10272) con IL-17RH1 (PRO5801) esencialmente según lo descrito por Xie et al., Cytokine, 11 (10): 729-735 (1999) y Xie et al., J. Biol. Chem., 275 (40): 31335-31339 (2000). Para el análisis Northern blot, múltiples Northern blots de tejido (Clontech) fueron investigados con una sonda etiquetada <sup>32</sup>P de ADNc IL-17RH1 preparado aleatorio de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y se expone a X-omat (Kodak) durante 72 horas. Para el análisis de PCR cuantitativa (Taqman™), se analizó el ARNm total de los tejidos humanos (50 ng) tal como se recomienda (Perkin Elmer) con cebadores basados en la secuencia de codificación de IL-17RH1.

#### C. Análisis FACS:

Células 293 humanas fueron cotransfectadas transitoriamente con vectores de expresión para proteína verde fluorescente (GFP), e IL-17RH1 (PRO5801) o IL-17R (designado PRO1) como se indica. Después de 24 horas, las células fueron incubadas con ligando marcado Fc, como se indica y la unión fue revelada con anticuerpo Fc anti-humano conjugado PE. Las curvas de FACS muestran el teñido PE en la población de células positivas GFP cotransfectadas (Figura 32A)

#### D. Ensayos NF-κB, e IL-8 y Análisis Western Blot:

Se llevaron a cabo ensayos de reportero de luciferasa fundamentalmente como se describe en Gurney et al. Curr Biol., 9 (4): 215-218 (1999). En resumen, células 293 o CT-10 (2 x 10<sup>5</sup>) fueron transfectadas mediante transfección Effectine (Qiagen) con 0,5 mg de plásmido pGL3-ELAM.tk reportero de luciferasa de luciérnaga y 0,05 mg del plásmido reportero de luciferasa Renilla como control de la transfección interna, así como plásmido de expresión IL-17E (0,1 mg) y plásmido portador pRK5D para mantener el ADN constante entre transfecciones. Después de 24 horas, las células se

recogieron y se analizó la actividad de luciferasa como se recomienda (Pharmacia). Se realizó ELISA IL-8 de acuerdo con las instrucciones del fabricante de R&D Systems) (Figura 33).

#### E. Resultados y Discusión:

5 Tal como se describe anteriormente, nuevos miembros de la familia IL-17 han sido identificados y caracterizados, designados aquí como IL-17B (PRO1031), IL-17C (PRO1122), IL-17D (PRO21175), e IL-17E (PRO10272). Cuatro miembros de la familia IL-17: IL-17, IL-17B, IL-17C y la IL-17E comparten la mayor similitud en la porción C-terminal de la molécula con un 20-30% de identidad de secuencia de aminoácidos y la conservación estricta de las cuatro cisteínas. Cisteínas adicionales que pueden ser conservadas funcionalmente presentan diferencias en la posición. En cambio, hay poca conservación evidente en 80 residuos N-terminal. La alineación de los miembros de la familia IL-17 [IL-17 (SEQ ID NO: 40), IL-17B (PRO1031, SEQ ID NO: 2), IL-17C (PRO1122, SEQ ID NO: 4) y IL-17E (PRO10272, SEQ ID NO: 6)] se muestra en la Figura 30. Las secuencias de la señal predichas están subrayadas. Las cisteínas conservadas están indicadas por la bala, y N los sitios de glicosilación potenciales ligados N están en caja.

15 No fue detectado IL-17E ARNm mediante análisis Northern blot. Sin embargo, fue detectado IL-17E en niveles muy bajos en varios tejidos como el cerebro, riñón, pulmón, próstata, testículos, médula espinal, la glándula suprarrenal y la tráquea mediante RT-PCR utilizando cebadores diseñados para distinguir ARNm empalmado a partir de ADN genómico. Los resultados de los análisis RT-PCR de la expresión IL-17E (PRO10272) se muestran en la Figura 23. Como se describió anteriormente, el ARN de los tejidos indicados fue sometido a RT-PCR con iniciadores que fueron diseñados para amplificar toda la secuencia de codificación de IL-17E. El producto de PCR se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa, transferidos a membrana de nylon y se probaron con una sonda de ADNc IL-17E etiquetada <sup>32</sup>P.

25 Los solicitantes han demostrado que la IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122) no se unen al receptor humano IL-17 (designado aquí PRO1) (ver el ejemplo 21). Un nuevo receptor IL-17 (designado aquí como IL-17RH1; PRO5801) ha sido identificado y caracterizado aquí. Los clones de ADNc IL-17RH1 (DNA115291-2681, SEQ ID NO: 11) fueron aislados de una librería de ADNc humano y secuenciados en su totalidad, tal como se describe en el ejemplo 5. La expresión de ARNm IL-17RH1 fue examinada mediante Northern blot, tal como se muestra en la Figura 31A y la PCR cuantitativa tal como se muestra en la Figura 31B. Los niveles de expresión más altos de IL-17RH1 (PRO5801) se observaron en el riñón, con una expresión significativa también observada en el hígado y otros órganos periféricos como el colon, intestino delgado, próstata, páncreas y útero.

35 Los estudios de unión se llevaron a cabo para determinar si esta nueva molécula (designada IL-17RH1; PRO5801) sirve como receptor de los demás miembros de la familia IL-17. Las células de riñón humano 293 transfectadas con un vector de expresión de IL-17RH1 se demostraron que se unen a la proteína de fusión IL-17E-Fc (immunoadhesina), pero no muestran unión significativa de IL-17 humana (como se muestra en la Figura 32A). La unión de la immunoadhesina IL-17E a las células que expresan IL-17RH1 puede ser completamente inhibida por la competencia con su epítipo His marcado IL-17E. En comparación, las células transfectadas con el vector de expresión de IL-17R se unen a la immunoadhesina IL-17, pero no a IL-17E. Para examinar si existe una interacción directa con los miembros de la familia IL-17, se realizaron estudios de unión del ligando con el dominio extracelular del epítipo marcado del receptor IL-17RH1. Como se muestra en la Figura 32B, este nuevo receptor presenta una fuerte unión con IL-17E-Fc, y una unión débil con IL-17B-Fc, pero no une IL-17E-Fc o IL-17C-Fc.

45 Se ha observado que la IL-17 induce la actividad de NF-κB (Jovanovic *et al.*, *supra*). Se realizó un estudio para determinar si la IL-17E (PRO10272) también induce la activación del gen reportero de luciferasa de respuesta NF-κB en dos líneas de células de carcinoma de células renales, 293 y células CT-10 (dos de estas líneas celulares fueron encontrados para expresar IL-17RH1 ARNm endógeno). Los resultados de estos estudios se muestran en la Figura 33A. La transfección de vectores de expresión de IL-17E indujo notablemente la actividad de la luciferasa. La actividad de la luciferasa fue inducida de forma dependiente de la dosis, y fue de magnitud similar a la observada por la sobreexpresión de GTR del miembro de la superfamilia de receptores TNF (ver la Figura 33B), que ha mostrado ser un potente inductor de la actividad NF-κB (Gurney *et al.*, *supra*). NF-κB se considera que media una señal proinflamatoria, lo que sugiere que la IL-17E puede tener una acción proinflamatoria. Para examinar esta posibilidad, se examinó la producción de IL-8, una quimiocina proinflamatoria inducida por la IL-17. Como se muestra en la Figura 34, la IL-17E (PRO10272) indujo la activación de la IL-8 en células TK-10.

55 En resumen, la IL-17RH1 (PRO5801) es el segundo receptor identificado que se une a los miembros de la familia IL-17. La familia del receptor IL-17 está bastante no relacionada con otras proteínas. Sin embargo, la comparación de los dos receptores revela la conservación de muchas cisteínas en el dominio extracelular, lo que sugiere que comparten una estructura similar. También hay elementos conservados dentro del dominio intracelular, lo que sugiere que estos receptores pueden acoplarse en una maquinaria intracelular similar. Esto se apoya en la observación de que como la IL-17, la IL-17E señala de activación de NF-κB. Las regiones de conservación en el dominio intracelular no guardan similitud evidente con otras familias de receptores conocidas para activar las familias de receptores NF-κB, IL1/Toll y TNF.

65 La IL-17E induce la producción de IL-8, una molécula proinflamatoria que se ha observado también que es inducida por la IL-17, sugiriendo que la actividad biológica de estas dos citocinas puede ser similar. El receptor IL-17 tiene un patrón

de expresión muy amplio, en contraste con el patrón un poco más restringido del patrón de expresión de ARNm de la IL-17RH1 (PRO5801) (ver la Figura 31). Si estas moléculas median las respuestas proinflamatorias en general análogas, una consideración clave en la comprensión de la función de los diferentes miembros de la familia de citocina IL-17 en expansión serán los patrones de expresión y la regulación de los receptores afines.

5 Las Figuras 25 a 28 muestran la distribución de expresión del tejido relativa de de los nuevos homólogos receptores IL-17 identificados aquí como IL-17RH1 (PRO5801, SEQ ID NO: 12), IL-17RH2 (PRO20040; SEQ ID NO: 14), IL-17RH3 (PRO9877, SEQ ID NO: 16) y IL-17RH4 (PRO20026; SEQ ID NO: 18), respectivamente.

10 En resumen, la Figura 35 muestra el IL-17 de la familia de patrón complejo de citocinas de las especificidades receptor-ligando superpuestos. Como se muestra, los ligandos IL-17C y IL-17D parecen tener una especificidad para un receptor de la interleucina-17 diferente de la IL-17R, IL-17RH1 o IL-17RH2. Además, las figuras 20 a 28 y la Figura 31 demuestran la distribución de expresión del tejido relativa para los nuevos homólogos IL-17 y los receptores IL-17 aquí identificados.

15 Ejemplo 23

Inducción de c-fos en las células endoteliales (ensayo # 34)

20 Este ensayo está diseñado para determinar si polipéptidos PRO muestran la capacidad de inducir c-fos en las células endoteliales. Los polipéptidos PRO que dan positivo en esta prueba se espera que sean útiles para el tratamiento terapéutico de las condiciones o trastornos si la angiogénesis podría ser beneficiosa, incluyendo, por ejemplo, la cicatrización de heridas, y similares (como los agonistas de estos polipéptidos PRO). Los antagonistas de los polipéptidos PRO que dan positivo en este ensayo se espera que sean útiles para el tratamiento terapéutico de los tumores cancerosos.

30 Células endoteliales humanas de la vena umbilical venosa (HUVEC, Cell Systems) en medios de crecimiento (50% Ham F12 w/o GHT: glucosa baja, y 50% DMEM sin glicina: con NaHCO<sub>3</sub>, 1% glutamina, 10 mM HEPES, 10% FBS, 10 ng/ml bFGF) son colocadas en placas de microtítulo de 96 pozos con una densidad celular de 1x10<sup>4</sup> células/pozo. El día después de la colocación, las células se dejan de alimentar mediante la eliminación del medio de cultivo y se tratan las células con 100 µl/pozo de muestras de ensayo y controles (control positivo: medio de cultivo; control negativo: HEPES 10 mM, 140 ml NaCl, 4% (w/v) manitol, pH 6,8). Las células se incuban durante 30 minutos a 37°C, en 5% CO<sub>2</sub>. Las muestras se retiran, y se sigue la primera parte del protocolo del equipo de bDNA (Chiron Diagnostics, cat. # 6005-037), en el que cada reactivo/tampón capitalizado indicado a continuación se encuentra disponible en el equipo.

35 En resumen, las cantidades de tampón de lisis TM y de sondas necesarias para las pruebas se calculan en base a la información proporcionada por el fabricante. Las cantidades apropiadas de sondas descongeladas se añaden a la solución de lisis TM. El tampón de hibridación de captura se calienta a temperatura ambiente. Las bandas de bDNA se establecen en los soportes de las bandas de metal, y 100 µl de tampón de hibridación de captura se añaden a cada pozo de b-ADN necesario, seguido por incubación durante por lo menos 30 minutos. Las placas de ensayo con las células son retiradas de la incubadora, y el medio se quita suavemente saundo el colector de vacío. 100 µl de tampón de hibridación de lisis con sondas son rápidamente pipeteados en cada pozo de las placas de microtítulo. Las placas se incuban a 55°C durante 15 minutos. Después de la retirada de la incubadora, las placas se colocan en el mezclador de vórtice con la cabeza del adaptador de microtítulo y el vórtice en el ajuste # 2 durante un minuto. Se retiran 80 µl de lisado y se añaden a los pozos de bDNA que contienen el tampón de hibridación de captura, y se pipetan hacia arriba y abajo para su mezcla. Las placas se incuban a 53°C durante por lo menos 16 horas.

40 Al día siguiente, se sigue la segunda parte del protocolo del equipo bDNA. En concreto, las placas son retiradas de la incubadora y se colocan en el banco para enfriarse durante 10 minutos. Los volúmenes de las adiciones necesarias se calculan en base a la información proporcionada por el fabricante. Una solución de trabajo amplificadora se prepara haciendo una dilución 1:100 del concentrado amplificador (20 fm/microlitro) en hibridación AL de estabilización. La mezcla de hibridación se retira de las placas y se lava dos veces con el Lavado A. 50 µl de solución de trabajo amplificadora se agregan a cada pozo y los pozos se incuban a 53°C durante 30 minutos. Las placas se retiran de la incubadora y se dejan enfriar durante 10 minutos. La solución de trabajo de sonda de etiqueta se prepara haciendo una dilución 1:100 de Concentrado de Etiqueta (40 pmoles/microlitro) en tampón de hibridación AL. Después de un período de enfriamiento de 10 minutos, la mezcla de hibridación amplificadora se retira y las placas se lavan dos veces con Lavado A. 50 µl de solución de trabajo de sonda de etiqueta se agregan a cada pozo y los pozos se incuban a 53°C durante 15 minutos. Después de enfriarse durante 10 minutos, el sustrato es calentado a temperatura ambiente. Tras la adición de 3 µl de sustrato potenciador para cada ml de sustrato necesario para el ensayo, se permite que las placas se enfrién durante 10 minutos, la mezcla de hibridación de etiqueta se retira, y las placas se lavan dos veces con Lavado A y tres veces con Lavado D 50. µl de la solución de sustrato con potenciador se añaden a cada pozo. Las placas se incuban durante 30 minutos a 37°C y se lee la RLU en un luminómetro apropiado.

60 Las réplicas se promedian y se determina el coeficiente de variación. La medida de la actividad del aumento de pliegues sobre el valor de control negativo (tampón HEPES descrito anteriormente) está indicado por las unidades de quimioluminiscencia (RLU). Las muestras que muestran un mínimo de dos veces el valor sobre el valor de los controles

negativos se considerarán positivas.

PRO1031 ensayado "positivo" tal como se muestra a continuación:

ENSAYO # 1	
Control negativo	= 1,0 RLU
Control positivo	= 10,96 RLU
PRO1031 en 0,056 nM	= 2,22 RLU
ENSAYO # 2	
Control negativo	= 1,0 RLU
Control positivo	= 10,96 RLU
PRO1031 en 0,56 nM	= 2,01 RLU

#### Ejemplo 24

##### Ensayo de permeabilidad vascular de la piel (prueba # 64)

10

15

20

25

Este ensayo muestra que ciertos polipéptidos PRO estimulan una respuesta inmunitaria y provocan la inflamación mediante la inducción de células mononucleares, eosinófilos y la infiltración de PMN en el sitio de la inyección del animal. Este ensayo de la permeabilidad vascular de la piel se lleva a cabo de la siguiente manera. Conejillos de indias sin pelo que pesan 350 gramos o más son anestesiados con quetamina (75-80 mg/Kg) y 5 mg/kg de xilazina por vía intramuscular (IM). Una muestra de polipéptido purificado PRO o una muestra de medio de prueba acondicionado se inyecta por vía intradérmica en la espalda de los animales de prueba con 100 µL por sitio de inyección. Es posible disponer de alrededor de 10-30, de preferiblemente alrededor de 16-24, sitios de inyección por animal. Un ml de colorante azul Evans (1% en solución salina fisiológica tamponada) se inyecta de manera intracardiaca. Las manchas en los sitios de inyección se midieron a continuación (mm de diámetro) en 1 hora, 6 horas y 24 horas después de la inyección. Los animales fueron sacrificados a las 6 horas después de la inyección. En cada sitio de inyección de la piel se realizó una biopsia y se fijó en paraformaldehído. Las pieles se prepararon a continuación para la evaluación histopatológica. Cada sitio es evaluado por la infiltración de células inflamatorias en la piel. Sitios visibles con la inflamación de células inflamatorias son calificadas como positivas. Las células inflamatorias pueden ser neutrófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos.

Por lo menos un mínimo infiltrado perivascular en el sitio de la inyección se califica como positivo, ningún infiltrado en el sitio de la inyección se califica como negativo. PRO1031 proporcionó resultados positivos en el intervalo de tiempo de 24 horas en este ensayo.

30

#### Ejemplo 25

##### Actividad estimuladora en la reacción mixta de linfocitos (MLR) (ENSAYO # 24)

35

Este ejemplo muestra que los polipéptidos del presente documento actúan como estimuladores de la proliferación de los linfocitos T. Los compuestos que estimulan la proliferación de los linfocitos son terapéuticamente útiles si la mejora de la respuesta inmunitaria es beneficiosa. Un agente terapéutico también puede adoptar la forma de los antagonistas de los polipéptidos PRO del presente documento, por ejemplo, quimérico humano-murino, humanizados o anticuerpos contra el polipéptido, lo que se espera para inhibir la proliferación de linfocitos T.

40

El protocolo básico para este ensayo se describe en el Current Procolos in Immunology, unidad 3.12, editado por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, publicado por John Wiley & Sons, Inc.

45

50

Más específicamente, en una variante del ensayo, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aíslan de individuos mamíferos, por ejemplo, un voluntario humano, por leucoféresis (un donante suministrará PBMCs estimuladores, el otro donante proporcionará PBMCs de respuesta). Si se desea, las células se congelan en suero fetal bovino y DMSO después del aislamiento. Las células congeladas pueden descongelarse durante la noche en medio de ensayo (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) y a continuación se lavaron y se resuspendieron en 3 x 10<sup>6</sup> células/ml del medio de ensayo (RPMI, 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, glutamina 1%, 1% HEPES, 1% aminoácidos no esenciales, piruvato 1%). Los PBMCs estimuladores son preparados por irradiación de las células (alrededor de 3000 Rads). El ensayo se prepara por colocando en los pozos por triplicado una mezcla de: 100:1 de muestra diluida al 1% o al 0,1%; 50:1 de células estimuladoras irradiadas y 50:1 de células CMSP de respuesta. Se utilizan 100 microlitros de medio de cultivo celular o 100 microlitros de células CD4-IgG como control. Los pozos se incuban a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante 4 días. En el día 5 y cada pozo se pulsa con timidina tritiada (1,0 mCi/pozo; Amersham). Después de 6 horas,

las células se lavan 3 veces y a continuación se evalúa la absorción de la etiqueta.

5 En otra variante de este ensayo, se aíslan PBMCs del bazo de ratones Balb/c y ratones C57B6. Las células se retiran de bazos recién recogidos en medio de ensayo (RPMI, 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, glutamina 1%, 1 HEPES%, 1% aminoácidos no esenciales, piruvato 1%) y los PBMCs se aíslan mediante la superposición de estas células en los linfocitos M (Organon Teknika), centrifugando a 2000 rpm durante 20 minutos, recogiendo y lavando la capa de células mononucleares en el medio de ensayo y se resuspenden las células en  $1 \times 10^7$  células/ml de medio de ensayo. El ensayo se llevó a cabo a continuación, tal como se describe anteriormente. Los incrementos positivos en el control se consideran positivos, prefiriéndose incrementos mayores o iguales a 180%. Sin embargo, cualquier valor mayor que el control indica un efecto estimulador de la proteína de prueba. Los resultados de este ensayo para los compuestos del presente documento se muestran a continuación:

PRO	Concentración PRO	Porcentaje de aumento sobre el control
PRO10272	0,84 nM	201,5

15 Ejemplo 26

Estimulación de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) o células CD4<sup>+</sup> con anti CD3 y proteína PRO (Ensayo # 99)

20 Este análisis muestra que uno o más de los polipéptidos PRO actúan como potenciadores de la estimulación de células PBMC o CD4<sup>+</sup>. Las células CD4<sup>+</sup> se enriquecen mediante selección negativa utilizando cuentas MACs después de la separación LSM. La capacidad del polipéptido PRO para sustituir al anti-CD28 es examinada para determinar el efecto estimulador.

25 Se conoce que anti-CD3 y anti-CD28 estimulan los PBMCs. El protocolo básico para el aislamiento de PBMCs utilizado en este ensayo se describe en "Current Protocols in Immunology", unidad 3.12, editado por J.E. Coligan, A.M. Kruisbeek, D.H. Marglies, E.M. Shevach, W. Strober, National Institutes of Health, publicado por John Wiley & Sons, Inc.

30 Más específicamente, en una variante del ensayo, las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aíslan de individuos mamíferos, por ejemplo, un voluntario humano, por leucoféresis. Si se desea, las células son enriquecidas para células CD4<sup>+</sup>, a continuación se congelan en 90% suero fetal bovino y 10% DMSO después del aislamiento. Las células congeladas pueden descongelarse durante la noche en medio de ensayo (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) y luego se lavan y se resuspenden a  $0,5 \times 10^6$  células/ml de medio de ensayo (RPMI, 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, glutamina 1%, 1% HEPES, 1% aminoácidos no esenciales, piruvato 1%).

35 El ensayo se prepara recubriendo en pozos por triplicado una mezcla de: 200 µl de células después de recubrimiento durante la noche de proteína anti-CD3 y PRO.

40 50 µl de anti-CD3 (50 ng/ml, Amac 0178) y 50 µl de 1% proteína PRO se recubrieron en una placa de 96 pozos con PBS a 4°C durante la noche. 50 µl Hu-IgG se utilizaron como control en lugar de la proteína PRO. Los pozos se incuban a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> durante unos 3 días. El día 4, cada pozo es pulsado con timidina tritiada (1,0 mC/pozo; Amersham). Después de 6 horas las células se recogen y a continuación se avalúa la respuesta de la etiqueta.

45 Un resultado que indica un efecto estimulante (por ejemplo, incorporación de <sup>3</sup>[H]-timidina) superior al 200% del control se considera que es un resultado estimulante positivo.

50 En otra variante de este ensayo, se aíslan esplenocitos PBMCs o CD4<sup>+</sup> del bazo de ratones Balb/c. Las células se sacan de bazos recién recogidos en medio de ensayo (RPMI, 10% suero fetal bovino, 1% penicilina/estreptomicina, glutamina 1%, 1% HEPES, 1%, aminoácidos no esenciales, piruvato 1%) y los PBMCs se aíslan por superposición de estas células en Lympholyte M (Organon Teknika), se centrifugan a 2000 rpm durante 20 minutos, se recogen y se lava la capa de células mononucleares en medio de ensayo. Las células CD4<sup>+</sup> se enriquecen mediante selección negativa utilizando cuentas, se lavan en medio y se resuspenden las células en  $1 \times 10^7$  células/ml de medio de ensayo. El ensayo se llevó a cabo a continuación, tal como se describe anteriormente. Los resultados se muestran a continuación:

Concentración PRO	estimulación (+)/inhibición (-)
PRO1031 5,6 Nm	(+) 285% por encima del índice de estimulación basal
PRO1031 0,56 nM	(+) 147% por encima del índice de estimulación basal

55 Ejemplo 27

Proteínas de fusión Fc/His que generan IL-17B e IL-17C

Las secuencias de codificación IL17B y IL17C se amplificaron mediante PCR y se subclonaron en los sitios EcoRI y SmaI de pBPH.His.c para generar una etiqueta GHHHHHHHH C-terminal o los sitios EcoRI y StuI de pBPH.IgG para generar una fusión C-terminal con la región Fc de la IgG1 humana. Los vectores pBPH.His.c y pBPH.IgG son derivados del vector de expresión de baculovirus pVL1393 (Pharmingen). Una proteína de control Fe o marcada His fue construida de manera similar que la proteína asociada a la pancreatitis (175 aminoácidos) C-terminal en la porción Fc de la IgG1 humana o su marca-8.

Las proteínas de fusión fueron expresadas en células High 5 utilizando el procedimiento recomendado por el fabricante (Invitrogen). En resumen, las construcciones de ADN fueron cotransfectadas con baculovirus BaculoGold ADN (Pharmingen) en una proporción de 7:1 en las células Sf9 adherente. Las células fueron incubadas a 28°C durante 4 días y el sobrenadante fue extraído. El sobrenadante de la transfección se amplificó y se sometió a purificación de afinidad mediante cuentas de proteína A-sefarosa (Pharmacia) para proteínas de fusión Fc o mediante cuentas de Ni-NTA agarosa (QIAGEN) para proteínas marcadas His.

Para examinar la expresión de las proteínas, se realizó un análisis SDS-PAGE sobre la afinidad de proteínas recombinantes purificadas bajo condiciones no reductoras y reductoras, seguido por tinte de plata.

#### Ejemplo 28

##### Inducción de la liberación de IL-6 y TNF- $\alpha$ mediante IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122)

Utilizando el procedimiento descrito en Yao et al., J. Immunol., 155: 5483 (1995) para la liberación de IL-6, células de fibroblasto humanas prepucio (ATCC CRL-2091) fueron cultivadas en medio MEM (10% FBS) con la citocina de prueba. Después de la incubación durante 18 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, el medio acondicionado fue ensayado para IL-6 mediante un equipo ELISA (R&D Systems). Para la secreción de TNF- $\alpha$ , fueron cultivadas células humanas THP-1 de leucemia monocítica en medio RPMI (10% FBS) con citocinas de prueba. Después de una incubación de 18 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, El medio acondicionado fue cuantificado para TNF- $\alpha$  usando un equipo de ensayo ELISA (R&D Systems).

Fibroblastos humanos de prepucio (ATCC) fueron cultivados por separado en medio MEM (10% FBS) en presencia de IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122). Después de la incubación durante 18 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, el medio acondicionado fue ensayados para IL-6 mediante un equipo ELISA (R&D Systems). En contraste con el alto nivel de IL-6 inducida por IL-17, tanto IL-17B (PRO1031) como IL17C (PRO1122) no lograron estimular la secreción de IL-6 en las células de fibroblasto (como se muestra en la Figura 36A).

Utilizando el procedimiento descrito en Yao et al., Cytokine, 9: 794 (1997), una línea de células leucémicas humanas monocíticas, THP-1, fue utilizada para el ensayo de la estimulación de la liberación de TNF- $\alpha$  mediante IL-17, IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1031) mediante el cultivo en medio RPMI (10% FBS). Después de la incubación de 18 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, el medio acondicionado fue cuantificado para TNF- $\alpha$  utilizando un equipo de prueba ELISA (R&D Systems). Aunque la IL-17 se inducido por un bajo nivel de TNF- $\alpha$  en células THP-1, tanto la IL-17B como la IL-17C (como proteínas de fusión Fc) estimulan la producción de TNF- $\alpha$  en células THP-1 (como se muestra en la Figura 36B). Un control de la proteína de fusión Fc no tuvo ningún efecto.

Para también caracterizar la estimulación de la liberación de TNF- $\alpha$  mediante IL-17B y IL-17C, se ensayaron en THP-1 células la evolución temporal y la dependencia de la concentración de la respuesta. La figura 37 muestra que la IL-17B y la IL-17C estimulan la liberación de TNF- $\alpha$  de una manera dependiente del tiempo y de la concentración. La EC<sub>50</sub> para la estimulación de IL-17B es de 2,4 nM, mientras que la EC<sub>50</sub> para IL-17C es de 25 nM.

Aunque las preparaciones de IL-17B y IL-17C utilizadas en estos experimentos contenían un nivel no detectable de endotoxina (menos de 1 EU/ml), fueron realizados experimentos de control adicionales para confirmar que la liberación de TNF- $\alpha$  de células THP-1 era real y no artificial. Las actividades de IL-17B y IL-17C no se vieron afectadas por el tratamiento de polimixina B, y fueron suprimidas mediante tratamiento térmico, también apoyando la idea de que las propias proteínas se encargan de las actividades y no cualquier contaminación de endotoxinas.

#### Ejemplo 29

##### Análisis de clasificador celular activado con fluorescencia (FACS) de la unión a células THP-1 por las proteínas de fusión IL-17, IL-17B y IL-17C

Células THP-1 ( $5 \times 10^5$ ) fueron preincubadas en PBS con 5% suero de caballo a 4°C durante 30 minutos para bloquear la unión no específica. Se añadieron IL-17, IL-17B.Fc, IL-17C.Fc, o FC de control (1 mg cada una) y se incubaron con células THP-1 en un volumen de 0,25 ml en hielo durante 1 hora. Para experimento de unión de IL-17, se añadieron de forma secuencial anticuerpo anti hIL-17 primario (dilución 1:100) y anticuerpo anti-ratón de cabra secundario conjugado con FITC (Jackson Immunology Lab, dilución 1:100) con una incubación de 30-60 minutos y lavados extensivos antes de cada adición. Para las proteínas de fusión Fc, las células fueron teñidas con FITC conjugado con IgG anti-humano de cabra (Fc específico, Jackson Immunology Lab, dilución 1:100). Después de lavados a fondo, se analizaron un mínimo de 5.000 células mediante un FACScan (Becton Dickinson).

El resultado del procedimiento anterior es que las proteínas de fusión IL-17B y IL-17C Fc mostraron su unión con células THP-1 comparado con una proteína de fusión Fc de control (como se muestra en la Figura 38).

## 5 Ejemplo 30

### Ensayo de explante de cartílago articular para IL-17 e IL-17C

#### A. Introducción:

10

Como se mencionó anteriormente, la IL-17 es probable que desempeñe un papel en la iniciación o el mantenimiento de la respuesta proinflamatoria. La IL-17 es una citocina expresada por células Th CD4<sup>+</sup> e induce la secreción de citocinas proinflamatorias y hematopoyéticas (por ejemplo, IL-1b, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, GM-CSF) en una serie de tipos de células incluyendo sinoviocitos y macrófagos [Aarvak et al., J. Immunol., 162:1246-1251 (1999); Fossiez et al., J. Exp. Med., 183: 2593-2603 (1996); Jovanovic et al., J. Immunol., 160:3513-3521 (1998)]. En presencia de IL-17, los fibroblastos sostienen la proliferación de progenitores hematopoyéticos CD34<sup>+</sup> e inducen su maduración preferente en los neutrófilos. Como resultado, la IL-17 puede constituir un iniciador temprano de la reacción inflamatoria dependiente de las células T y ser parte de la red de citocinas que une el sistema inmunológico para la hematopoyesis.

15

20

La expresión de IL-17 se ha encontrado en la membrana sinovial de pacientes con artritis reumatoide, artritis psoriásica o artrosis, pero no en tejidos normales conjuntos. La IL-17 puede crear sinergias con los derivados de los monocitos, las citocinas proinflamatorias IL-1b y TNF- $\alpha$  para inducir IL-6 y GM-CSF. Al actuar directamente sobre sinoviocitos, la IL-17 podría aumentar la secreción de citocinas proinflamatorias, *in vivo* y, por lo tanto, exacerbar la inflamación articular y la destrucción.

25

Para entender mejor el posible papel de la IL-17, los solicitantes han probado los efectos de la IL-17 en el metabolismo de la matriz del cartílago. A la vista de los efectos catabólicos conocidos del óxido nítrico (NO) sobre el cartílago, y la existencia de altos niveles de NO en las articulaciones artríticas, también se midió la producción de NO.

30

#### B. Procedimientos:

Explantos de cartílago articular: La articulación metacarpofalangeal de cerdos hembra de 4-6 meses de edad fue asépticamente diseccionada y se retiró el cartílago articular mediante corte con mano libre de una manera cuidadosa para evitar el hueso subyacente. El cartílago fue molido y cultivado *in vitro* por lo menos durante 24 horas en un ambiente húmedo del 95% de aire 5% CO<sub>2</sub> en medio libre de suero (SF) (DME/F12 1:1) con 0,1% BSA y antibióticos. Tras lavar tres veces, alrededor de 80 mg de cartílago articular se separaron en alícuotas en tubos Micronics y se incubaron durante por lo menos 24 horas en el medio SF anterior. Se añadieron proteínas de prueba al 1% ya sea en solitario o en combinación con IL-1a (10 ng/ml). El medio fue extraído y cambiado en varios puntos de tiempo (0, 24, 48, 72 horas) y se analizó el contenido de proteoglicanos usando el ensayo colorimétrico con 1,9-dimetil-azul de metileno (DMB), descrito en Farndale y Buttle, Biochem. Biophys. Acta, 883:173-177 (1985). Después del etiquetado (durante la noche) con <sup>35</sup>S-azufre, los tubos se pesaron para determinar la cantidad de tejido. Después de una digestión durante la noche, se determinó la cantidad de proteoglicanos que quedaron en el tejido, así como la síntesis de proteoglicanos (incorporación de <sup>35</sup>S).

35

40

Medición de producción de NO: El ensayo se basa en el principio de que el 2,3-diaminonaftaleno (DAN) reacciona con nitrito en condiciones de acidez para formar 1-(H)-naftotriazol, un producto fluorescente. Como el NO se metaboliza rápidamente en nitrito (NO<sub>2</sub>-1) y nitrato (NO<sub>3</sub>-1), la detección de nitritos es una forma de detectar (aunque con una cuenta inferior) el NO real producido. 10 ml de DAN (0,05 mg/mL en 0,62 M HCl) se añaden a 100 ml de muestra (sobrenadante de cultivo celular), se mezclan, y se incuban a temperatura ambiente durante 10-20 minutos. La reacción se termina con 5 ml de NaOH 2,8N. La formación de 2,3-diaminonaftotriazol se midió utilizando un lector de placas fluorescentes Cytoflor con excitación a 360 nm y de emisión a 450 nm. Para la medición óptima de la intensidad de la fluorescencia, se utilizaron placas de color negro con fondo claro.

50

55

#### C. Resultados y Discusión:

La IL-17 se observó que aumenta la liberación y la disminución de la síntesis de proteoglicanos (como se muestra en la Figura 39). Además, este efecto era aditivo a los efectos observados de la IL-1a. Los efectos de la IL-17 no están mediados por la producción de óxido nítrico, ni la inhibición de la liberación de óxido nítrico de aumento de la degradación de la matriz (ver las Figuras 40 a 42). La IL-17C (PRO1122) incrementa la disolución de la matriz e inhibe la síntesis de la matriz (Figura 43). Así, la expresión de PRO1122 es probable que se asocie con enfermedades degenerativas cartilaginosa.

60

En conclusión, la IL-17 probablemente contribuye a la pérdida del cartílago articular de las articulaciones con artritis, y por lo tanto, la inhibición de su actividad podría limitar la inflamación y la destrucción del cartílago. La IL-1a y IL-17 tienen actividades similares aunque distintas, debido a su uso de receptores diferentes y mecanismos de señalización posteriores superpuestos. Dados los resultados de los potentes efectos catabólicos de la IL-17 en explantes de cartílago

65

articular y la homología de la IL-17B (PRO1031) e IL-17C (PRO1122) para IL-17, los antagonistas a cualquiera o todas de estas proteínas puede ser útil para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y los defectos del cartílago, como la artritis.

5 Finalmente, es bien sabido que los factores de crecimiento pueden tener efectos bifásicos y que el tejido enfermo pueden responder de manera diferente que el tejido normal a un factor determinado *in vivo*. Por estas razones, los antagonistas o agonistas (por ejemplo, las propias proteínas) de IL-17B (PRO1031), IL-17C (PRO1122), o IL-17, pueden ser útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y trastornos de las articulaciones, como la artritis.

10 Ejemplo 31

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII): Expresión de Familia IL-17 en el modelo de ratón de EII

15 Los ratones deficientes en el receptor de citocina CRF2-4/IL-1 ORb desarrollan colitis espontánea y progresiva que se asemeja a la condición humana de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Este fenotipo ha sido descrito previamente (Spencer et al., J. Exp. Med., 187:571-578 [1998]). Para examinar el papel de la expresión de IL-17, miembros de la familia en este modelo de la EII, se han recogido colonos de ratones normales (tipo salvaje "WT") y de ratones deficientes CRF2-4. Los colonos de ratones deficientes CRF2-4 se clasifican en especímenes que muestran EII leves y especímenes que muestran EII grave más avanzada. El ARN fue aislado de las muestras de colon y de la expresión  
20 relativa de los miembros de la familia IL-17 fue determinada por PCR cuantitativa (Taqman™). La Figura 44 muestra la expresión relativa de IL-17, IL-17E (DNA147531-2821), IL-17B (DNA59294-1381-1) e IL-17D (DNA173894-2947), representada por delta-CT respecto a GAPDH. La expresión de IL-17E disminuye marcadamente en EII grave más avanzada respecto a los niveles de expresión en ratones normales (tipo salvaje "WT"). En contraste, se observaron aumentos de los valores de la expresión de IL-17 en EII leve a severa. Así, IL-17E puede servir como un marcador para  
25 esta enfermedad inflamatoria.

EJEMPLO 32

Expresión de IL-17D en el modelo de ratón de infarto

30 Se examinó la expresión de IL-17D (DNA173894-2947) en un modelo experimental murino de infarto. La arteria carótida común derecha (RCCA) de C57B1/6 ratones machos fue aislado a través de una incisión de línea media. Una atadura floja fue colocada alrededor del vaso. La arteria cerebral media (ACM) se visualizó mediante la formación de una ventana craneal en el cráneo a nivel del canal olfativo. En el momento determinado, el MCA y el RCCA se ocluyeron  
35 durante un período de isquemia de 45 minutos con 6-0 y 11-0 de sutura, respectivamente. Después de este ataque isquémico, las suturas RCCA y MCA se desataron para permitir la perfusión del territorio de MCA. La expresión relativa de IL-17D fue determinada por PCR cuantitativa (Taqman™) usando ARN aislado del córtex isquémico en cinco puntos de tiempo después de la perfusión (3, 6, 12, 24 y 72 horas) y se compara con la expresión de IL-17D observado en el ARN aislado de control sin el tejido isquémico. La Figura 45 muestra los resultados de este estudio.  
40 Como se muestra, la expresión de IL-17D disminuye rápidamente después del infarto cerebrovascular cuando se examina en los cinco puntos de tiempo representados.

EJEMPLO 33

Micromatriz de análisis para detectar la sobreexpresión de polipéptidos PRO en tumores cancerosos

45 Las micromatrices de ácido nucleico, que a menudo contienen miles de secuencias genéticas, son útiles para la identificación de genes expresados diferencialmente en los tejidos enfermos, en comparación con sus partes opuestas normales. Se usan las micromatrices de ácido nucleico, muestras de prueba y control de ARNm para pruebas y las  
50 muestras de tejido de control se transcriben de manera inversa y se etiquetan para generar las sondas de ADNc. Las sondas de ADNc se hibridan entonces a una serie de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. La matriz está configurada de tal manera que la secuencia y la posición de cada elemento de la matriz son conocidas. Por ejemplo, una selección de genes que son expresados en ciertos estados patológicos puede estar dispuesta sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un elemento de la matriz en particular indica que la muestra  
55 de la que se deriva la sonda expresa ese gen. Si la señal de hibridación de una sonda de una muestra de control (tejido enfermo) es mayor que la señal de hibridación de una sonda de un una muestra de control (tejido normal), el gen o los genes sobreexpresados en el tejido de la enfermedad son identificados. La implicación de este resultado es que una sobreexpresión de la proteína en un tejido enfermo no sólo es útil como marcador de diagnóstico para detectar la presencia de la condición de la enfermedad, sino también como un objetivo terapéutico para el tratamiento de la  
60 condición de la enfermedad.

La metodología de la hibridación de ácidos nucleicos y la tecnología de micromatrices es bien conocida en la técnica. En el presente ejemplo, la preparación específica de los ácidos nucleicos de hibridación y las sondas, portaobjetos, y las condiciones de hibridación se detalla en WO01/75166.

65 En el presente ejemplo, los tumores cancerosos derivados de diversos tejidos humanos fueron estudiados por la

expresión génica que codifica polipéptidos PRO en relación con tejidos humanos no cancerosos en un intento por identificar los polipéptidos PRO que se sobreexpresan en los tumores cancerosos. Se generaron dos grupos de datos experimentales. En un grupo, se obtuvieron tejido del tumor canceroso del colon humano y tejido de tumor no canceroso de colon humano del mismo paciente ("control de colon correspondiente") y se analizó la expresión de polipéptido PRO utilizando la tecnología de micromatrices descrita anteriormente. En el segundo grupo de datos, el tejido de tumor canceroso humano de cualquiera de una variedad de tumores humanos se obtuvo y se comparó con una muestra de control epitelial "universal" que fue preparada mediante la agrupación de tejidos humanos no cancerosos de origen epitelial, incluyendo hígado, riñón, y pulmón. El ARNm aislado de los tejidos combinados representa una mezcla de productos génicos expresados de estos tejidos diferentes. Experimentos de hibridación de micromatrices usando las muestras de control agrupadas generaron una representación lineal en un análisis de 2 colores. La pendiente de la línea generada en un análisis de 2 colores se utilizó a continuación para normalizar las proporciones de (detección de prueba: control) en cada experimento. Las proporciones normalizadas de diversos experimentos se compararon a continuación y se utilizaron para identificar la agrupación de la expresión génica. De este modo, la muestra combinada de "control universal" no sólo permitió la determinación efectiva de la expresión génica relativa en una comparación simple de 2 muestras, sino que también permitía la comparación de múltiples muestras a través de varios experimentos.

En los presentes experimentos, las sondas de ácido nucleico derivadas de las secuencias de ácido nucleicos que codifican el polipéptido PRO aquí descritas se utilizaron en la creación de micromatrices y se utilizó ARN de los tejidos tumorales mencionados anteriormente para la hibridación de los mismos. Se designó un valor basado en la proporción normalizada: proporción experimental como "proporción corte". Sólo los valores que estaban por encima de esta proporción de corte se determinaron que eran importantes. La tabla 7 presenta los resultados de estos experimentos, demostrando que los diversos polipéptidos PRO del presente documento están significativamente sobreexpresados en diversos tejidos tumorales humanos en comparación con un tejido de control humano no canceroso. Tal como se describió anteriormente, estos datos demuestran que los polipéptidos PRO del presente documento son útiles no sólo como marcadores de diagnóstico para detectar la presencia de uno o más tumores cancerosos, sino que también sirven como dianas terapéuticas para el tratamiento de estos tumores.

Tabla 7

Molécula	Se sobreexpresa en:	Comparado con:
PRO1031	tumor de pulmón	control normal universal
PRO1122	tumor de mama	control normal universal
PRO1122	tumor de pulmón	control normal universal
PRO5801	tumor de colon	control normal universal
PRO21175	tumor de mama	control normal universal
PRO21175	tumor de colon	control normal universal
PRO21175	tumor de pulmón	control normal universal

Depósito de material

El siguiente material ha sido depositado en la American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Material	ATCC Dip. No.	Fecha de depósito
DNA59294-1381	209866	14 de mayo 1998
DNA62377-1381-1	203552	22 de diciembre 1998
DNA147531-2821	PTA-1185	11 de enero 2000
DNA173894-2947	PTA-2108	20 de junio 2000
DNA115291-2681	PTA-202	8 de junio 1999
DNA164625-2890	PTA-1535	21 de marzo 2000
DNA 119502-2789	PTA-1082	22 de diciembre 1999
DNA154095-2998	PTA-2591	10 de octubre 2000

Estos depósitos se hicieron en virtud de las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en materia de Patentes y su Reglamento (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable de la solicitud durante 30 años a partir de la fecha de solicitud. Los depósitos estarán disponibles por ATCC en los términos del Tratado de Budapest, y con sujeción

5 a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y sin restricciones de la descendencia del cultivo de los depósitos al público, previa publicación de las patentes de los EE.UU. o en el momento pertinente por el que se publican en los EE.UU. o la solicitud de patentes extranjeras, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a alguien determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas de EE.UU. que tenga derecho a las mismas de acuerdo con 35 USC § 122 y las normas del Comisionado en virtud del mismo (incluyendo 37 CFR § 1.14, con especial referencia a 886 OG 638).

10 El titular de la presente solicitud ha acordado que si el cultivo de los materiales en depósito deben morir o ser perdidos o destruidos, cuando se cultive en condiciones adecuadas, el material será inmediatamente reemplazado por otro bajo notificación de la misma. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para la práctica de la invención, en contra de los derechos concedidos bajo la autoridad de un gobierno de conformidad con sus leyes de patentes.

15 La memoria descrita anteriormente se considera suficiente para que un experto en la materia ponga en la práctica la invención. La presente invención no se limita en su alcance por la construcción de depósito, ya que la realización depositada está concebida como una sola ilustración de ciertos aspectos de la invención y otras realizaciones que son funcionalmente equivalentes en el ámbito de la presente invención. El depósito del material en este documento no constituye una admisión de que la descripción escrita aquí contenida es insuficiente para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni tampoco se interpretará como una limitación del alcance de las reivindicaciones a los ejemplos específicos que representa.

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Anticuerpo antagonista aislado que se une a un polipéptido IL-17E (PRO10272) (a) que consiste en los aminoácidos 1 a 177 o los aminoácidos 33 a 177 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 6, o (b) está codificado por la secuencia codificante de longitud completa del ADNc (DNA 147531-2821) depositado bajo el número de acceso ATCC PTA-1185, y que:
- 10 (i) bloquea la unión de dicho polipéptido IL-17E al polipéptido IL-17RH1 (PRO5801) de la figura 12; y/o  
(ii) inhibe la actividad de IL-17E para estimular la producción de IL-8 en células TK-10; y/o  
(iii) inhibe la actividad de IL-17E para activar NF- $\kappa$ B en células 293 y/o células TK-10.
- 15 2. Anticuerpo, según la reivindicación 1, en el que la unión de IL-17E a IL-17RH1 se analiza mediante la unión de la proteína de fusión IL-17E-Fc a células que expresan IL-17RH1 o al dominio extracelular de IL-17RH1 marcado con epítipo de His y/o la activación de NF- $\kappa$ B se analiza utilizando un gen reportero de luciferasa sensible a NF- $\kappa$ B.
3. Anticuerpo, según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo se une a un polipéptido IL-17E que consiste en los aminoácidos 33 a 177 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 6.
4. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es un anticuerpo monoclonal.
- 20 5. Anticuerpo, según la reivindicación 4, que es un anticuerpo quimérico.
6. Anticuerpo, según la reivindicación 4, que es un anticuerpo humanizado.
7. Anticuerpo, según la reivindicación 4, que es un anticuerpo humano.
- 25 8. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que es un anticuerpo monovalente.
9. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, que es un fragmento Fab, Fab', Fv o F(ab')<sub>2</sub>.
- 30 10. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, que está marcado.
11. Anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, que se puede fabricar a partir de una célula huésped recombinante seleccionada del grupo que consiste en células COS de simio, células CHO o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina.
- 35 12. Composición que comprende el anticuerpo, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 13. Anticuerpo o composición, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para utilizar en un procedimiento de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
14. Anticuerpo o composición, según la reivindicación 13, para utilizar en un procedimiento de tratamiento de una enfermedad articular degenerativa.
- 45 15. Anticuerpo o composición, según la reivindicación 14, en los que dicha enfermedad articular degenerativa es osteoartritis o artritis psoriásica.

**FIGURA 1**

AGGCGGGCAGCAGCTGCAGGCTGACCTTGCAGCTTGGCGGAATGGACTGGCCTCACAACTGCTGTTTCTT  
CTTACCATTTCCATCTTCTGGGGCTGGGCCAGCCCAGGAGCCCCAAAAGCAAGAGGAAGGGGCAAGGGCG  
GCCTGGGCCCCTGGCCCCTGGCCCTCACCAGGTGCCACTGGACCTGGTGTACGGATGAAACCGTATGCC  
GCATGGAGGAGTATGAGAGGAACATCGAGGAGATGGTGGCCAGCTGAGGAACAGCTCAGAGCTGGCCCAG  
AGAAAGTGTGAGGTCAACTTGCAGCTGTGGATGTCCAACAAGAGGAGCCTGTCTCCCTGGGGCTACAGCAT  
CAACCACGACCCCAGCCGTATCCCCGTGGACCTGCCGGAGGCACGGTGCCTGTGTCTGGGCTGTGTGAACC  
CCTTCACCATGCAGGAGGACCGCAGCATGGTGAGCGTGCCGGTGTTCAGCCAGGTTCCCTGTGCGCCGCCG  
CTCTGCCCGCCACCGCCCCGCACAGGGCCTTGCCGCCAGCGCGAGTCATGGAGACCATCGCTGTGGGCTG  
CACCTGCATCTTCTGAATCACCTGGCCCAGAAGCCAGGCCAGCAGCCCCGAGACCATCCTCCTTGACCTTT  
GTGCCAAGAAAGGCCTATGAAAAGTAAACACTGACTTTTGAAGCAAG

**FIGURA 2**

MDWPHNLLFLLTISIFLGLGQPRSEPKSKRKGQGRPGPLAPGPHQVPLDLVSRMKPYARMEEYERNIEEMVA  
QLRNSSELAQRKCEVNLQLWMSNKRSLSPWGYSINHDPRI PVDLPEARCLCLGCVNPFMTQEDRSMVSVP  
VFSQVPVRRRLCPPPRTGPCRQRAVMETIAVGCTCIF

**FIGURA 3**

GCCAGGTGTGCAGGCCGCTCCAAGCCCAGCCTGCCCGCTGCCGCCACCATGACGCTCCTCCCCGGCCTCC  
TGTTTCTGACCTGGCTGCACACATGCCTGGCCCACCATGACCCCTCCCTCAGGGGGCACCCCCACAGTCAC  
GGTACCCACACTGCTACTCGGCTGAGGAACTGCCCTCGGCCAGGCCCCCCCACACCTGCTGGCTCGAGG  
TGCCAAGTGGGGGCAGGCTTTGCCTGTAGCCCTGGTGTCCAGCCTGGAGGCAGCAAGCCACAGGGGGAGGC  
ACGAGAGGCCCTCAGCTACGACCCAGTGCCCGGTGCTGCGGCCGGAGGAGGTGTTGGAGGCAGACCCCCAC  
CAGCGCTCCATCTCACCTGGAGATACCGTGTGGACACGGATGAGGACCGCTATCCACAGAAGCTGGCCTT  
CGCCGAGTGCCTGTGCAGAGGCTGTATCGATGCACGGACGGGCCGCGAGACAGCTGCGCTCAACTCCGTGC  
GGCTGCTCCAGAGCCTGCTGGTGTGCGCCGCCGGCCCTGCTCCC GCGACGGCTCGGGGCTCCCCACACCT  
GGGGCCTTTGCCTTCCACACCGAGTTCATCCACGTCCCGTCGGCTGCACCTGCGTGCTGCCCCGTT CAGT  
GTGACCGCCGAGGCCGTGGGGCCCTAGACTGGACACGTGTGCTCCCCAGAGGGCACCCCCTATTTATGTG  
TATTTATTGTTATTTATATGCCTCCCCAACACTACCCTTGGGGTCTGGGCATTCCCCGTGCTGGAGGAC  
AGCCCCCACTGTTCTCCTCATCTCCAGCCTCAGTAGTTGGGGGTAGAAGGAGCTCAGCACCTCTCCAGC  
CCTTAAAGCTGCAGAAAAGGTGTCACACGGCTGCCTGTACCTTGGCTCCCTGTCTGCTCCCGGCTTCCCT  
TACCCTATCACTGGCCTCAGGCCCGCAGGCTGCCTCTCCCAACCTCCTTGAAGTACCCCTGTTTCTTA  
ACAATTATTTAAGTGTACGTGATTATTAACTGATGAACACATCCCCAAAA

FIGURA 4

MTLLPGLLFLTWLHTCLAHHDPSLRGHPHSHGTPHCYSAEELPLGQAPPHELLARGAKWGQALPVALVSSLE  
AASHRGRHERPSATTQCPVLRPEEVLEADTHQRSISPWRYRVDTDEDRYPQKLAFAECLCRGCIDARTGRE  
TAALNSVRLQLSLLVLRRRPCSRDGSGLPTPGAFAFHTEFIHVVPVGCTCVLPRSV

Péptido de señal:	Aminoácidos 1-18
Sitio de fosforilación de quinasa tirosina:	Aminoácidos 112-121
Sitios de N-miristoilación:	Aminoácidos 32-38; 55-61; 133-139
Patrón de cremallera de leucina:	Aminoácidos 3-25
Región homóloga a IL-17:	Aminoácidos 99-195

**FIGURA 5**

GGCTTGCTGAAAATAAAATCAGGACTCCTAACCTGCTCCAGTCAGCCTGCTTCCACGAGGCCTGTCAGTCA  
 GTGCCCGACTTGTGACTGAGTGTGCAGTGCCCAGCATGTACCAGGTGAGTGCAGAGGGCTGCCTGAGGGCT  
 GTGCTGAGAGGGAGAGGAGCAGAGATGCTGCTGAGGGTGGAGGGAGGCCAAGCTGCCAGGTTTGGGGCTGG  
 GGGCCAAGTGGAGTGAGAACTGGGATCCCAGGGGGAGGGTGCAGATGAGGGAGCGACCCAGATTAGGTGA  
 GGACAGTTCTCTCATTAGCCTTTTCCCTACAGGTGGTTGCATTCTTGGCAATGGTCATGGGAACCCACACCT  
 ACAGCCACTGGCCAGCTGCTGCCCCAGCAAAGGGCAGGACACCTCTGAGGAGCTGCTGAGGTGGAGCACT  
 GTGCCTGTGCCTCCCCTAGAGCCTGCTAGGCCCAACCGCCACCCAGAGTCTGTAGGGCCAGTGAAGATGGA  
 CCCCTCAACAGCAGGGCCATCTCCCCCTGGAGATATGAGTTGGACAGAGACTTGAACCGGCTCCCCAGGA  
 CCTGTACCACGCCCGTTGCCTGTGCCCGCACTGCGTCAGCCTACAGACAGGCTCCACATGGACCCCCGGG  
 GCAACTCGGAGCTGCTCTACCACAACCAGACTGTCTTCTACAGCGGCCATGCCATGGCGAGAAGGGCACC  
 CACAAGGGCTACTGCCTGGAGCGCAGGCTGTACCGTGTTCCTTAGCTTGTGTGTGTGTGCGGCCCGTGT  
 GATGGGCTAGCCGGACCTGCTGGAGGCTGGTCCCTTTTTGGGAAACCTGGAGCCAGGTGTACAACCACTTG  
 CCATGAAGGGCCAGGATGCCAGATGCTTGGCCCTGTGAAGTGTGTCTGGAGCAGCAGGATCCCGGGAC  
 AGGATGGGGGGCTTTGGGGAAAACCTGCACTTCTGCACATTTTAAAAGAGCAGCTGCTGCTTAGGGCCGC  
 CGGAAGCTGGTGTCTCATTCTCTCAGGAAAGGTTTCAAAGTCTGCCATTTCTGGAGGCCACCA  
 CTCCTGTCTCTTCCCTTTTCCCATCCCCTGCTACCCTGGCCAGCACAGGCACTTCTAGATATTTCCCC  
 CTGCTGGAGAAGAAAGAGCCCCTGGTTTTATTGTTGTTTACTCATCACTCAGTGAGCATCTACTTTGG  
 GTGCATTCTAGTGTAGTTACTAGTCTTTTGACATGGATGATTCTGAGGAGGAAGCTGTTATTGAATGTATA  
 GAGATTTATCAAATAAATATCTTTATTTAAAAATGAAAAA

FIGURA 6

MRERPRLGEDSSLISLFLQVVAFLAMVMGHTYSHWPSCCPSKGQDTSEELLRWSTVPVPPLEPARPNRHP  
ESCRASEDGPLNSRAISPWRYELDRDLNRLPQDLYHARCLCPHCVSLQTGSHMDPRGNSELLYHNQTVFYR  
RPCHGEKGTHTKGYCLERRLYRVSLACVCVRPRVMG

Péptido de señal:	Aminoácidos 1-32
Sitio de N-glicosilación:	Aminoácidos 136-140
Sitio de fosforilación tirosina quinasa:	Aminoácidos 127-135
Sitios N-miristoilación:	Aminoácidos 44-50;150-156

**FIGURA 7**

**ATGCTGGTAGCCGGCTTCCTGCTGGCGCTGCCGCCGAGCTGGGCCGCGGGCGCCCCAGGGCGGGCAGGCG**  
 CCCC GCGCGGCCGCGGGGCTGCGCGGACCGGCCGGAGGAGCTACTGGAGCAGCTGTACGGGCGCCTGGCGG  
 CCGCGTGTCTAGTGCCTTCCACCACACGCTGCAGCTGGGGCCGCGTGAGCAGGCGCGCAACGCGAGCTGC  
 CCGCAGGGGGCAGGCCCGGCGACCGCCGCTTCCGGCCGCCACCAACCTGCGCAGCGTGTGCCCCGGGC  
 CTACAGAATCTCCTACGACCCGGGAGGTACCCAGGTACCTGCCTGAAGCCTACTGCCTGTGCCGGGGCT  
 GCCTGACCGGGCTGTTCCGGCAGGAGGACGTGCGCTTCCGCAGCGCCCCTGTCTACATGCCACCCTCGTC  
 CTGCGCCGACCCCCGCTGCGCCGGCGGCGGTTCCGTCTACACCGAGGCCTACGTCACCATCCCCGTGGG  
 CTGCACCTGCGTCCCCGAGCCGAGAAGGACGCAGACAGCATCAACTCCAGCATCGACAAACAGGGCGCCA  
 AGTCTCTGCTGGGCCCAACGACGCGCCCGCTGGCCCCCTGAGGCCGGTCTGCCCGGGAGGTCTCCCCGG  
 CCCGATCCCGAGGCGCCAAGCTGGAGCCGCTGGAGGGCTCGGTGCGCGACCTCTGAAGAGAGTGCACC  
 GAGCAAACCAAGTGCCGGAGCACCAGCGCCGCTTTCATGGAGACTCGTAAGCAGCTTCATCTGACACGG  
 GCATCCCTGGCTTGCTTTTAGCTACAAGCAAGCAGCGTGGCTGGAAGCTGATGGGAAACGACCCGGCACGG  
 GCATCCTGTGTGCGGCCGCATGGAGGGTTTGAAAAGTTCACGGAGGCTCCCTGAGGAGCCTCTCAGATC  
 GGCTGCTGCGGGTGCAGGGCGTGACTCACCGCTGGGTGCTTGCCAAAGAGATAGGGACGCATATGCTTTTT  
 AAAGCAATCTAAAAATAATAAAGTATAGCGACTATATACCTACTTTTTAAATCAACTGTTTTGAATAGA  
 GGCAGAGCTATTTTATATTATCAAATGAGAGCTACTCTGTTACATTTCTTAACATATAAACATCGTTTTTT  
 ACTTCTTCTGGTAGAATTTTTAAAGCATAATTGGAATCCTTGGATAAATTTGTAGCTGGTACACTCTGG  
 CCTGGGTCTCTGAATTCAGCCTGTCACCGATGGCTGACTGATGAAATGGACACGTCTCATCTGACCCACTC  
 TTCCTTCCACTGAAGTCTTTCACGGCCCTCCAGGTGGACCAAAGGGATGCACAGGCGGCTCGCATGCCCCA  
 GGGCCAGCTAAGAGTTCCAAAGATCTCAGATTTGGTTTTAGTCATGAATACATAAACAGTCTCAAACCTCGC  
 ACAATTTTTTCCCCCTTTTGAAAGCCACTGGGGCCAATTTGTGGTTAAGAGGTGGTGAAGAGTGGGA  
 ACGTGACATCTTTGCCAGTTGTGAGAAGAATCCAAGCAGGTATTGGCTTAGTTGTAAGGGCTTTAGGATCA  
 GGCTGAATATGAGGACAAAGTGGGCCACGTTAGCATCTGCAGAGATCAATCTGGAGGCTTCTGTTTCTGCA  
 TTCTGCCACGAGAGCTAGGTCCTTGATCTTTTCTTTAGATTGAAAGTCTGTCTCTGAACACAATTATTTGT  
 AAAAGTTAGTAGTTCTTTTTTAAATCATTAAAAGAGGCTTGTGAAGGAT

FIGURA 8

MLVAGFLLALPPSWAAGAPRAGRPRPARPRGCADRPEELLEQLYGRLAGVLSAFHHTLQLGPREQARNASC  
PAGGRPGDRRFRPPTNLRVSPWAYRISYDPARYPRYLPEAYCLCRGCLTGLFGEEDVRFERSAPVYMPTVV  
LRRT PACAGGRSVYTEAYVTIPVGCTCVPEPEKDADSINSSIDKQGAKLLLGPNDA P A G P

Péptido de señal:	Aminoácidos 1-15
Sitios de N-glicosilación:	Aminoácidos 68-72;181-185
Sitio de fosforilación tirosina quinasa:	Aminoácidos 97-106
Sitios de N-miristoilación:	Aminoácidos 17-23;49-55;74-80; 118-124
Sitio de amidación:	Aminoácidos 21-25

**FIGURA 9**

CAACTGCACCTCGGTTCTATCGATAGCCACCAGCGCAACATGCAGTGAAGACCCTGCATGGCCCAGCCAT  
GGTCAAGTACTTGCTGCTGTCGATATTGGGGCTTGCCCTTTCTGAGTGAGGCGGCAGCTCGGAAAATCCCCA  
AAGTAGGACATACTTTTTTCCAAAAGCCTGAGAGTTGCCCGCCTGTGCCAGGAGGTAGTATGAAGCTTGAC  
ATTGGCATCATCAATGAAAACCAGCGGTTTCCATGTCACGTAACATCGAGAGCCGCTCCACCTCCCCCTG  
GAATTACACTGTCACTTGGGACCCCAACCGGTACCCTCGGAAGTTGTACAGGCCAGTGTAGGAACTTGG  
GCTGCATCAATGCTCAAGGAAAGGAAGACATCTCCATGAATTCGGTTCCCATCCAGCAAGAGACCCTGGTCGTC  
CGGAGGAAGCACCAAGGCTGCTCTGTTTCTTTCCAGTTGGAGAAGGTGCTGGTGACTGTTGGCTGCACCTG  
CGTCACCCCTGTATCCACCATGTGCAGTAAGAGGTGCATATCCACTCAGCTGAAGAAG

FIGURA 10

MTVKT LHGPAMVKYLLLSILGLAFLSEAAARKIPKVGHTFFQKPESCPPVPGGSMKLDIGIINENQRVSMS  
RNIESRSTSPWNYTWTWDPNRYPSEVVQAQCRNLGCINAQGKEDISMNSVPIQOETLVVRRKHQGCSVSFQ  
LEKVLVTVGCTCVTPVIHHVQ

Secuencia de señal:	Aminoácidos 1-30
Sitio de N-glicosilación:	Aminoácidos 83-86
Sitios de N-miristoilación:	Aminoácidos 106-111;136-141

FIGURA 11

CCGGCCATGTCGCTCGTGCTGCTAAGCCTGGCCGCGCTGTGCAGGAGCGCCGTACCCCGAGAGCCGACCGT  
 TCAATGTGGCTCTGAAACTGGGCCATCTCCAGAGTGGATGCTACAACATGATCTAATCCCCGGAGACTTGA  
 GGGACCTCCGAGTAGAACCTGTTACAAGTGTGCAACAGGGGACTATTCAATTTTGATGAATGTAAGC  
 TGGGTACTCCGGGCAGATGCCAGCATCCGCTTGTGGAAGGCCACCAAGATTTGTGTGACGGGCAAAAGCAA  
 CTTCCAGTCTACAGCTGTGTGAGGTGCAATTACACAGAGGCCTTCCAGACTCAGACCAGACCCTCTGGTG  
 GTAAATGGACATTTTCTACATCGGCTTCCCTGTAGAGCTGAACACAGTCTATTTTATTGGGGCCATAAT  
 ATTCTAATGCAAAATATGAATGAAGATGGCCCTTCCATGTCTGTGAATTTACCTCACCAGGCTGCCTAGA  
 CCACATAATGAAATATAAAAAAAGTGTGTCAAGGCCGAAGCCTGTGGGATCCGAACATCACTGCTTGTA  
 AGAAGAATGAGGAGACAGTAGAAGTGAAGTTCACAACCACTCCCCTGGGAAACAGATACATGGCTCTTATC  
 CAACACAGCACTATCATCGGGTTTTCTCAGGTGTTTGAGCCACACCAGAAGAAACAAACGCGAGCTTCAGT  
 GGTGATTCAGTGAAGTACTGGGGATAGTGAAGGTGCTACGGTGCAGCTGACTCCATATTTTCTACTTGTGGCA  
 GCGACTGCATCCGACATAAAGGAACAGTTGTGCTCTGCCACAAACAGGCGTCCCTTTCCCTCTGGATAAC  
 AACAAAAGCAAGCCGGGAGGCTGGCTGCCTCTCCTCTGCTGTCTCTGCTGGTGGCCACATGGGTGCTGGT  
 GGCAGGGATCTATCTAATGTGGAGGCACGAAAGGATCAAGAAGACTTCCTTTTCTACCACCACACTACTGC  
 CCCCATTAAGGTCTTGTGGTTTTACCCATCTGAAATATGTTTCCATCACACAATTTGTTACTTCACTGAA  
 TTTCTTCAAACCATTCAGAAAGTGAAGTGCATCCTTGAAGTGGCAGAAAAAGAAAATAGCAGAGATGGG  
 TCCAGTGCAGTGGCTTGCCTCAAAGAAGGCAGCAGACAAAGTCTTCTTCTTTCCAATGACGTCA  
 ACAGTGTGTGCGATGGTACCTGTGGCAAGAGCGAGGGCAGTCCCAGTGAGAACTCTCAAGACCTCTCCCC  
 CTTGCCTTTAACCTTTTCTGCAGTGAATCAAGAAGCCAGATTCTGACAAAATACGTGGTGGTCTACTT  
 TAGAGAGATTGATACAAAAGACGATTACAATGCTCTCAGTGTCTGCCCAAGTACCACCTCATGAAGGATG  
 CCACTGCTTTCTGTGCAGAACTTCTCCATGTCAAGCAGCAGGTGTGAGCAGGAAAAGATCACAAGCCTGC  
 CACGATGGCTGCTGCTCCTTGTAG

FIGURA 12

MSLVLLSLAALCRSAVPREPTVQCGSETGPSPEWMLQHDLI PGDLRDLRVEPVTT SVATGDYSILMNVS  
 WLRADASIRLLKATKICVTKGSNFQSYSCVRCNYTEAFQTQTRPSGGKWTFSYIGFPVELNTVYFIGAHNIP  
 NANMNEDGPSMSVNFTSPGCLDHIMKYKKKCVKAGSLWDPNITACKKNEETVEVNFTTTPLGNYMALIQH  
 STIIGFSQVFEHPHQKQTRASVVIPVTGDSEGATVQLTPYFPPTCGSDCIRHKGTVVLCQPQTGVVPLDNNK  
 SKPGGWLPLLLSLLVATWVLVAGIYLMWRHERIKKTSFSTTTLLPPIKVLVVPSEICFHHTICYFTEFL  
 QNHCRSEVILEKWQKKIAEMGPVQWLATQKKAADKVVFLSNDVNSVCDGTCGKSEGPSSENSQDLFPLA  
 FNLFCSDLRSQIHLHKYVVVYFREIDTKDDYNALSVCPKYHLMKDATAFCAELLHVKQQVVSAGKRSQACHD  
 GCCSL

Secuencia de señal:	Aminoácidos 1-14
Dominio transmembrana:	Aminoácidos 290-309
Sitios N-glicosilación:	Aminoácidos 67-70;103-106;156-159; 183-186;197-200;283-286
Sitio de fosforilación de proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP:	Aminoácidos 228-231;319-322
Sitio de N-miristoilación:	Aminoácidos 116-121
Sitio de amidación:	Aminoácidos 488-491

FIGURA 13

AACTGGCCAAACAAAAACGAAAGCACTCCGTGCTGGAAGTAGGAGGAGAGTCAGGACTCCCAGGACAGAG  
 AGTGACAAACTACCCAGCACAGCCCCCTCCGCCCCCTCTGGAGGCTGAAGAGGGATTCCAGCCCCTGCCA  
 CCCACAGACACGGGCTGACTGGGGTGTCTGCCCCCTTGGGGGGGGCAGCACAGGGCCTCAGGCCTGGGT  
 GCCACCTGGCACCTAGAAGATGCTGTGCCCTGGTTCTTGCTGTCTTGGCACTGGGCCGAAGCCCAGTGG  
 TCCTTTCTCTGGAGAGGCTTGTGGGGCCTCAGGACGCTACCCACTGCTCTCCGGGCCTCTCCTGCCGCTC  
 TGGGACAGTGACATACTCTGCCTGCCTGGGGACATCGTGCTGCTCCGGGCCCGTGCTGGCGCCTACGCA  
 CCTGCAGACAGAGCTGGTGTGAGGTGCCAGAAGGAGACCGACTGTGACCTCTGTCTGCGTGTGGCTGTCC  
 ACTTGGCCGTGCATGGGCACTGGGAAGAGCCTGAAGATGAGGAAAAGTTTGGAGGAGCAGCTGACTCAGGG  
 GTGGAGGAGCCTAGGAATGCCTCTCTCCAGGCCAAGTCGTGCTCTCCTTCCAGGCCTACCTACTGCCCG  
 CTGCGTCTGCTGGAGGTGCAAGTGCCTGCTGCCCTTGTGCAAGTTGGTCACTGTGGGCTCTGTGGTATAT  
 GACTGCTTCGAGGCTGCCCTAGGGAGTGAGGTACGAATCTGGTCTATACTCAGCCCAGGTACGAGAAGGA  
 ACTCAACCACACACAGCAGCTGCCTGCCCTGCCCTGGCTCAACGTGTCAGCAGATGGTGACAACGTGCATC  
 TGGTTCTGAATGTCTCTGAGGAGCAGCACTTCGGCCTCTCCCTGTACTGGAATCAGGTCCAGGGCCCCCA  
 AAACCCCGTGGCACAAAACTGACTGGACCGCAGATCATTACCTTGAACCACACAGACCTGGTTCCCTG  
 CCTCTGTATTAGGTGTGGCCTCTGGAACCTGACTCCGTTAGGACGAACATCTGCCCTTCCAGGGAGGACC  
 CCCGCGCACACCAGAACCTCTGGCAAGCCGCCGACTGCGACTGCTGACCCTGCAGAGCTGGCTGCTGGAC  
 GCACCGTGTCTGCTGCCCGCAGAAGCGGCACTGTGCTGGCGGGCTCCGGGTGGGGACCCCTGCCAGCCACT  
 GGTCCCACCGCTTTCTGGGAGAACGTCACTGTGGACAAGGTTCTCGAGTTCCCATGCTGAAAGGCCACC  
 CTAACCTCTGTGTTAGGTGAACAGCTCGGAGAAGCTGCAGCTGCAGGAGTGTGTTGGGCTGACTCCCTG  
 GGGCTCTCAAAGACGATGTGCTACTGTTGGAGACACGAGGCCCCAGGACAACAGATCCCTCTGTGCCTT  
 GGAACCCAGTGGCTGTACTTCACTACCCAGCAAAGCCTCCACGAGGGCAGCTCGCCTTGGAGAGTACTTAC  
 TACAAGACCTGCAGTCAGGCCAGTGTCTGCAGCTATGGGACGATGACTTGGGAGCGCTATGGGCCTGCCCC  
 ATGGACAAATACATCCACAAGCGCTGGGCCCTCGTGTGGCTGGCCTGCCTACTCTTGGCGCTGCGCTTTC  
 CCTCATCCTCCTTCTCAAAAAGGATCACGCGAAAGGGTGGCTGAGGCTCTTGAACAGGACGTCGCGCTCGG  
 GGGCGGCCGCCAGGGGCCGCGGGCTCTGCTCCTCTACTCAGCCGATGACTCGGGTTTCGAGCGCTGGTG  
 GCGCCCTGGCGTCCGCCCTGTGCCAGCTGCCGCTGCGCGTGGCCGTAGACCTGTGGAGCCGTCGTGAACT  
 GAGCGCGCAGGGGCCCGTGGCTTGGTTTACGCGCAGCGCGCCAGACCCTGCAGGAGGGCGGCGTGGTGG  
 TCTTGCTCTTCTCTCCGGTGCCTGGCGCTGTGCAGCGAGTGGCTACAGGATGGGGTGTCCGGGCCCGGG  
 GCGCACGGCCCCGACGACGCTTCCGCGCCTCGCTCAGCTGCGTGTGCCGACTTCTTGCAGGGCCGGGC  
 GCCCGCAGCTACGTGGGGCCTGCTTCGACAGGCTGCTCCACCCGGACGCCGTACCCGCCCTTTCCGCA  
 CCGTGCCCGTCTTACACTGCCCTCCCAACTGCCAGACTTCCCTGGGGCCCTGCAGCAGCCTCGCGCCCCG  
 CGTCCGGGCGGCTCCAAGAGAGAGCGGAGCAAGTGTCCCGGCCCTTCCAGCCAGCCCTGGATAGCTACTT  
 CCATCCCCCGGGACTCCCGCGCCGGGACGCGGGGTGGGACCAGGGGCGGGACCTGGGGCGGGGACGGGA  
 CTTAAATAAAGGCAGACGCTGTTTTTCTAAAAAA

FIGURA 14

MPVPWFLLSLALGRSPVVLSLERLVGPQDATHCSPGLSCRLWSDILCLPGDIVPAPGPVLPAPTHLQTELV  
 LRCQKETDCDLCLRVAVHLAVHGHWEPEDEEKFGGAADSGVEEPRNASLQAQVVLSFQAYPTARCVLLEV  
 QVPAALVQFGQSVGSVVYDCFEAALGSEVRIWSYTPRYEKELNHTQQLPALPWLNVNSADGDNVHLVNLVS  
 EEQHFGLSLYWNQVQGPVKPRWHKNLTGPQIITLNHTDLVPCLCIQVWPLEPDSVRTNICPFREDPRAHQN  
 LWQAARLRLTLQSWLLDAPCSLPAEAALCWRAPGGDPCQPLVPPLSWENVTVDKVFLEFPLKGFHPNLCVQ  
 VNSSEKLQEQECLWADSLGPKDDVLLLETRGPQDNRSICALEPSGCTSLPSKASTRAARLGEYLLQDLQS  
 GQCLQLWDDDLGALWACPMKYIHKRWALVWLACLLFAAALSILLLLKGDHAKGWLRLKQDVRSAAAARG  
 RAALLYSADDSGFERLVGALASALCQLPLRVAVDLWSRRELSAQGPVAVFHAQRRQTLQEGGVVLLFSP  
 GAVALCSEWLQDGVSGPGAHGPHDAFRASLSCVLPDFLQGRAPGSYVGACFDRLHHPDAVPALFRTPVFT  
 LPSQLPDLGALQQPRAPRSGRLOERAEOVSRALQPALDSYFHPGTPAPGRGVGPGAGPGAGDGT

Secuencia de señal:	Aminoácidos 1-20
Dominio transmembrana:	Aminoácidos 453-473
Sitios de N-glicosilación:	Aminoácidos 118-121;186-189;198-201; 211-214;238-241;248-251;334-337; 357-360;391-394
Sitio de fijación de glicosaminoglicano:	Aminoácidos 583-586
Sitio de fosforilación de proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP:	Aminoácidos 552-555
Sitios de N-miristoilación:	Aminoácidos 107-112;152-157;319-324; 438-443;516-521;612-617;692-697; 696-701;700-705

FIGURA 15

CGAGGGCTCCTGCTGGTACTGTGTTTCGCTGCTGCACAGCAAGGCCCTGCCACCCACCTTCAGGCCATGCAG  
 CCATGTTCCGGGAGCCCTAATTGCACAGAAGCCCATGGGGAGCTCCAGACTGGCAGCCCTGCTCCTGCCTC  
 TCCTCCTCATAGTCATCGACCTCTCTGACTCTGCTGGGATTGGCTTTGCCACCTGCCCCACTGGAACACC  
 CGCTGTCTCTGGCCTCCACACGGATGACAGTTTCACTGGAAGTTCTGCCTATATCCCTTGCCGCACCTG  
 GTGGGCCCTCTTCTCCACAAAGCCTTGGTGTGTGCGAGTCTGGCACTGTTCCCGCTGTTTGTGCCAGCATCTGC  
 TGTCAGGTGGCTCAGGTCTTCAACGGGGCCTCTCCACCTCCTGGTGCAGAAATCCAAAAGTCTTCCACA  
 TTCAAGTTCTATAGGAGACACAAGATGCCAGCACCTGCTCAGAGGAAGCTGCTGCCTCGTCGTACCTGTC  
 TGAGAAGAGCCATCACATTTCCATCCCTCCCCAGACATCTCCACAAAGGGACTTCGCTCTAAAAGGACCC  
 AACCTTCGATCCAGAGACATGGGAAAGTCTTCCAGATTGGACTCACAAAGGCATGGAGGACCCGAGTTC  
 TCCTTTGATTTGCTGCCTGAGGCCCGGGCTATTCCGGGTGACCATATCTTCAGGCCCTGAGGTGAGCGTGGC  
 TCTTTGTCACCAGTGGCACTGGAGTGTGAAGAGCTGAGCAGTCCCTATGATGTCCAGAAAATTGTGTCTG  
 GGGCCACACTGTAGAGCTGCCTTATGAATTCTTCTGCCCTGTCTGTGCATAGAGGCATCCTACCTGCAA  
 GAGGACACTGTGAGGCGCAAAAATGTCCCTTCCAGAGCTGGCCAGAAGCCTATGGCTCGGACTTCTGGAA  
 GTCAGTGCACCTTCACTGACTACAGCCAGCACACTCAGATGGTCATGGCCCTGACACTCCGCTGCCCACTGA  
 AGCTGGAAGCTGCCCTCTGCCAGAGGCACGACTGGCATAACCTTTGCAAAGACCTCCCGAATGCCACGGCT  
 CGAGAGTCAGATGGGTGGTATGTTTTGGAGAAGGTGGACCTGCACCCCACTCTGCTTCAAGTTCTCTTT  
 TGGAAACAGCAGCCATGTTGAATGCCCCACAGACTGGGTCTCTCACATCCTGGAATGTAAGCATGGATA  
 CCAAGCCCAGCAGCTGATTCTTCACTTCTCCTCAAGAATGCATGCCACCTTCACTGCTGCCTGGAGCCTC  
 CCAGGCTTGGGGCAGGACACTTTGGTGCCCCCGTGTACACTGTGAGCCAGGCCCGGGGCTCAAGCCAGT  
 GTCACTAGACCTCATCATTCCCTTCCCTGAGGCCAGGGTGTGTGTCTGGTGTGGCGGTGAGATGTCCAGT  
 TTGCCTGGAAGCACCTCTTGTGTCCAGATGTCTTTACAGACACCTGGGGCTCTTGATCCTGGCACTGCTG  
 GCCCTCCTCACCCCTACTGGGTGTTGTTCTGGCCCTCACCTGCCGGCGCCACAGTCAGGCCCGGGCCAGC  
 GCGGCCAGTGCTCCTCCTGCACGCGGCGGACTCGGAGGCGCAGCGGCGCCTGGTGGGAGCGCTGGCTGAAC  
 TGCTACGGGCAGCGCTGGGCGGCGGGCGGACGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC  
 GGGCCCGCTGCCGTGGCTCTGGGCGGCGGACGCGCGTAGCGCGGGAGCAGGGCACTGTGCTGCTGCTGT  
 GGAGCGGCGCCGACCTTCGCCCGGTACGCGGCCCGACCCCCGCGCGCGCCCTGCTCGCCCTGCTCCAC  
 GCTGCCCCGCGCCCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
 GCTGCGCGCCCTGCCGCGCTACCGCTGCTGCGCGACCTGCCGCGTCTGCTGCGGGCGCTGGACGCGCGGC  
 CTTTCGAGAGGCCACCAGCTGGGGCCGCTTGGGGCGCGGACGCGAGGCAGAGCCGCTAGAGCTGTGC  
 AGCCGGCTTGAACGAGAGGCCCGCCGACTTGCAGACCTAGGTTGAGCAGAGCTCCACCGCAGTCCCGGGTGTCT

FIGURA 16

MGSSRLAALLLPLLLIVIDLSDSAGIGFRHLPHWNTRCPLASHTDDSTGSSAYIPCRTWWALFSTKPCWCV  
 RVWHCSRCLCQHLLSGGSLQRLFHLLVQKSKSSTFKFYRRHKMPAPAQRKLLPRRHLSEKSHHISIPS  
 PDISHKGLRSKRTQPSDPETWESLPRLDLQRHGGPEFSFDLLPEARAIRVTISSGPEVSVRLCHQWALECE  
 ELSSPYDVQKIVSGGHTVELPYEFLLPCLCIEASYLQEDTVRRKCPFQSWPEAYGSDFWKSVHFTDYSQH  
 TQVMVALTRCPLKLEAALCQRHDWHTLCKDLPNATARESDGWYVLEKVDLHPQLCFKFSFGNSSHVECPH  
 QTGSLTSWNVSMDTQAQQLILHFSSRMHATFSAAWSLPGLGQDTLVPPVYTVSQARGSSPVSLDLIIPFLR  
 PGCCVLVWRSDVQFAWKHLLCPDVSYRHLGLLILALLALLTLLGVVLALTCRRPQSGPGPARPVLLLHAAD  
 SEAQRRLVGALAEELLRAALGGGRDVIIDLWEGRHVARVGPLPWLWAARTRVAREQGTVLLWLGADLRPVS  
 GPDPRAPLLALLHAAPRPLLLLAYFSRLCAKGDIPPLRALPRYRLLRDLRLLRALDARPF AEATSWGR  
 LGARQRRQSRLELCSRLEREARLADLG

Péptido de señal:	Aminoácidos 1-23
Dominio transmembrana:	Aminoácidos 455-472
Sitios de N-glicosilación:	Aminoácidos 318-322;347-351;364-368
Sitio de fijación de glicosaminoglicano:	Aminoácidos 482-486
Sitios de fosforilación de proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP:	Aminoácidos 104-108;645-649
Sitio de fosforilación de tirosina quinasa:	Aminoácidos 322-329
Sitios de N-miristoilación:	Aminoácidos 90-96;358-364;470-476
Proteínas de unión con cobalamina eucariótica:	Aminoácidos 453-462

FIGURA 17

GCCAGGCCCTATCTCCCTGCCAGGAGGCCGGAGTGGGGGAGGTGAGACGGGGCGGTGGAGGGGGAGGGAT  
GCCACGCGCTTCTGCCTCAGGTGTTCTCGGTTGTTTGTGTCAGTGGAGAGCAGGGAGTGGGGCCAGCCAGCA  
GAAACAGTGGGCTGTACAACATCACCTTCAAATATGACAATTGTACCACCTACTTGAATCCAGTGGGGAAG  
CATGTGATTGCTGACGCCAGAATATCACCATCAGCCAGTATGCTTGCCATGACCAAGTGGCAGTACCAT  
TCTTTGGTCCCCAGGGGCCCTCGGCATCGAATTCCTGAAAGGATTTGCGGTAATACTGGAGGAGCTGAAGT  
CGGAGGGAAGACAGTGCCAACAACCTGATTCTAAAGGATCCGAAGCAGCTCAACAGTAGCTTCAAAGAACT  
GGAATGGAATCTCAACCTTCTGAAATATGAAATTTGAAACGGATTATTTGTAAGGTTGTCCCTTTTCC  
TTCCATTAATAACGAAAGCAATTACCACCCTTCTTCTTTAGAACCCGAGCCTGTGACCTGTTGTTACAGC  
CGGACAATCTAGCTTGTAACCTTCTGGAAGCCTCGGAACCTGAACATCAGCCAGCATGGCTCGGACATGC  
AGGTGTCTTCGACCACGCACCCGATGGCTCGGACATGCAGGTGTCTTCGACCACGCACCCGCACAACCTC  
GGCTTCCGTTTCTTCTATCTTCACTACAAGCTCAAGCAGGAAGGACCTTCAAGCGAAAGACCTGTAAGCA  
GGAGCAAACCTACAGAGATGACCAGTGCCTCCTTCAAATGTTTCTCCAGGGGATTATATAATTGAGCTGG  
TGGATGACACTAACACAACAAGAAAAGTGATGCATTATGCCTTAAAGCCAGTGCACCTCCCGTGGGCCGGG  
CCCATCAGAGCCGTGGCCATCACAGTGCCACTGGTAGTCATATCGGCATTTCGCGACGCTCTTCACTGTGAT  
GTGCCGCAAGAAGCAACAAGAAAATATATATTCACATTTAGATGAAGAGAGCTCTGAGTCTTCCACATACA  
CTGCAGCACTCCCAAGAGAGAGGCTCCGGCCGCGGCCGAAGGTCTTCTCTGCTATTCCAGTAAAGATGGC  
CAGAATCACATGAATGTCGTCCAGTGTTCGCTACTTCTCCAGGACTTCTGTGGCTGTGAGGTGGCTCT  
GGACCTGTGGGAAGACTTCAGCCTCTGTAGAGAAGGGCAGAGAGAATGGGTATCCAGAAGATCCACGAGT  
CCCAGTTCATCATTGTGGTTTGTTCAAAGGTATGAAGTACTTTGTGGACAAGAAGAACTACAAACACAAA  
GGAGGTGGCCGAGGCTCGGGGAAAGGAGAGCTTCTCCTGGTGGCGGTGTGAGCCATTGCCGAAAAGCTCCG  
CCAGGCCAAGCAGAGTTCGTCCGCGGCTCAGCAAGTTTATCGCCGTCTACTTTGATTATTCTTCCGAGG  
GAGACGTCCCCGGTATCCTAGACCTGAGTACCAAGTACAGACTCATGGACAATCTTCTCAGCTCTGTTC  
CACCTGCACTCCCAGACCACGGCCTCCAGGAGCCGGGGCAGCACACGCGACAGGGCAGCAGAAGGAACTA  
CTTCCGGAGCAAGTCAGGCCGGTCCCTATACGTGCGCATTGCAACATGCACCAGTTTATTGACGAGGAGC  
CCGACTGGTTCGAAAAGCAGTTCGTTCCCTTCCATCCTCCTCCACTGCGCTACCGGGAGCCAGTCTTGGAG  
AAATTTGATTGCGGCTTGGTTTAAATGATGTATGTGCAAACCAGGGCCTGAGAGTGACTTCTGCCTAAA  
GGTAGAGCGGCTGTTCTTGGGGCAACCGGACCAGCCGAGTCCCAGCACGAGAGTCAGCATGGGGGCTGG  
ACCAAGACGGGGAGGCCCGGCTGCCCTTGACGGTAGCGCCGCTGCAACCCCTGCTGCACACGGTGAAA  
GCCGGCAGCCCTCGGACATGCCGCGGACTCAGGCATCTATGACTCGTCTGTGCCCTCATCCGAGCTGTC  
TCTGCCACTGATGGAAGGACTCTCGACGGACCAGACAGAAACGTCTTCCCTGACGGAGAGCGTGTCTCTCT  
CTTCCAGGCTGGGTGAGGAGGAACCTCCTGCCCTTCTTCCAAGCTCCTCTCTTCTGGGTGATGCAAAGCA  
GATCTTGGTTGCCGACGTACACTGATGAACTCCACGCGGTGCCCCCTTGTAAACAAAACGAAAGAGTCTA  
AGCATTGCCACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

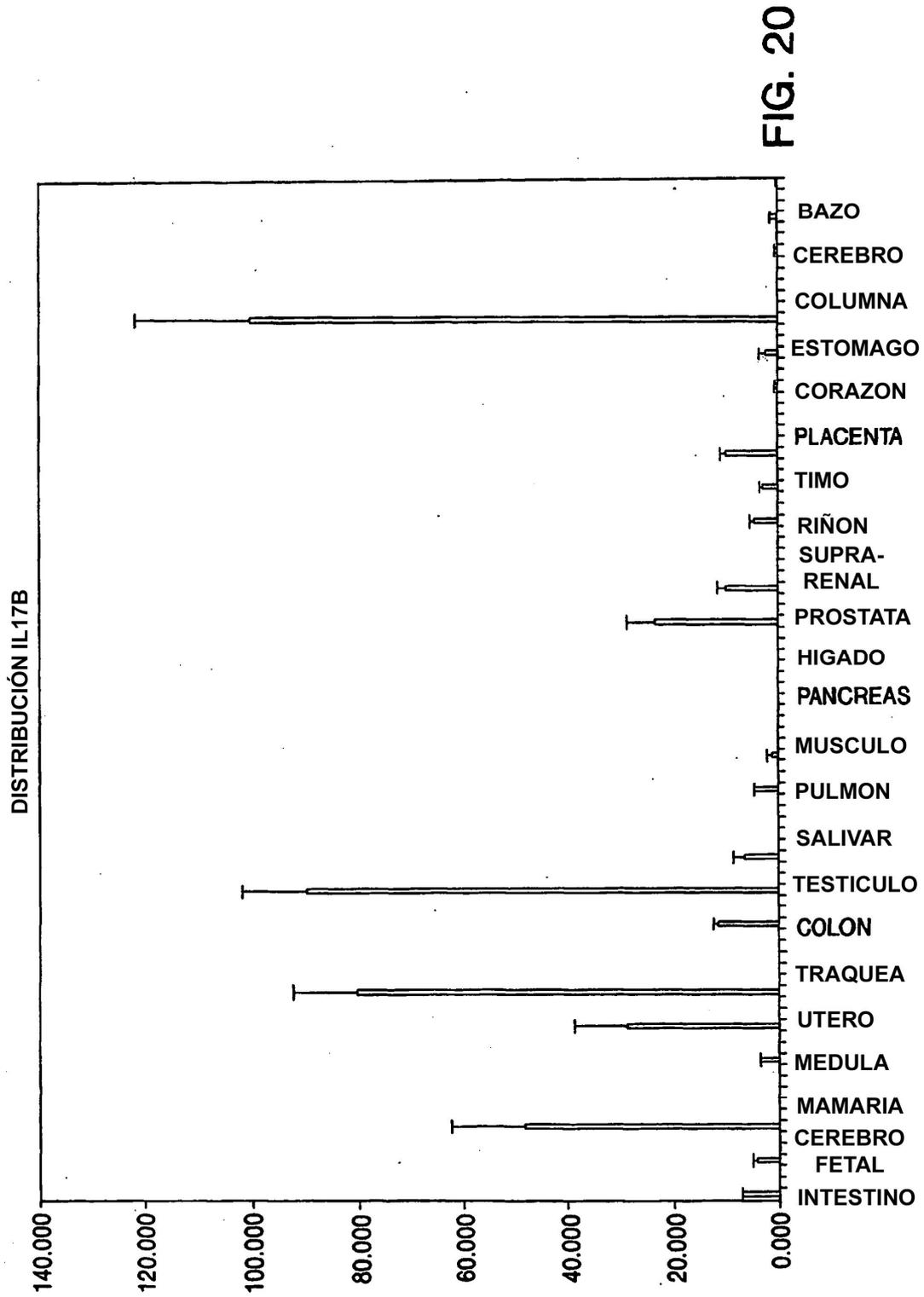
FIGURA 18

MPRASASGVPALFVSGEQVGPASRNSGLYNITFKYDNCTTYLNPVGKHVIADAQNITISQYACHDQVAVT  
 ILWSPGALGIEFLKGFVRVILEELKSEGRQCQQLILKDPKQLNSSFKRTGMESQFPLNMKFETDYFVKVVPF  
 PSIKNESNYHPFFFRTRACDLLLQPDNLACKPFWKPRNLNISQHGSDMQVSFDHAPHGSDMQVSFDHAPHN  
 FGFRFFYLHYKLKHEGPFKRKTKQEQTTEMTSCLLQNVSPGDYI IELVDDTNTTRKVMHYALKPVHSPWA  
 GPIRAVAITVPLVVISAFATLFTVMCRKKQENIYSHLDEESSESSTYTAALPRERLRPRPKVFLCYSSKD  
 GQNHMNVVQCFAYFLQDFCGCEVALDLWEDFSLCREGQREWVIQKI HESQFIIVVCSKGMKYFVDKKNYKH  
 KGGGRGSGKGELFLVAVSAIAEKLQAKQSSSAALS KFI AVYFDYSCEGDVPGILDSTKYRLMDNLPQLC  
 SHLHSRDHGLQEPGQHTRQGSRRNYFRSKSGRSLYVAICNMHQFIDEEPWFQKQFVFPFHPPPLRYREPVL  
 EKFD SGLVLNDVMCKPGPESDFCLKVEAAVLGATGPADSQHESQHGGLDQDGEARPALDGSAAALQPLLHTV  
 KAGSPSDMPRDSGIYDSSVPSSELSLPLMEGLSTDQTETSSLTESVSSSSGLGEEPPALPSKLLSSGSK  
 ADLGCRSYTDELHAVAPL

- Dominio transmembrana: Aminoácidos 283-307
- Sitios de N-glicosilación: Aminoácidos 31-34;38-41;56-59;  
 113-116;147-150;182-185;266-269
- Sitios de fijación de glicosaminoglicano: Aminoácidos 433-436;689-692
- Fosforilación de proteína quinasa dependiente de cAMP y cGMP:  
 Aminoácidos 232-235
- Sitios de fosforilación de tirosina quinasa: Aminoácidos 312-319;416-424
- Sitio de N-miristoilación: Aminoácidos 19-24;375-380;428-433;  
 429-434;432-437;517-522;574-579;  
 652-657;707-712

h-III17 1 ..... MTPGKTSLSL[L]LLSLEAIVKAGITIPR  
 h-III17B 1 .....MDWPHNLLFLLTISIFLGLGOPRSPKSKRKGQGR[P]GPLAPGGP  
 h-III17C 1 MTLPLGLLFLTCLAHHDPSLRGHPHSHGTPHCYSAEELP[L]G[A]PPH  
 h-III17D 1 .....MLVAGFLLALPPSWAAGA PRAGRRPAR[P]RGCA[DRP  
 h-III17E 1 .....MRERPRLGEDSSLISLF[L]OVVAFLAMVMGTHTYSH  
 h-III17F 1 .....MTVKTLLHGPA MVKYL[LS]L[GL]AFLSEAAARKIPKVG  
  
 h-III17 30 NPGCPNSEDKNF[P]RTVMVN[L]NIHNRNTNTNPK.....RSSD  
 h-III17B 43 HQVPLDLVSRMKPYARMEEYERNIEEMVAQLR[N]SSEL AQRKCEVNLQLWM  
 h-III17C 51 LLARGAKWGQAL[P]VAL[V]SS[L]EAASHRGRHERPSATTQCPVLRPEEVLEAD  
 h-III17D 36 EELLEQLYGRLAAGVLSAFHHTLQLGPREQARR[N]ASCPAGGRPADDRFRPP  
 h-III17E 36 WPSCCPSK[G]QDTS[E]ELLRWSTVVPPLPARP[N]RHPESCRAS.....EDGP  
 h-III17F 38 HTFFOKPESC PVPGGSMK[L]DIGIINENQRVS.....MSRN  
  
 h-III17 66 YNRS[TS]PWNLHRNE[DP]E RYPSVIWEAK[CR]H[LG]CINAD·GNV[DY]HMNSVP  
 h-III17B 93 [N]KRSLS[SP]WGYSINHDP[SR]IPVD[L]PEARCLCLGCVN[P]FTMQEDRS[M]VSV P  
 h-III17C 101 THORSISPWRYRYVDTDEDRYPQKLAFAECLCRGCI[DA]RTGRETAAALNSVR  
 h-III17D 86 T[N]LRSVSPWAYRISYDPA RYPRYLPEAYCLCRGCLTGLFGEEDVFR[SA]P  
 h-III17E 82 L[N]SRAISPWRYELDRD[L]NR[L]PQD[L]YHARCLCPHCVSLOTGSHMDPRGNSE  
 h-III17F 74 IESR[TS]PWN[Y]T[V]TWD[P]NRYPSEVVQAQ[CR]N[LG]CINAQ·GKEDISMNSVP  
  
 h-III17 115 IQEILVLRRE.....PPHCPNSFRLEKILVS VGCTCVTP[V]HHVA  
 h-III17B 143 VFSQVP[R]RRLCPPP.....PRTGCRORAVMETI AVGCTCIF.....  
 h-III17C 151 LLQSL[V]LRRRRCSDRGGSLP[TP]GAF[EH]TEF[I]HV[P]VGCTCVL[PR]SV...  
 h-III17D 136 VYMP[TV]LRR[TP]ACAG.....GRSVYTEAYVTIP VGCTCVPEPEKDAD  
 h-III17E 132 LLYHNQTVFYRRRCPCHGEK..GTHKGYCLERRLYRVS[LA]C[V]R[PR]VMG--  
 h-III17F 123 IQE[TV]V[R]RK.....HQGCSVS[F]QLE[K]VLVTVGCTCVTP[V]HHVQ  
  
 h-III17D 179 SINSSIDKOGAKLLLPNDAPAGPX

FIG. 19



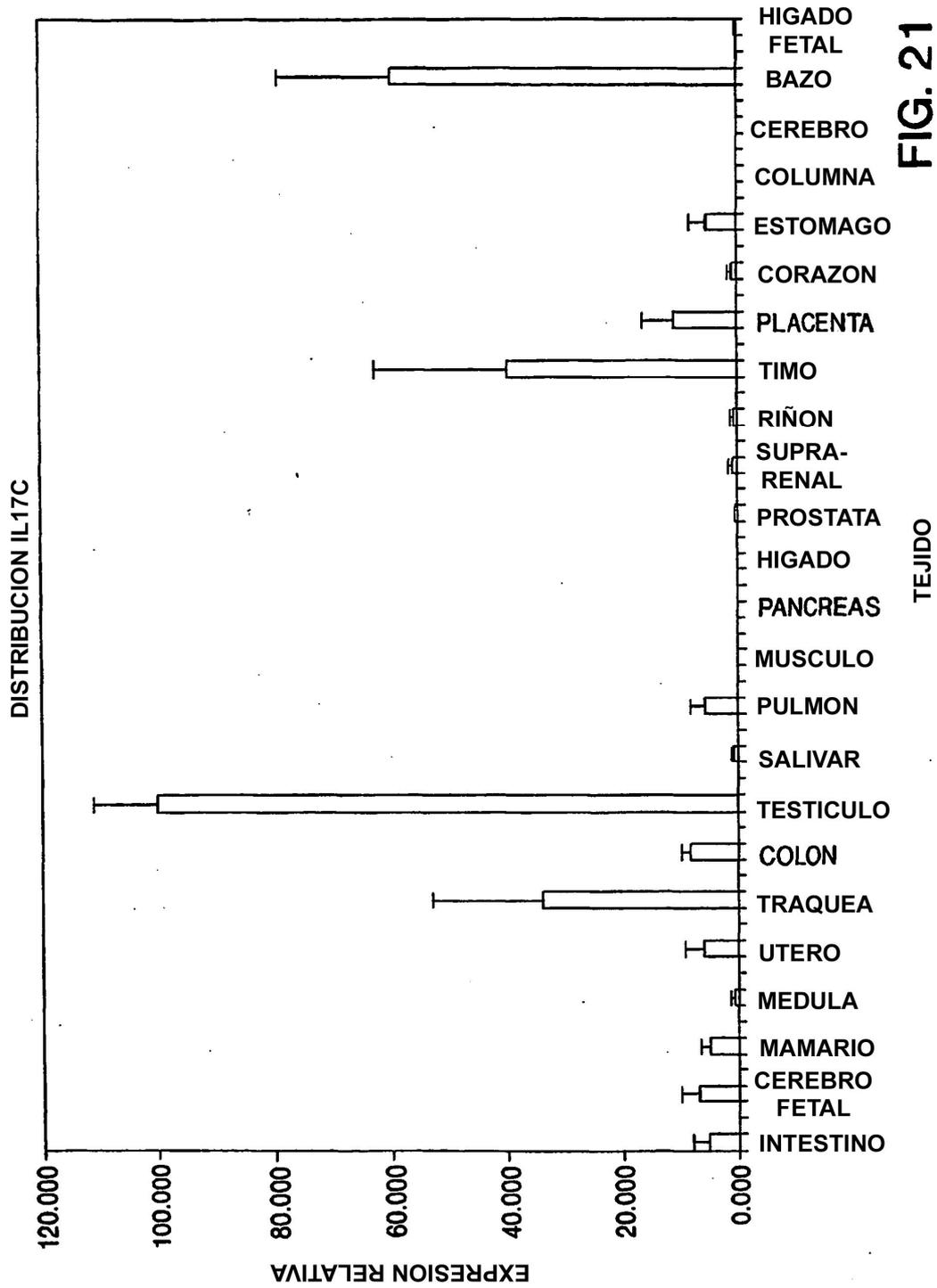
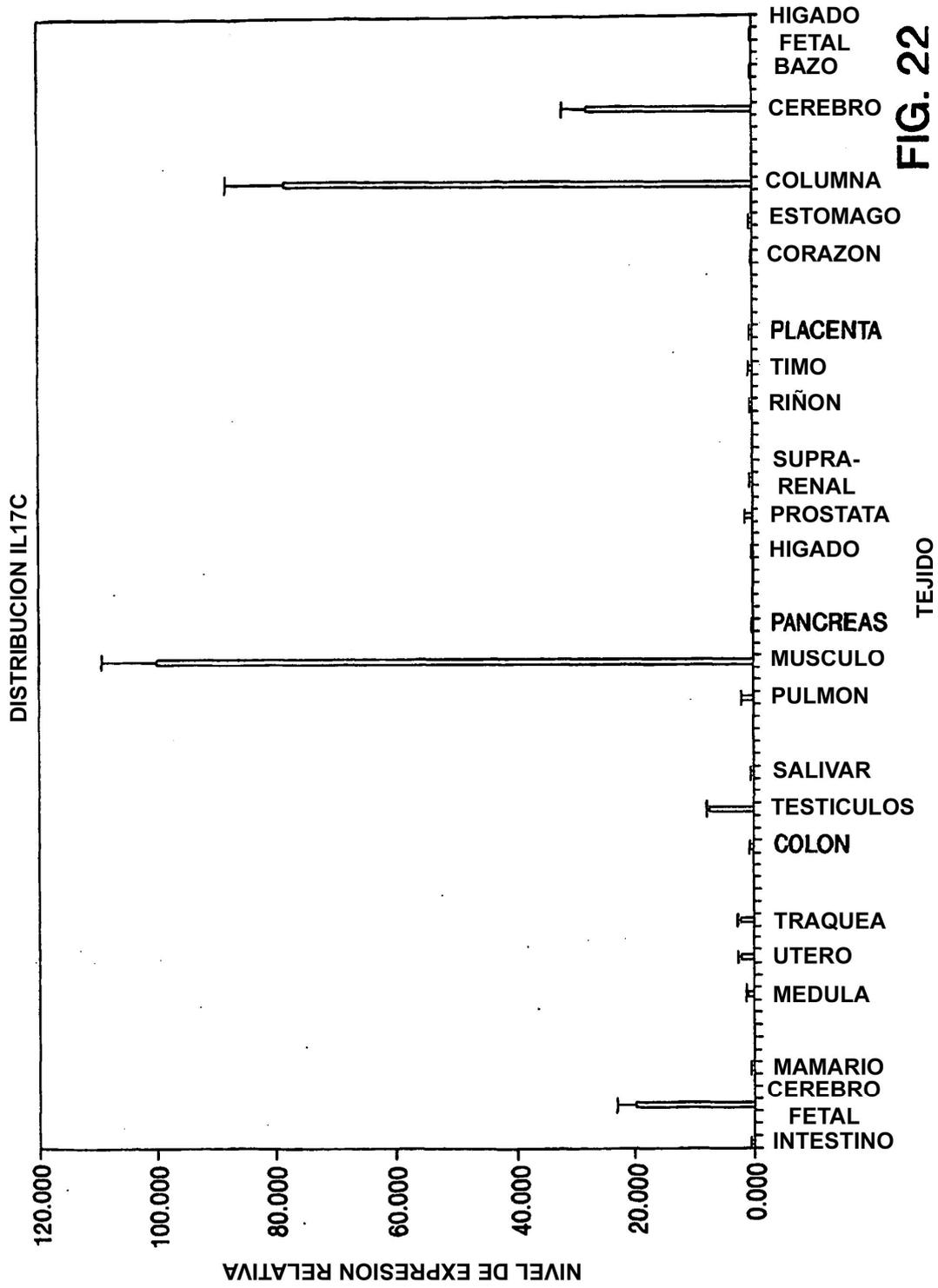


FIG. 21



**FIG. 22**

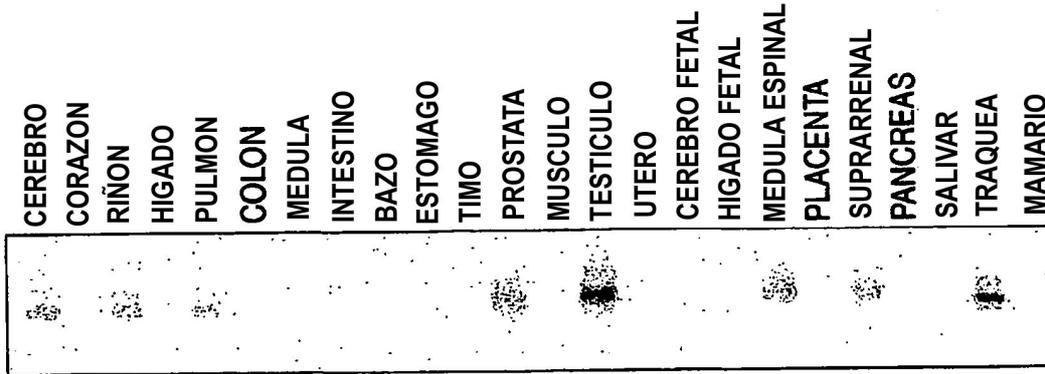


FIG. 23

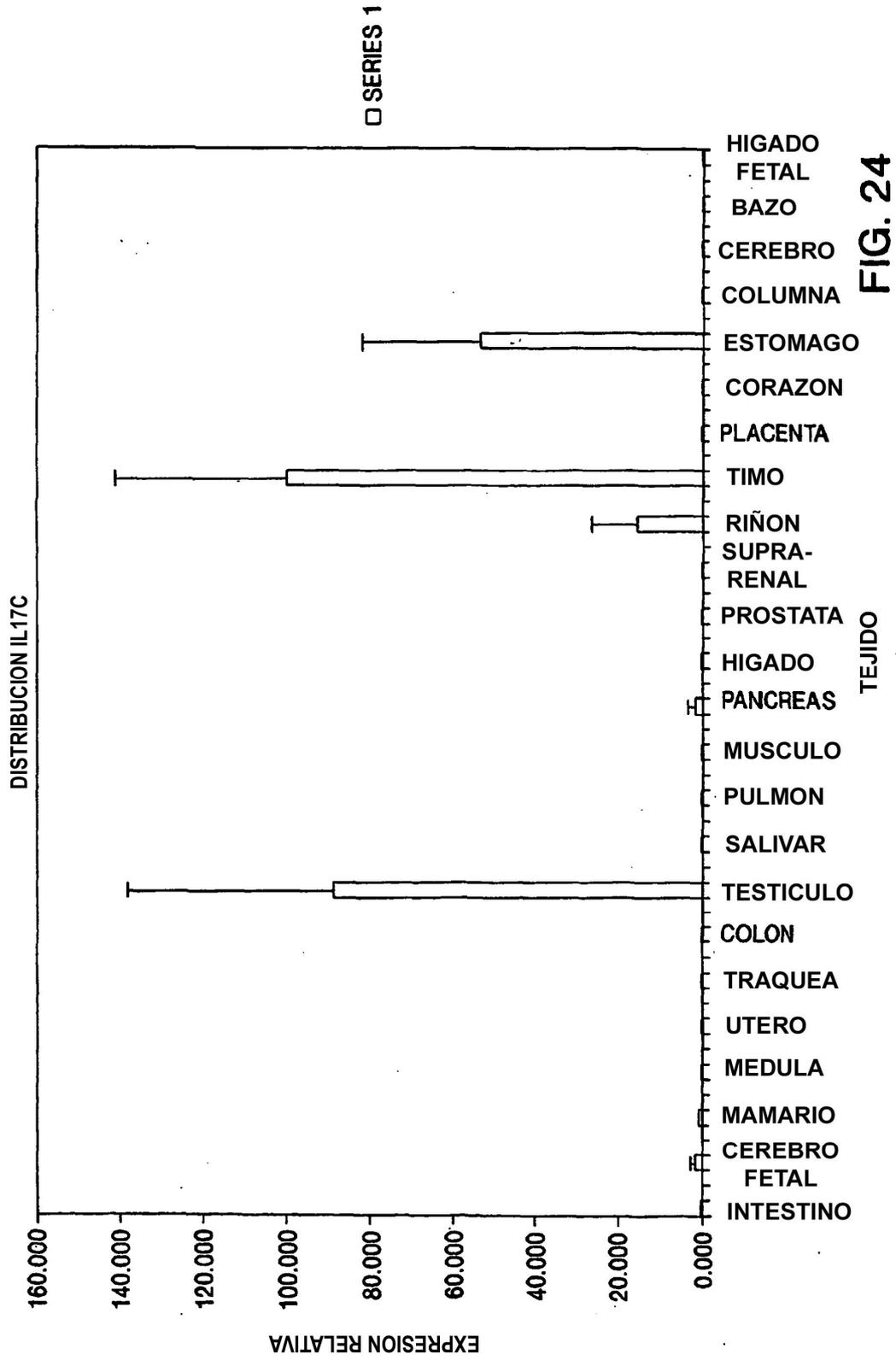


FIG. 24

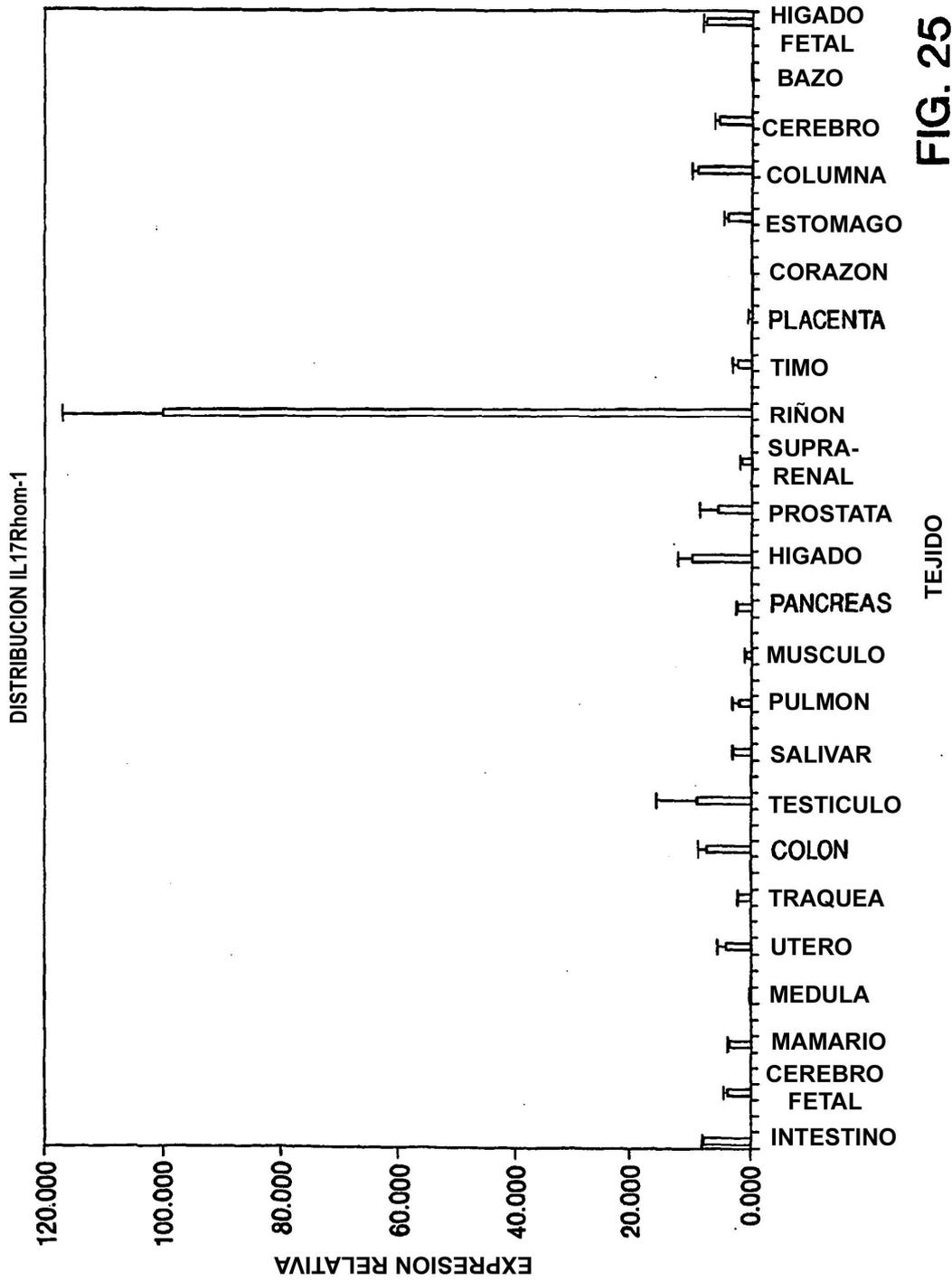


FIG. 25

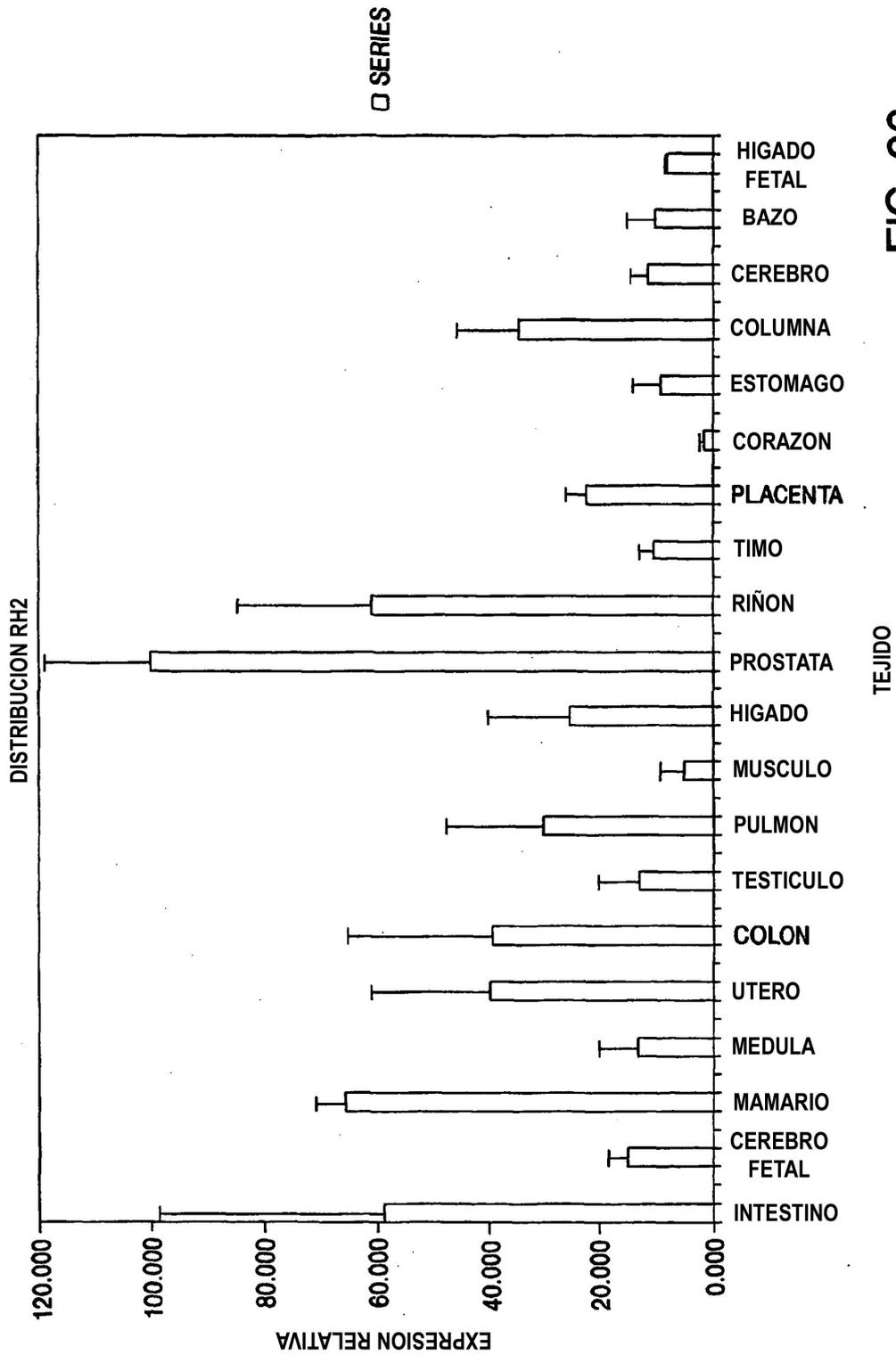


FIG. 26

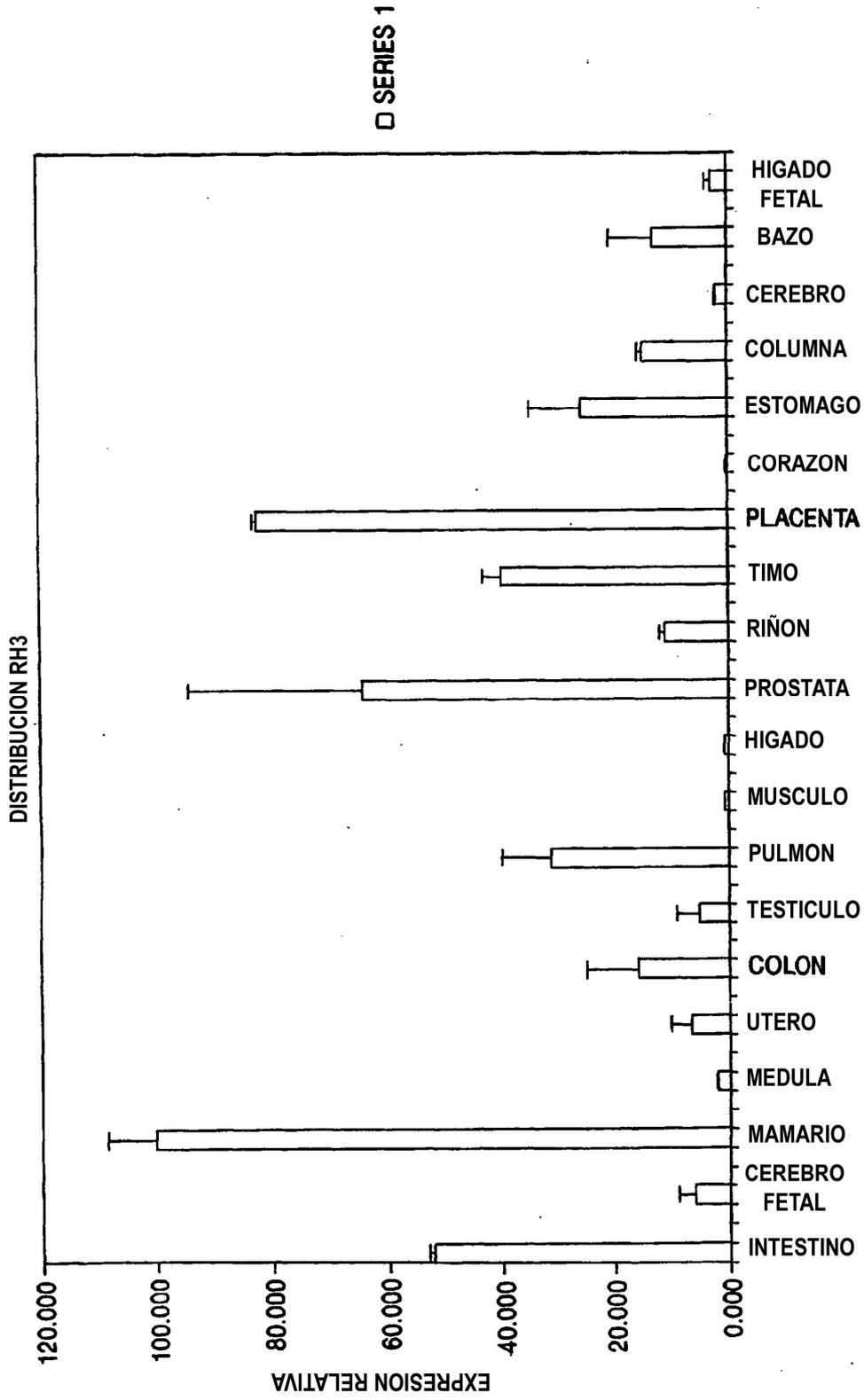


FIG. 27

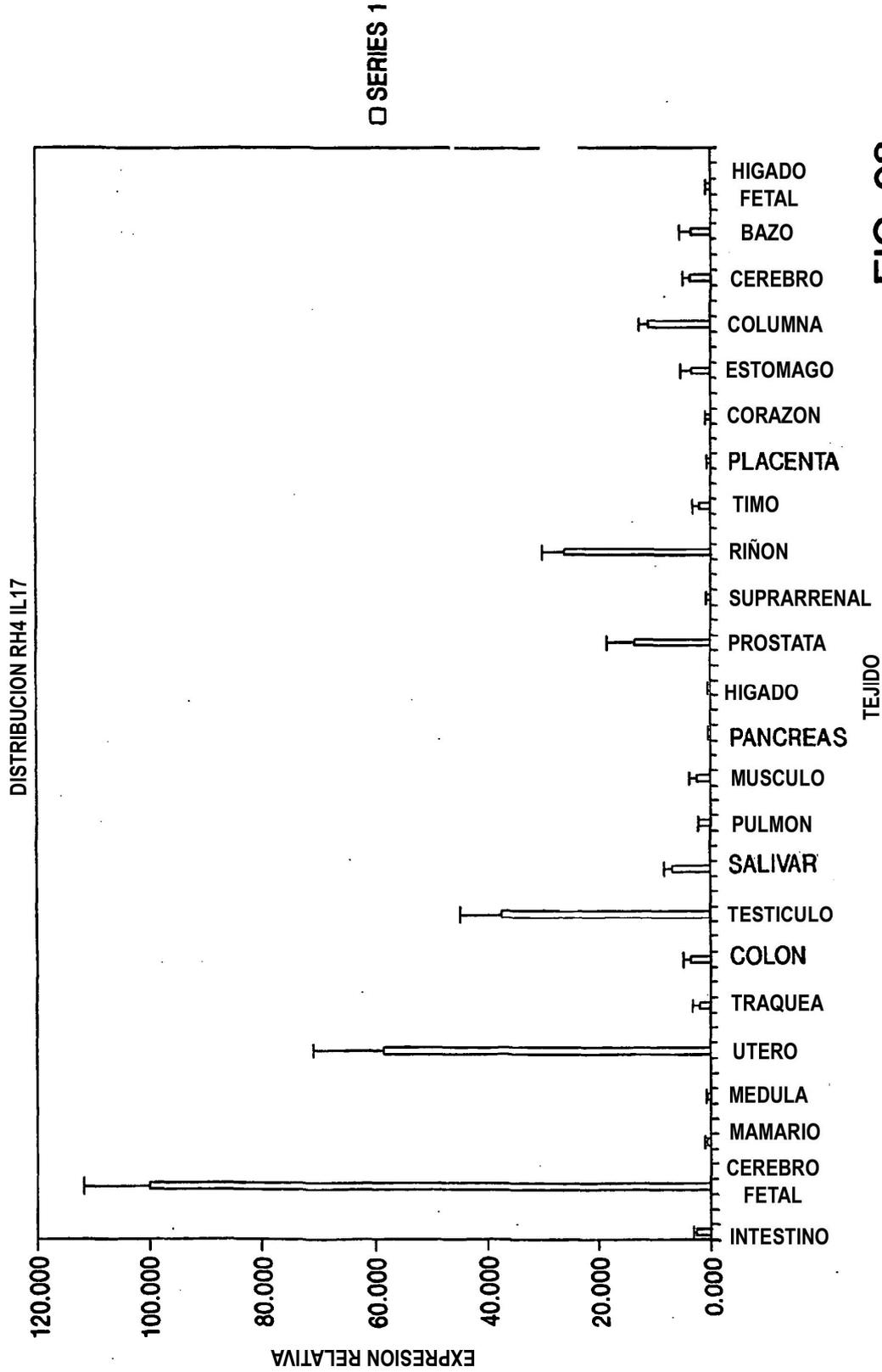


FIG. 28

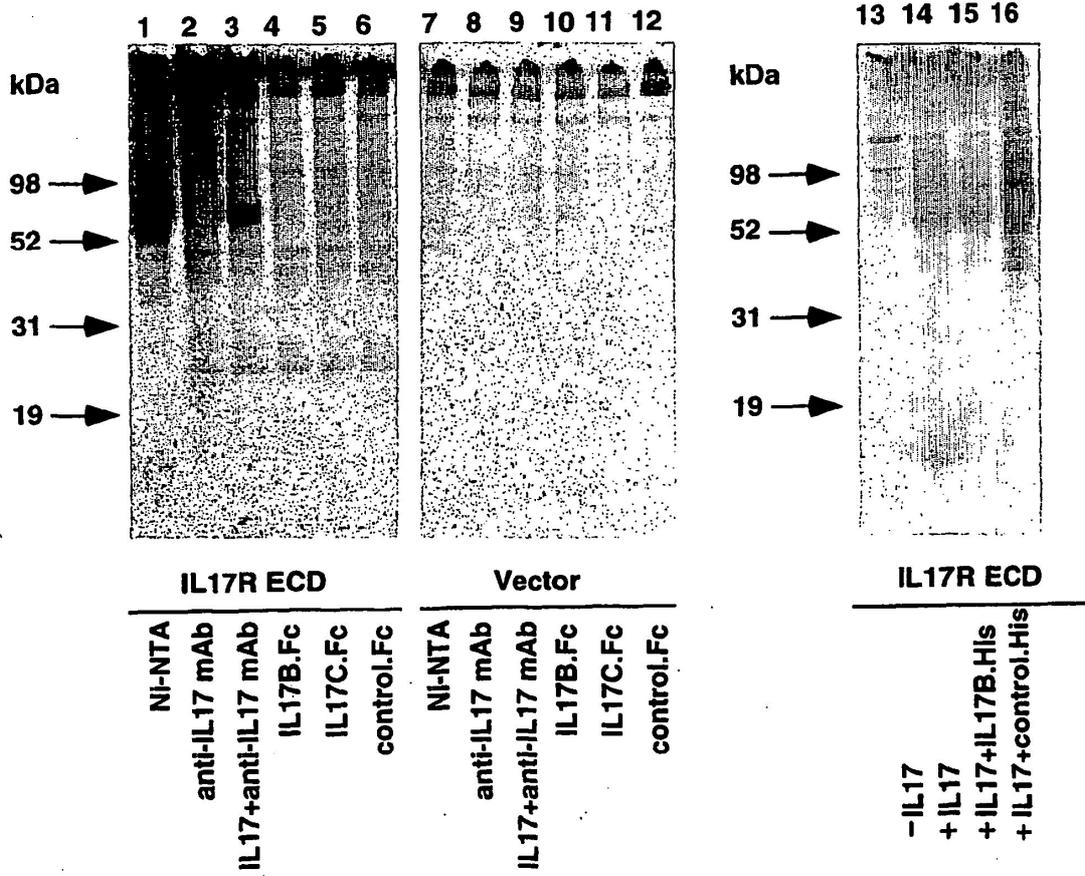


FIG. 29A

FIG. 29B

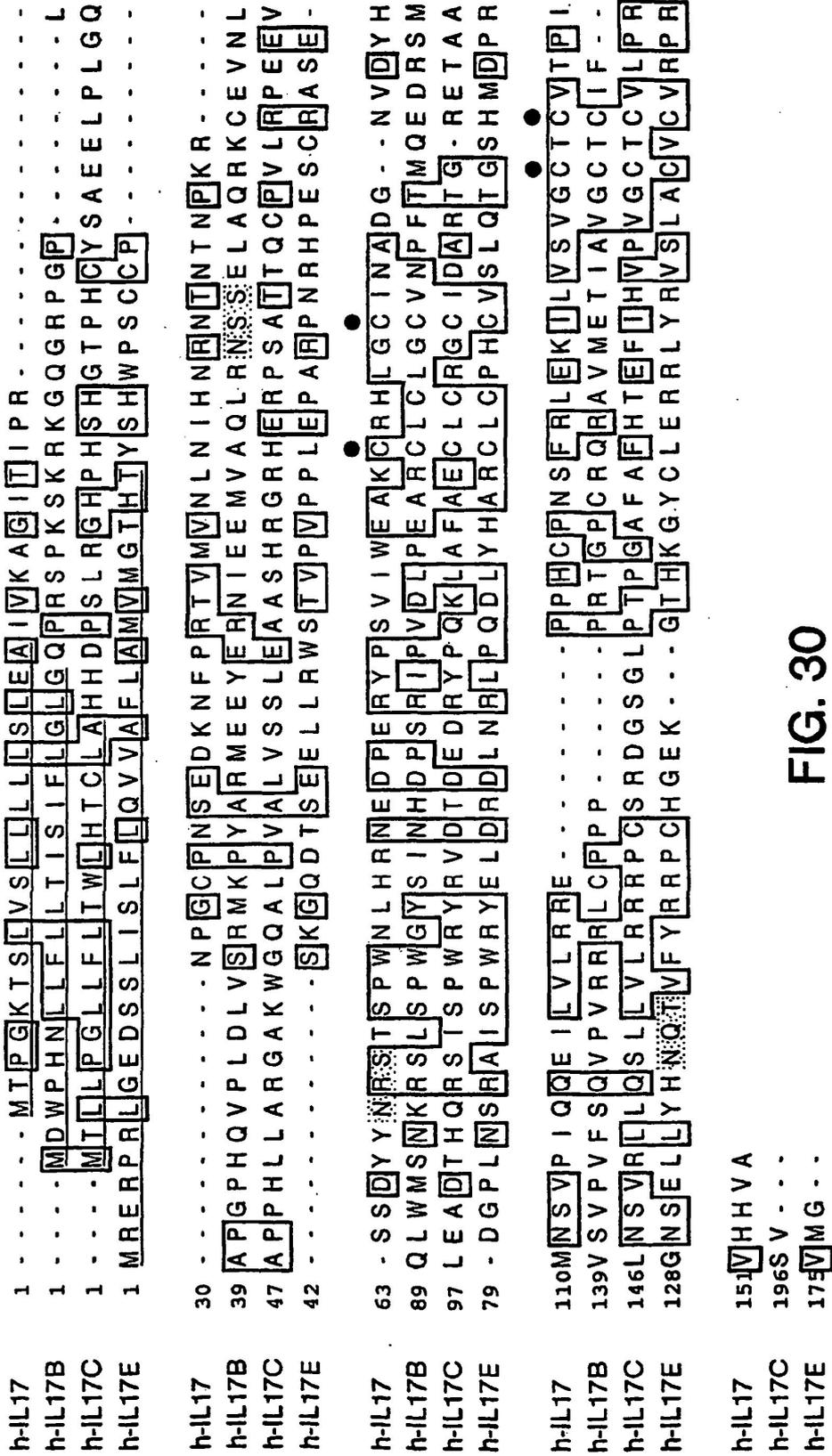


FIG. 30

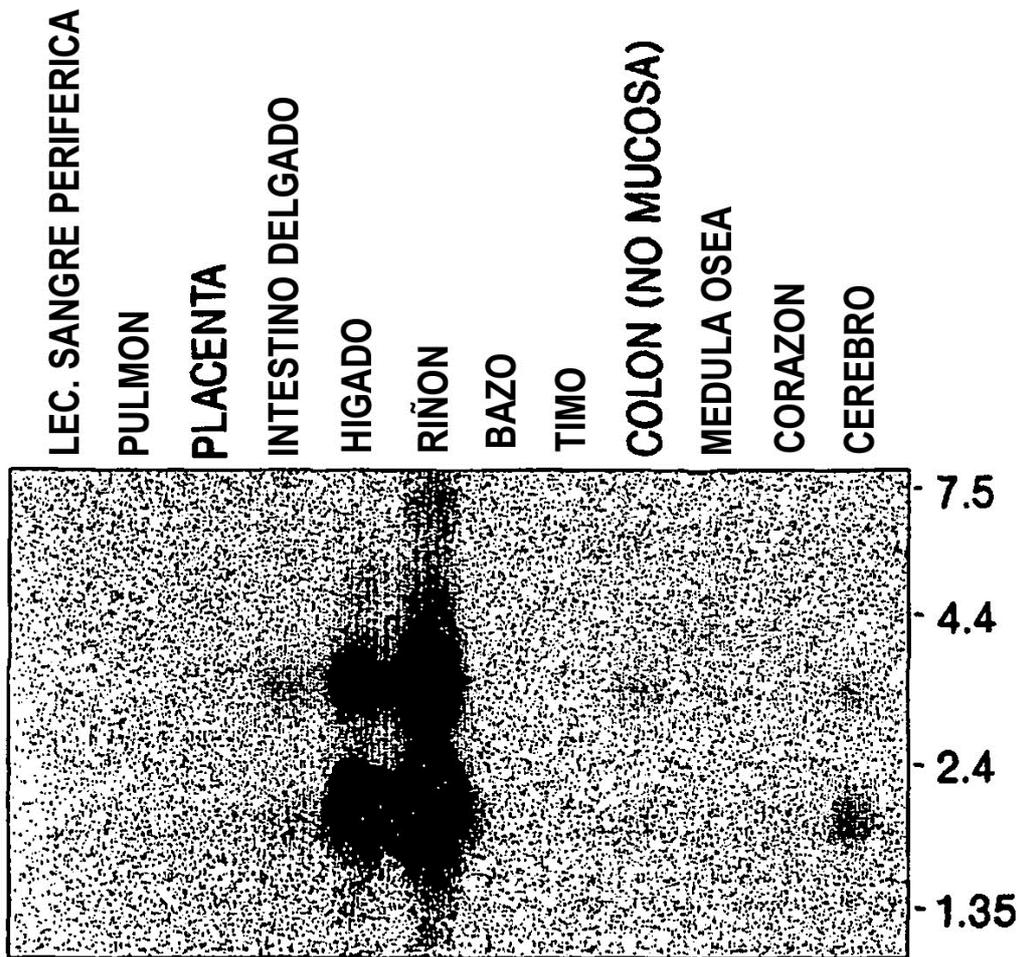


FIG. 31A

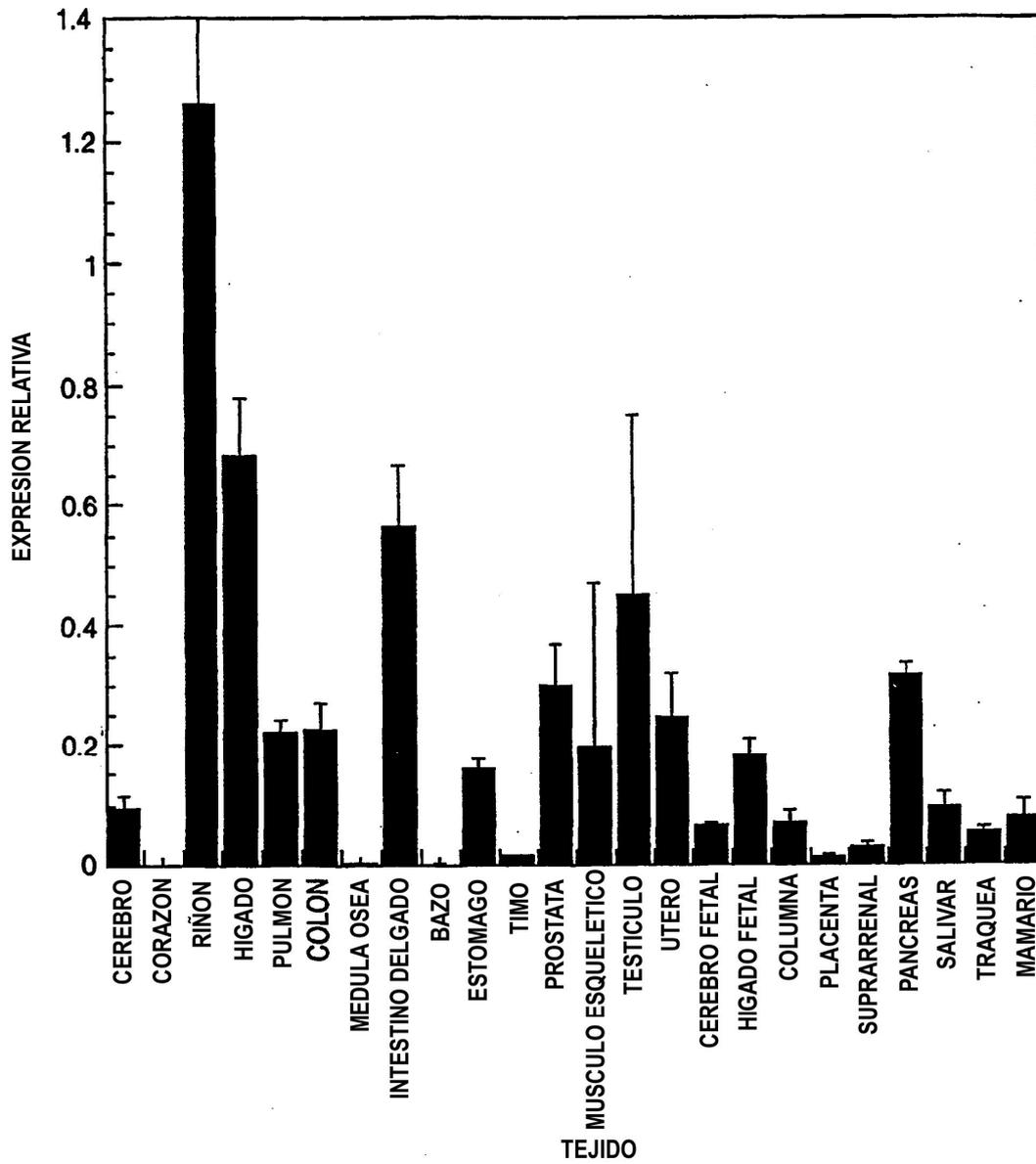


FIG. 31B

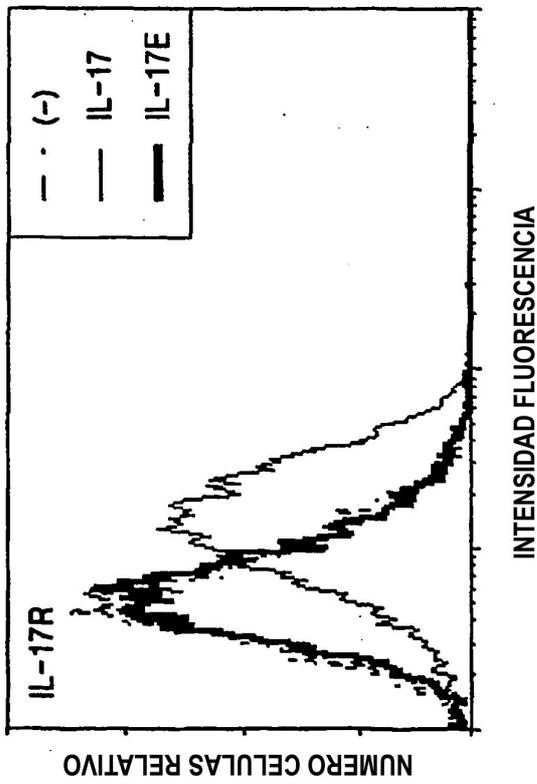
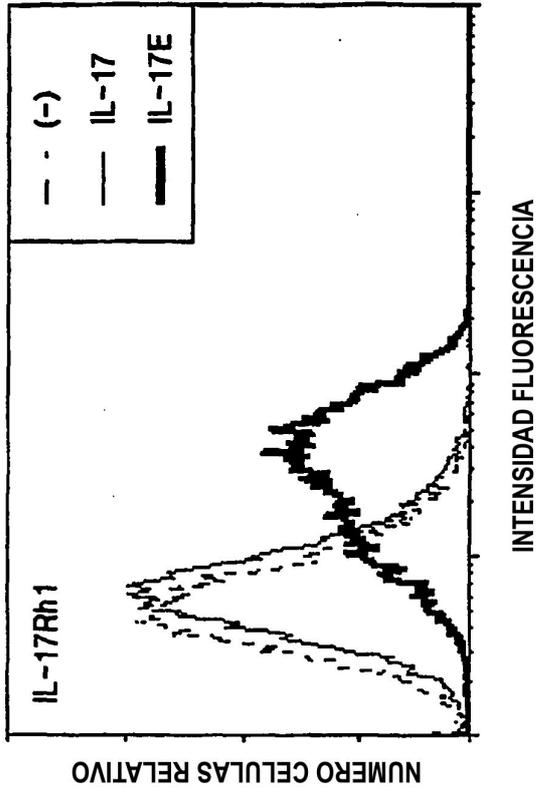
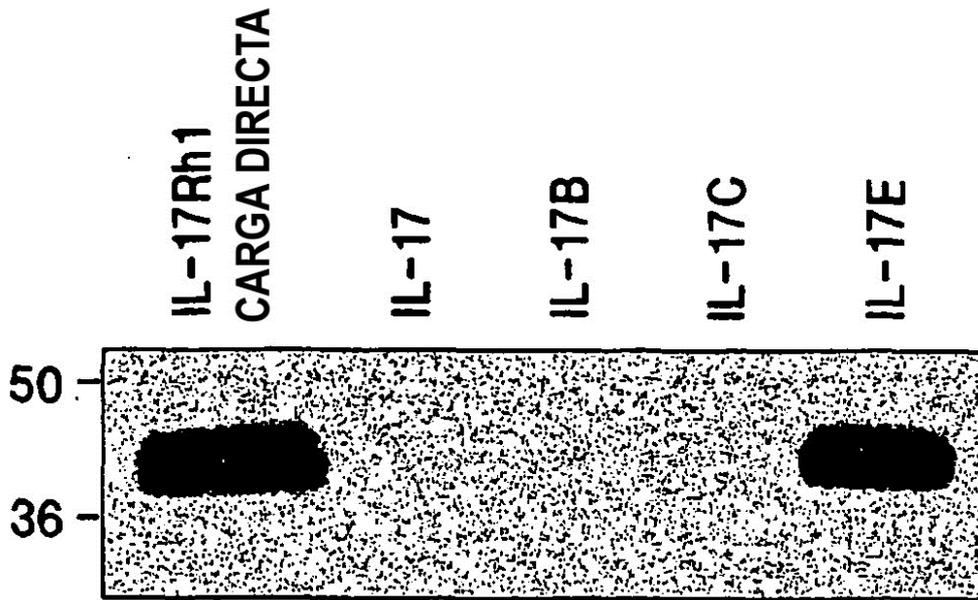
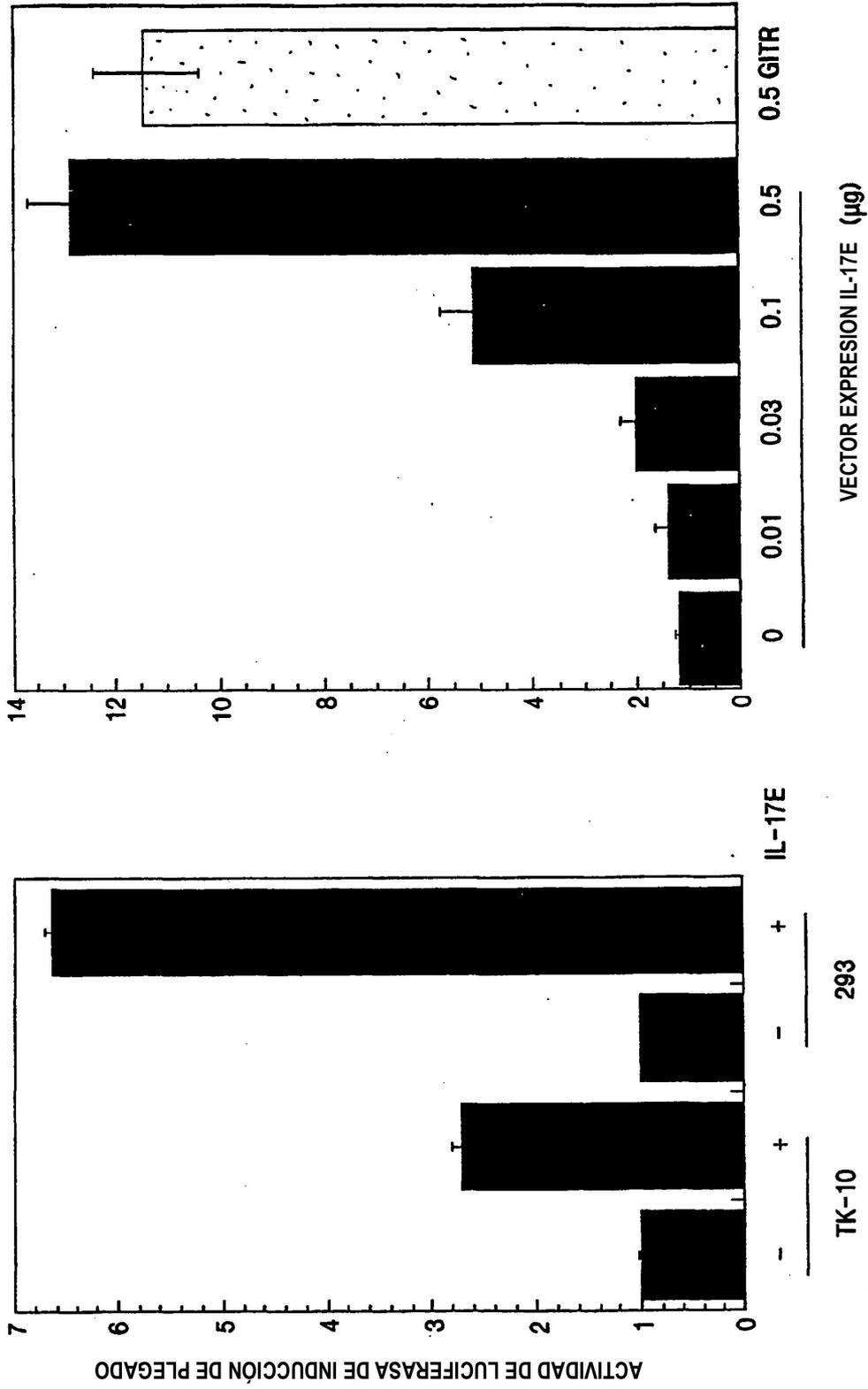


FIG. 32A



**FIG. 32B**



**FIG. 33B**

**FIG. 33A**

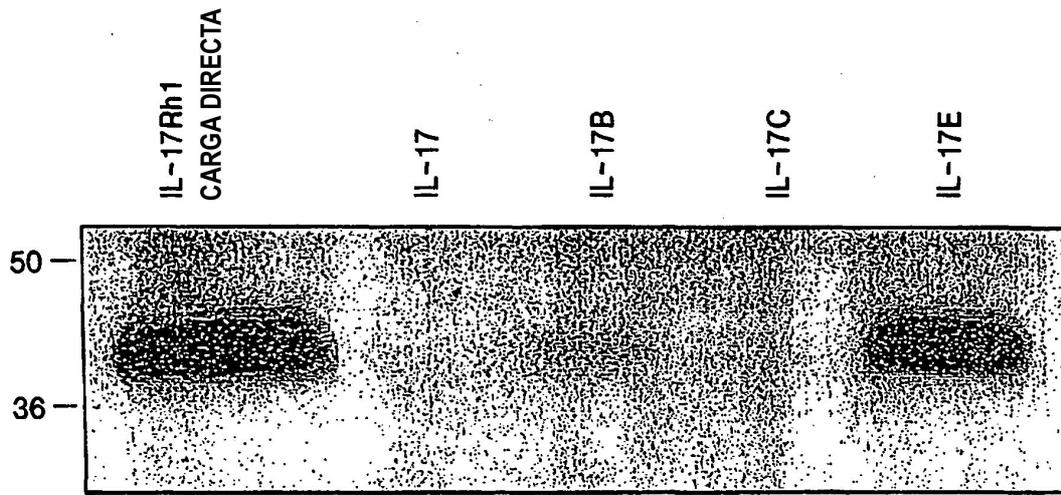


FIG. 34

FAMILIA IL-17 DE CITOCINAS TIENE PATRON COMPLEJO DE  
ESPECIFICIDADES RECEPTOR-LIGANDO DE SOLAPADO

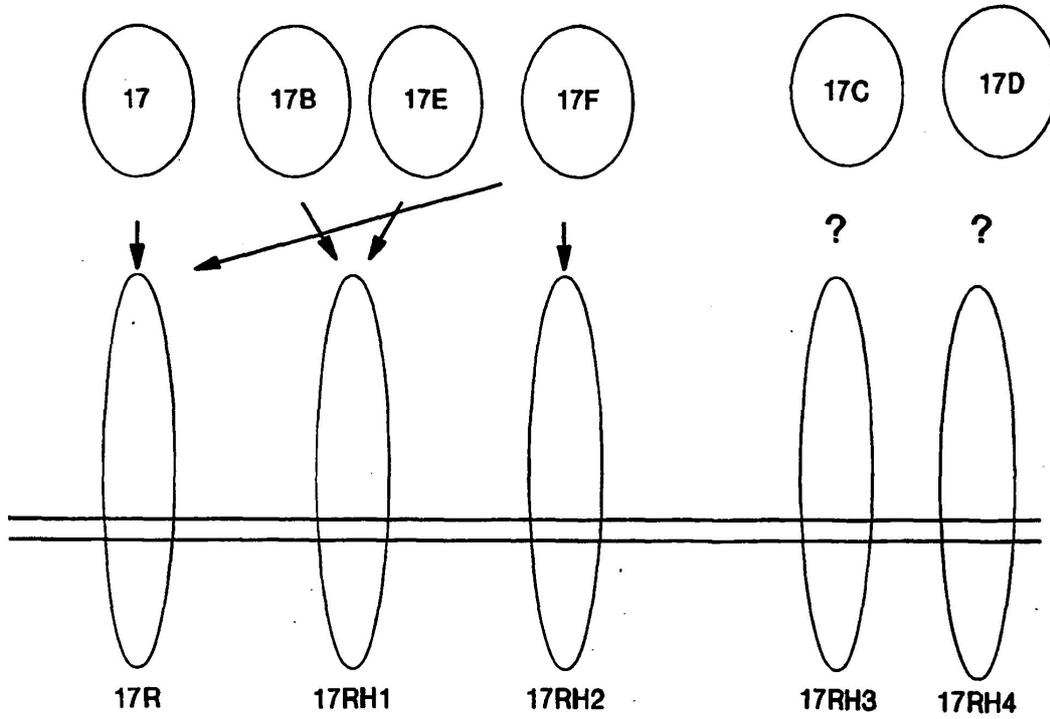


FIG. 35

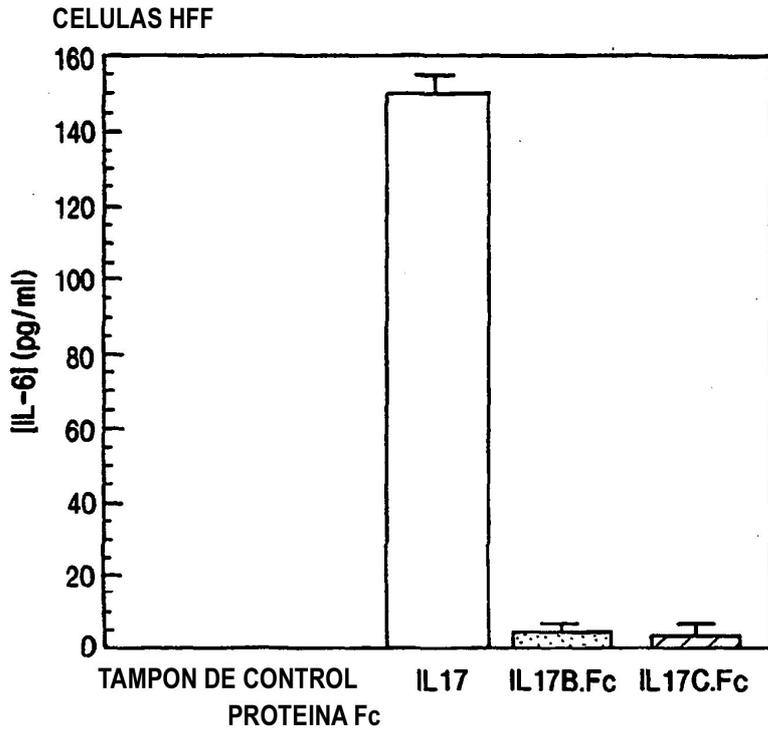


FIG. 36A

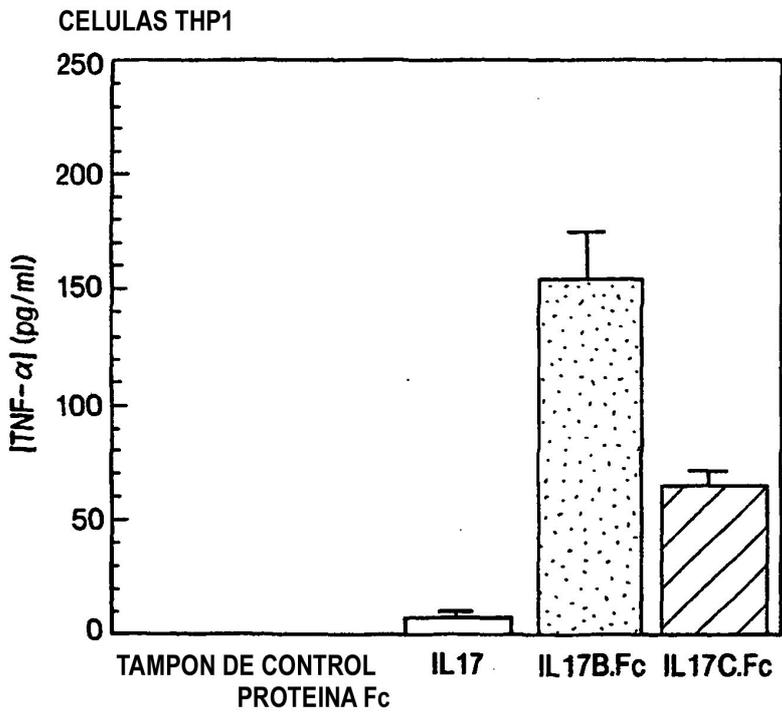
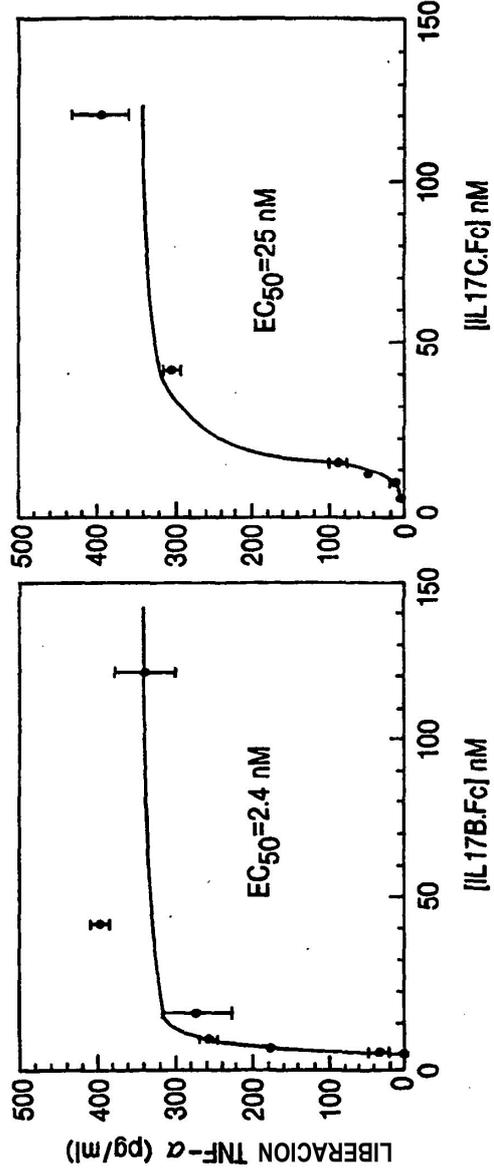
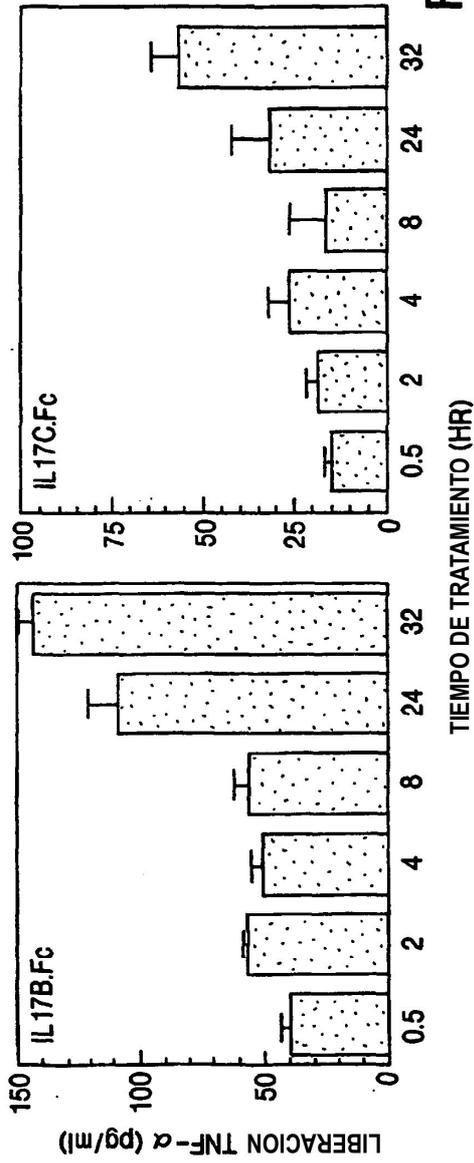
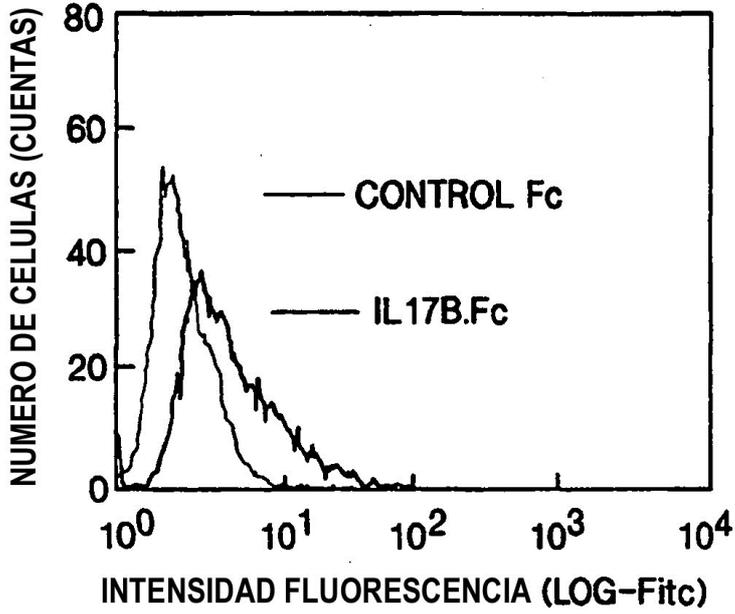
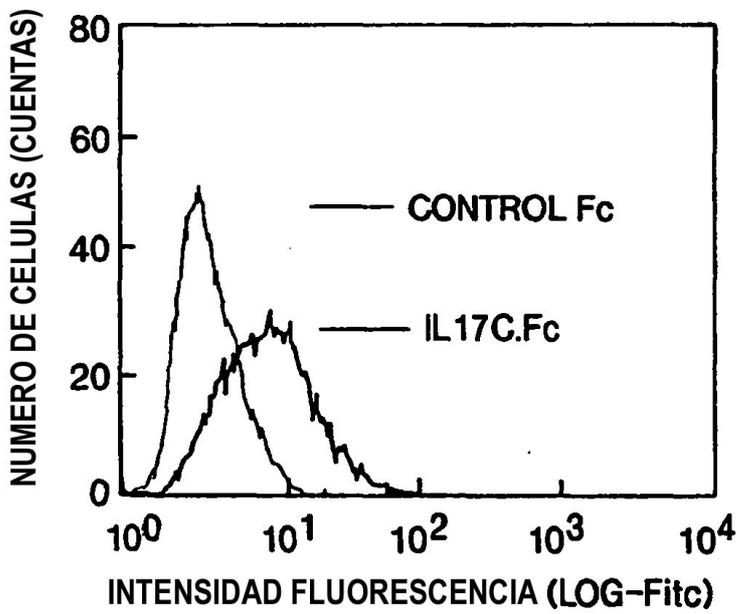


FIG. 36B





**FIG. 38A**



**FIG. 38B**

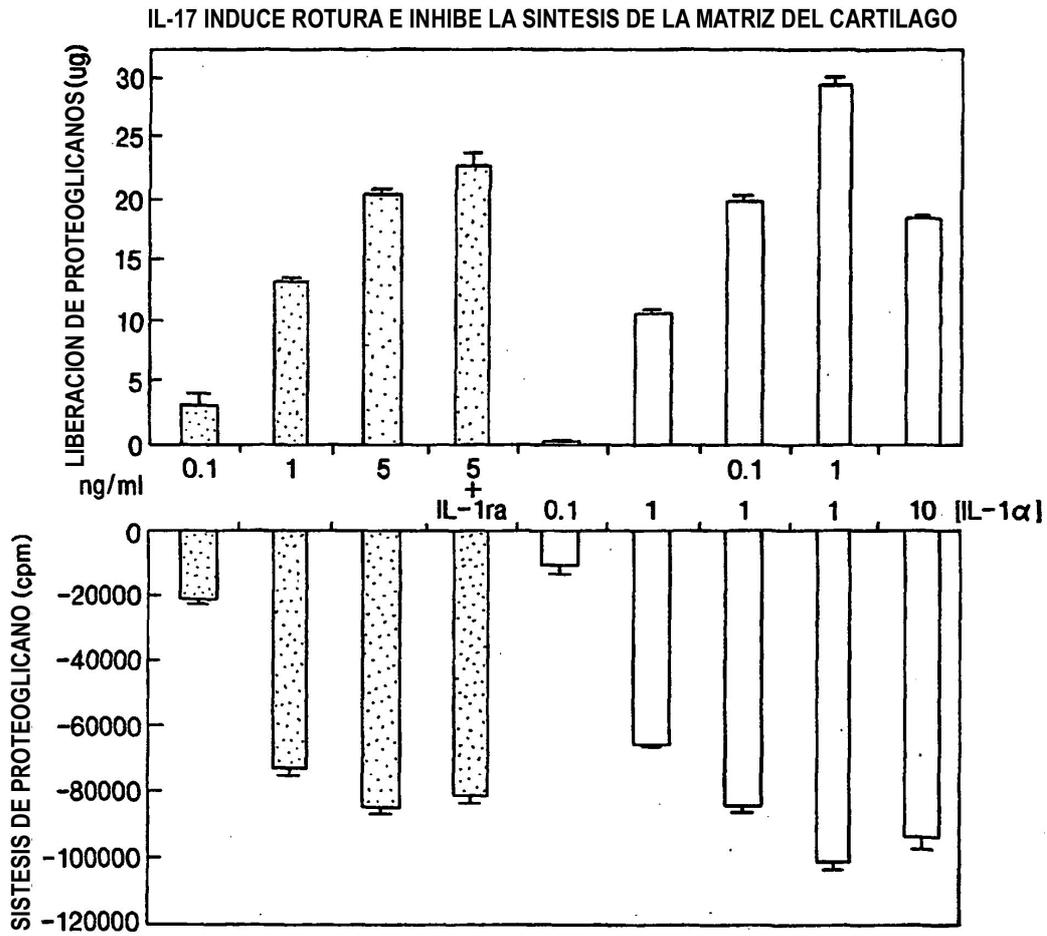


FIG. 39

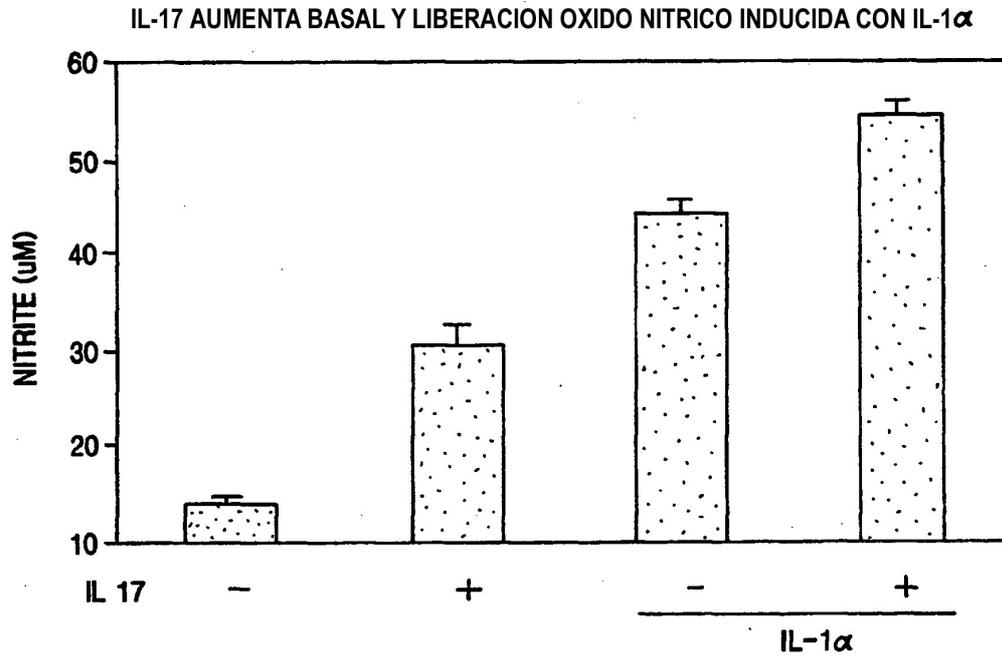


FIG. 40

LA INHIBICION DE LA LIBERACION DE OXIDO NITRICO NO BLOQUEA LOS EFECTOS PERJUDICIALES DE IL 17 SOBRE LA ROTURA O SINTESIS DE LA MATRIZ

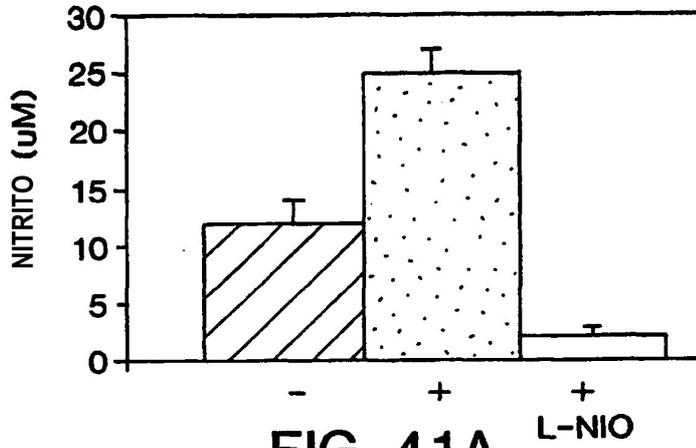


FIG. 41A

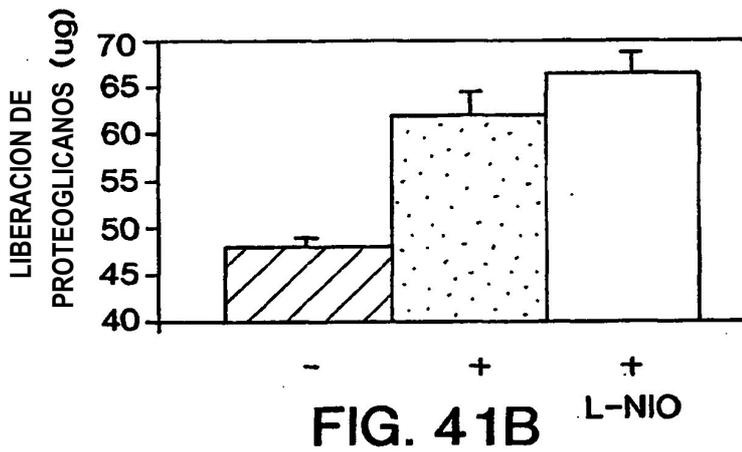


FIG. 41B

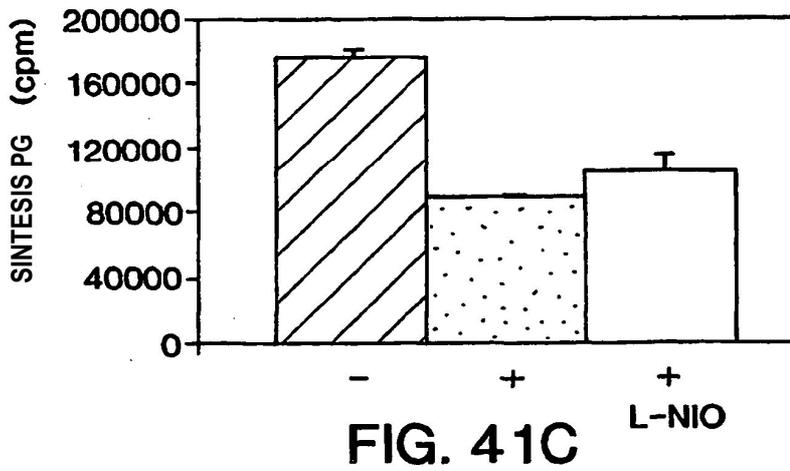


FIG. 41C

LA INHIBICION DE NINGUNA LIBERACION MEJORA LA ROTURA DE LA MATRIZ INDUCIDA CON IL1- $\alpha$  PERO NO LA SINTESIS DE LA MATRIZ

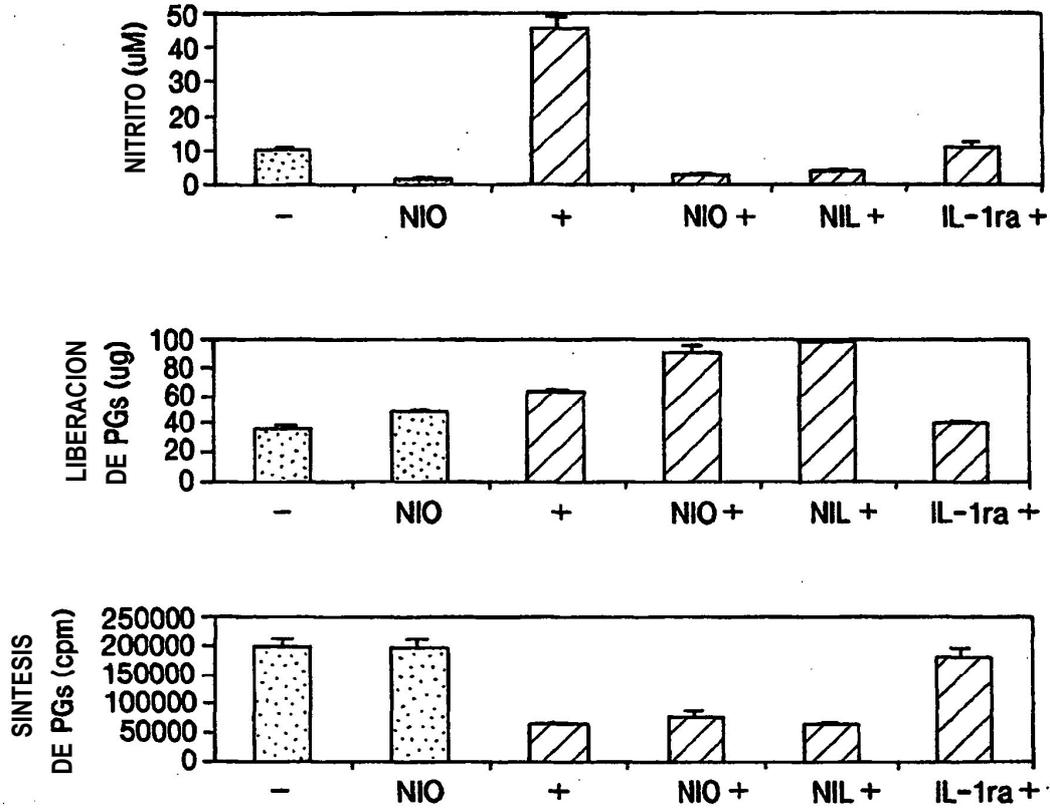
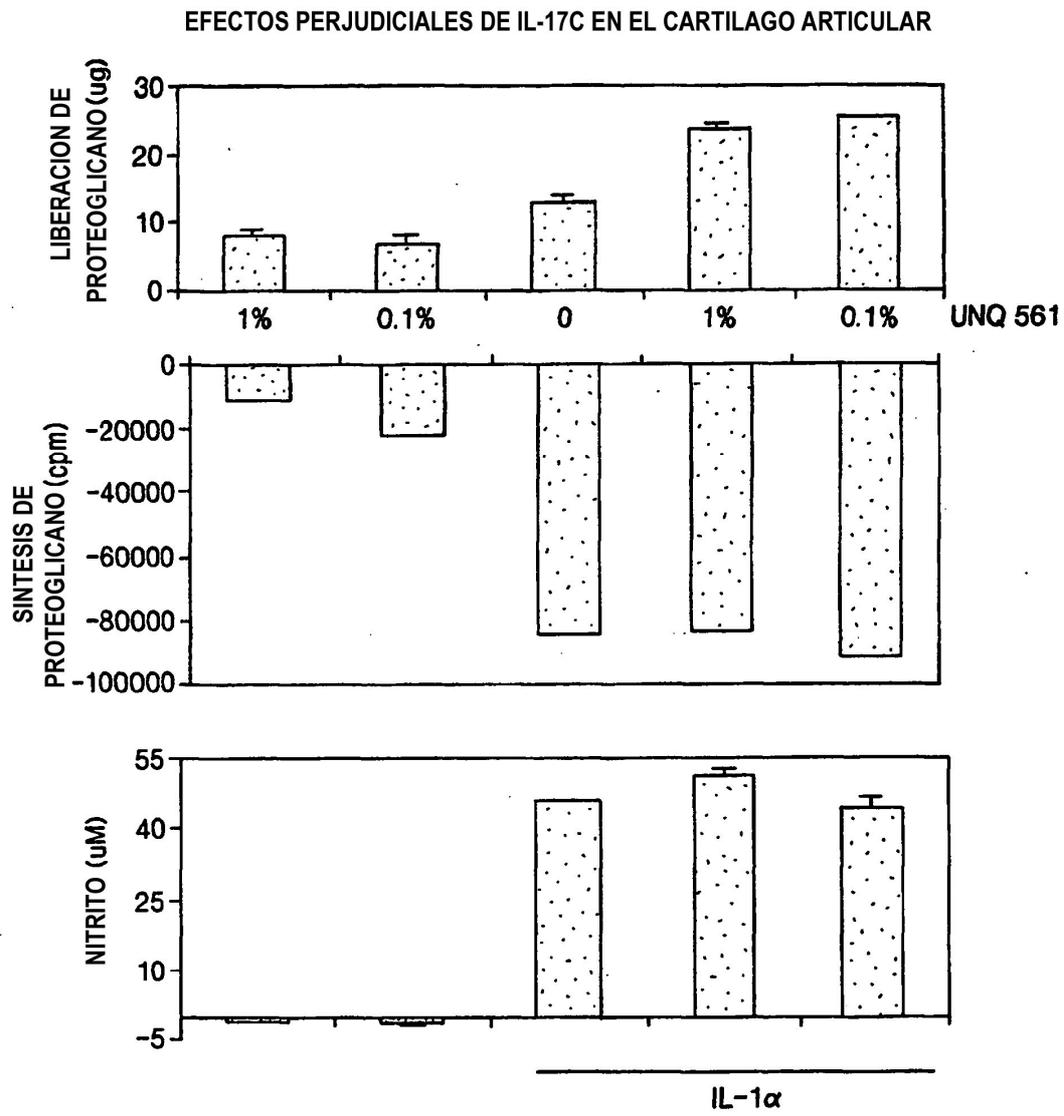


FIG. 42



**FIG. 43**

TRASTORNO DE INTESTINO INFLAMADO:  
EXPRESIÓN DE FAMILIA IL-17 EN MODELO DE RATÓN DE IBD

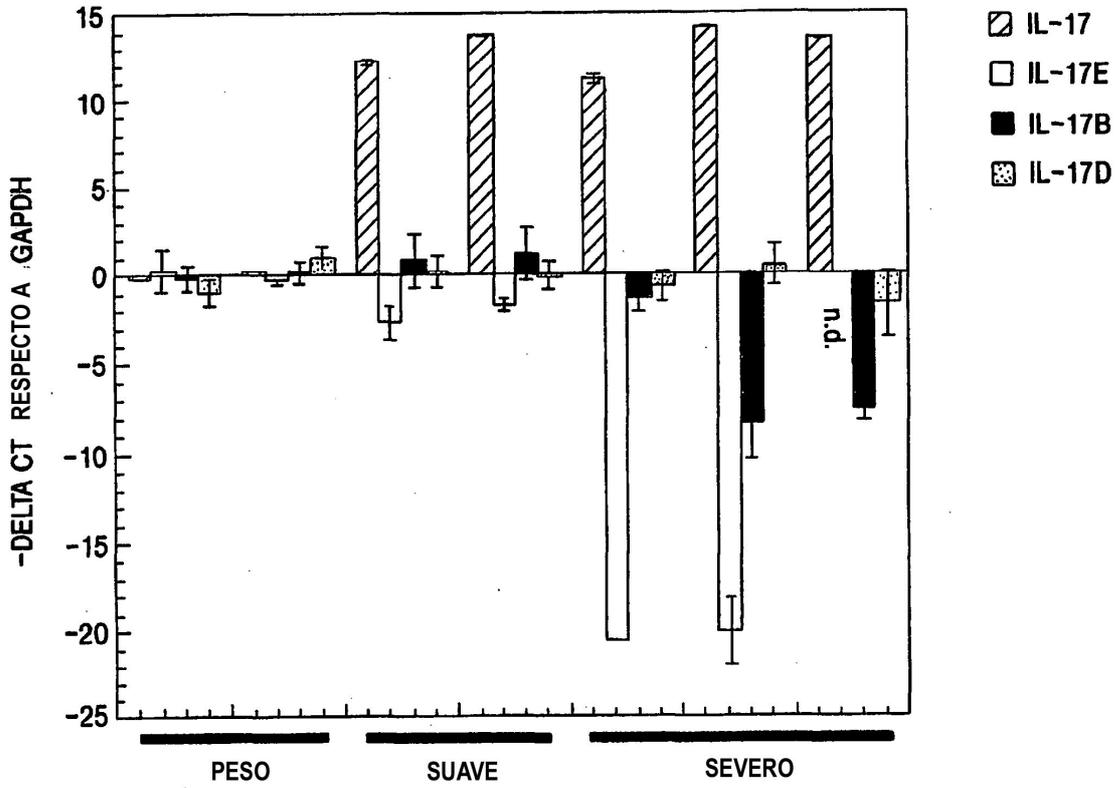


FIG. 44

IL-17D, PRESENTE EN EL CEREBRO, DISMINUYE RAPIDAMENTE  
DESPUES DEL INFARTO

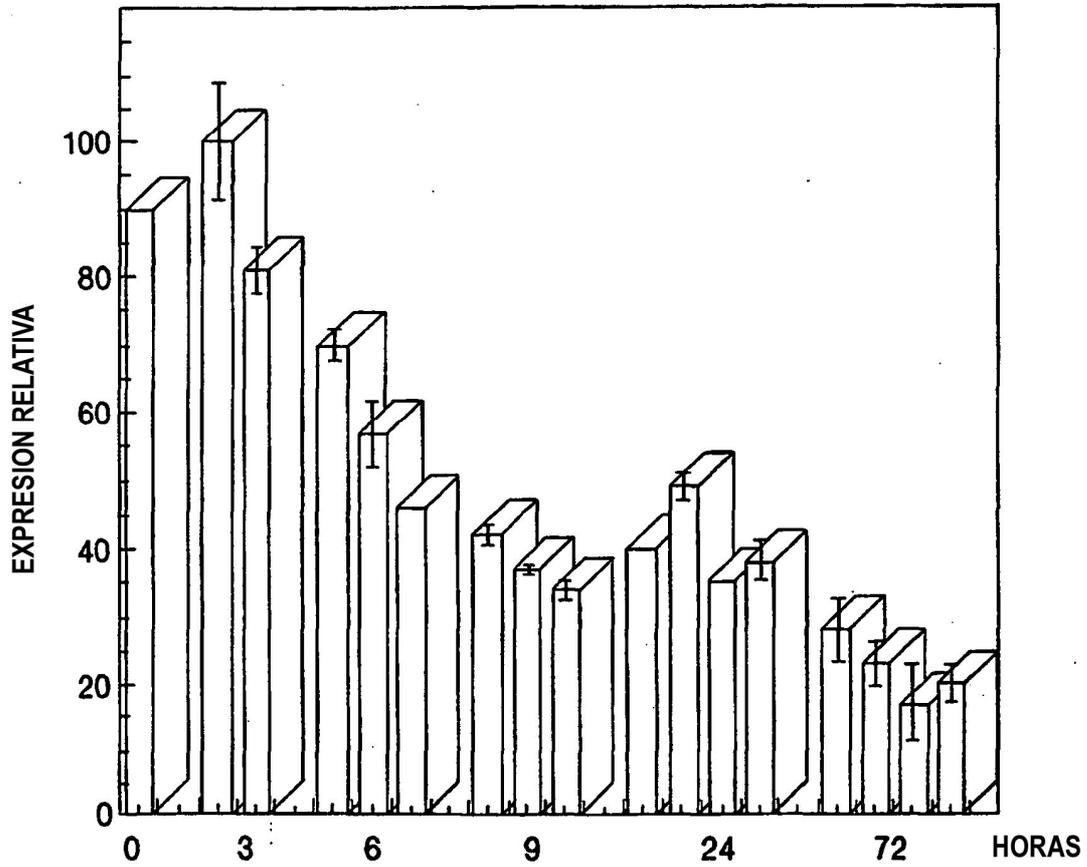


FIG. 45